

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Camila Fernandes Hergert Garcia

**Avaliação do potencial tóxico
de vinhaça fitorremediada
utilizando o corpo gorduroso
de *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda)**



Rio Claro
2018

Camila Fernandes Hergert Garcia

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DA VINHAÇA
FITORREMEIADA UTILIZANDO O CORPO GORDUROSO DE
RHINOCRICUS PADBERGI (DIPLOPODA)

Orientador: Prof^a Dr^a Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

Co-orientador: Prof. Dr. Raphael Bastão de Souza

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau
de Bacharela e Licenciada em Ciências
Biológicas.

Rio Claro
2018

G216a

Garcia, Camila Fernandes Hergert

Avaliação do potencial tóxico de vinhaça fitorremediada utilizando o corpo
gorduroso de *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda) / Camila Fernandes Hergert Garcia. --
Rio Claro, 2018

53 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Carmem Silvia Fontanetti Christofoletti

Coorientadora: Raphael Bastão de Souza

1. Ecotoxicologia terrestre. 2. Toxicidade do solo. 3. Fitorremediação. 4. Efluente. 5.
Histologia e histoquímica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados
fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

*Dedico este trabalho, com carinho, às
pessoas mais importantes da minha vida: meus
pais e irmão.*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho representa o fim de um ciclo e eu não poderia encerrá-lo sem agradecer aqueles que estiveram ao meu lado durante este período tão especial e inesquecível da minha vida.

Primeiramente, agradeço aqueles que me permitiram viver tudo isso: meus pais, Odair e Josileide. Obrigada por terem me criado para o mundo e me incentivado a construir minha própria vida indo atrás dos meus sonhos. Obrigada pelo amor incondicional; pelas infinitas vezes que vocês me ouviram chorar; pelos conselhos; pelo conforto que me proporcionaram; pelo carinho mesmo longe; pelos ensinamentos que me passaram; pelas vezes que aparecem por lá só porque eu estava me sentindo sozinha, doente ou porque o chuveiro tinha queimado; por me apoiarem em todos os caminhos que escolhi seguir; por todas as vezes que me deram a mão e me incentivaram quando eu achei que eu não conseguiria. Palavras nunca serão suficientes para agradecer tudo o que vocês sempre fizeram e tudo o que são para mim. Amo vocês além dessa vida.

Ao meu irmão, Rhenan, meu grande espelho, por todo companheirismo e aproximação ao longo de todos esses anos. Obrigada por acreditar tanto em mim, por todas as longas conversas, por todos os conselhos, por todas as dificuldades que me deu a mão para crescermos juntos, por tanto carinho, por sonhar comigo, por todas as nossas brincadeiras, por me apoiar em todas as minhas decisões, por tantas risadas, pelos longos dias de terapia e, principalmente, por ser meu eterno melhor amigo. Amo você mano.

À minha orientadora, Carmem, que me abriu as portas para fazer parte de um grande grupo de pesquisa, um que eu ainda não tinha ideia o quanto me ensinaria. Agradeço pelo acolhimento e por tudo que me ensinou ao longo de todos os anos que pude conviver com você; por ter me dado o melhor exemplo de profissional que eu poderia ter na vida para me espelhar. Obrigada por tudo.

Ao meu co-orientador, Bairral, que ao longo da convivência foi se tornando um grande amigo. Agradeço por tudo que me ensinou; por ter sido meu equilíbrio ao longo de tanto trabalho (eu sempre desesperada e você sempre calmo hahaha); por, muitas vezes, ter sentado comigo e me ajudado quando eu achava que não iria dar conta; por ter exigido sempre muito de mim, me fazendo crescer; por ter acreditado que eu era capaz; por ter sido um grande exemplo de profissional para

eu me espelhar; por todas as risadas e brincadeiras; por toda intimidade que criamos; pela nossa relação ter ido além do trabalho e ter permitido que eu entrasse na sua vida como uma amiga. Você é incrível e eu nunca terei palavras pra agradecer tudo o que você foi na minha vida e na minha formação. Amo muito você meu eterno Co.

Ao Jorge, agradeço por ter entrado na minha vida quando eu menos imaginava; pelas infinitas vezes em que me ajudou; que me escutou; que me aguentou chorando ou me tirou um sorriso do rosto. Agradeço por toda paciência, carinho e companheirismo; por me incentivar; por alegrar meus dias; por me dar a mão sempre que preciso. Você é muito especial.

Às minhas amigas de turma que escolhi para ser minha família de Rio Claro: Letícia, Lídia, Louise e Maria Paula (Fants). Obrigada por dividirem este momento tão especial da vida comigo; pelas infinitas noites de gordices; pelas risadas; pelas noites de jogos; pelos dias de desespero antes de prova que dividimos; pelos longos trabalhos realizados; por dividirem comigo as dificuldades e alegrias; por sonharem comigo; pela amizade que construímos. Vocês foram meus presentes da faculdade. Amo vocês e sempre estarei torcendo por um caminho lindo para todas vocês, contem sempre comigo mesmo que a vida nos leve para lugares distantes.

Aos meus grandes amigos de Rio Claro que eu levarei para toda vida: Cleiton, Raquel, Laís, Letícia Gonçalves, Franco, Maria Tereza, Márcia, Nádia, Antônio. Muito obrigada pelas infinitas vezes que estiveram comigo; pelas risadas; pelas brincadeiras; pelas festas; por toda intimidade que criamos; pelas noites de bebedeira; pelas longas conversas; pelos conselhos. Nós construímos uma família e sou extremamente feliz por saber que sempre levarei vocês no meu coração independente do rumo que a vida seguir. Vocês são todos muito especiais e serei eternamente grata por ter tido a oportunidade de conviver com vocês.

Ao grupo de pesquisa que fiz parte, os “fofoletes”, e aos meus colegas de laboratório “mutagênico”, muito obrigada pelo aprendizado e pelos anos de convivência tornando o trabalho mais leve e divertido. Agradeço também ao Gerson e a Cris pelos longos dias de conversa com muita risada e a, professora Marin, pelo acolhimento; pelos conselhos; pelas conversas; pelas risadas e;

principalmente, por ter se tornado mais do que um exemplo de profissional com qual pude aprender muito, mas uma amiga que levarei sempre no coração.

Às minhas grandes amigas da minha cidade natal, Raissa e Kassia, que mesmo com a distância sempre estiveram comigo e me permitiram entender o que é uma amizade para vida toda. Obrigada por toda paciência para compreender, muitas vezes, minha ausência; por sempre me ouvirem; pelos dias juntos; pelos conselhos; pelas risadas e por toda a amizade que temos. Amo vocês girls.

Aos meus amigos da minha cidade do coração, Aquiles, Hatus, Alvinho e Henri, obrigada pela presença em minha vida mesmo com a distância. Obrigada por dividirem comigo os momentos de angústia, mas, principalmente, por dividirem infinitos momentos de alegria. Obrigada por sempre estarem me esperando com o melhor abraço do mundo todas as vezes que precisei fugir um pouco da minha realidade. Vocês sabem o quanto são especiais na minha vida. Amo muito vocês.

À empresa TRW/ZF pela grande oportunidade de experiência profissional, acrescentando muito ao meu aprendizado. Obrigada por cada pessoa que convivi neste ambiente, vocês todos foram muito especiais comigo. Agradeço, em especial, a equipe que tive a sorte de conviver e aprender mais de perto por um tempinho: Rogério, Douglas, Samantha, Gustavo, Rodrigo, Reicher. Obrigada por tudo que me transmitiram durante esta experiência.

À empresa Algae Biotecnologia por também ter me permitido uma oportunidade profissional e conhecer outra área tão linda da Biologia, as microalgas. Agradeço, em especial, algumas pessoas em que o contato passou além do aprendizado para se tornarem grandes amigos. Fernando e Naira, obrigada por terem sido os melhores vizinhos; pelas risadas; pelos melhores memes da vida; pelos desabafos; pelo aprendizado; pelos grandes exemplos de pessoas e profissionais; pela amizade e pelo grande carinho que construímos. Raquel e Sabrina, obrigada pelo acolhimento desde o começo; por tornarem-se grandes amigas; por toda experiência que dividiram comigo; por terem sido grandes exemplos de profissionais para eu me espelhar; por viverem comigo meus dilemas e dificuldades; pelas idas ao shopping para fazer compras; por todos os “bacios” que tomamos; pelas terapias de graça; pelas risadas infinitas; pelos conselhos; pelo companheirismo e carinho. Juliano, a maior sintonia que tive em toda a vida, obrigada por tudo que construímos em tão pouco tempo; pela intimidade; pelos

segredos; pelo entendimento só pelo olhar; pelas risadas; pelos shots de vodca semanais; por ouvir os desabafos e choros; pelas conversas e conselhos; por dividir o mesmo estilo de vida e até os mesmos problemas; por todo conhecimento transmitido; por ter sido um grande exemplo para levar por toda a vida; por tanta admiração e carinho. Amo todos vocês e sempre os levarei com muito carinho no coração. Obrigada por tudo que passamos e dividimos nesses meses.

Por fim, meus sinceros agradecimentos às instituições: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Rio Claro. Ao Instituto de Biociências, Departamento de Biologia e aos Laboratórios de Histologia e Mutagênese Ambiental. E à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de estudo concedidas ao longo da minha graduação (Processos nº: 2014/17998-7; 2016/19817-5; 2018/03796-4).

“Ensinou a amar a vida, não desistir de lutar, renascer da derrota, renunciar às palavras e pensamentos negativos. Acreditar nos valores humanos e a ser otimista. Aprendeu que mais vale tentar do que recuar. Antes acreditar que duvidar, o que vale na vida não é o ponto de partida e sim a nossa caminhada.”

Cora Coralina

“O que tem de ser, tem muita força”

Caio Fernando Abreu

RESUMO

A vinhaça é um dos principais resíduos resultantes da transformação da cana-de-açúcar em etanol e, devido ao grande volume gerado, pesquisadores estão buscando uma destinação adequada para esse efluente. Como alternativa para seu reaproveitamento, a fertirrigação na cultura da cana é a mais utilizada. Porém, seu uso crescente como fertilizante tem gerado grande preocupação devido aos efeitos adversos observados. Frente a isso, muitas tecnologias vêm surgindo com o objetivo de tratar a vinhaça e diminuir seu potencial tóxico para o ambiente. Entre as metodologias, encontram-se os Sistemas Construídos de Áreas Alagadas (SCAAs), os quais possuem macrófitas aquáticas responsáveis por acumular poluentes diretamente em seus tecidos e atuar como catalisadores para reações de purificação. Deste modo, estudos que avaliem nos organismos vivos os efeitos da vinhaça tratada por estas tecnologias são necessários e prudentes. Para isso, invertebrados da fauna terrestre, como os diplópodos, estão entre os organismos mais adequados para avaliar os efeitos de substâncias tóxicas no solo. Frente a essa problemática, este trabalho objetivou avaliar a toxicidade da vinhaça após fitorremediação por aguapé em SCAA, por meio de testes histológicos e histoquímicos analisando as possíveis alterações no corpo gorduroso perivisceral de diplópodos da espécie *Rhinocricus padbergi*. O bioensaio foi realizado em triplicata utilizando dois tratamentos: um controle e um com aplicação de vinhaça fitorremediada na concentração máxima recomendada pela CETESB. Foram colocados 20 animais em cada terrário por períodos de 21 e 42 dias de exposição. Após exposição, foram coletados três indivíduos de cada terrário, os quais foram anestesiados, eutanaziados e dissecados para retirada do corpo gorduroso. O material coletado foi fixado, incluído em resina e seccionado em micrótomo para confecção de lâminas para aplicação de técnicas histológica e histoquímicas. Os resultados obtidos pelas análises físico químicas da vinhaça de cana-de-açúcar fitorremediada evidenciaram que as características típicas da vinhaça foram modificadas, porém foi mantido seu potencial fertilizante. Os dados da análise histológica do corpo gorduroso evidenciaram que ocorreu, em ambos os tempos de exposição, um pequeno aumento na quantidade de esferocristais, assim como de enócitos quando comparado com o tratamento

controle. No maior período de exposição, algumas regiões apresentaram perda de limite celular e degradação citoplasmática. Em relação aos resultados da análise histoquímica, poucas alterações foram observadas. Dessa maneira, já que os mecanismos de desintoxicação apresentados pelos diplópodos foram parcialmente eficientes e os danos observados foram pequenos, o tratamento da vinhaça por meio do uso de Sistemas Construídos de Áreas Alagadas merece mais atenção e pesquisas. É necessário buscar maiores resultados e possíveis melhoramentos no tratamento, uma vez que esta alternativa apresentou bons indicativos iniciais como possibilidade de tratamento deste efluente.

Palavras-chave: toxicidade do solo; fitorremediação; efluente; histologia; histoquímica.

ABSTRACT

Vinasse is one of the main residues resulting from the transformation of sugar cane into ethanol and, due to the large volume generated, researchers are seeking a suitable destination for this effluent. As an alternative to its reutilization, the fertigation in cane culture is the most used. However, its increasing use as fertilizer has generated great concern due to the adverse effects observed. With this in view, many technologies have come up with the aim of treating the vinasse and reducing its toxic potential to the environment. Among the methodologies are the Algae Area Constructed Systems (AACs), which have aquatic macrophytes responsible for accumulating pollutants directly in their tissues and act as catalysts for purification reactions. Thus, studies assessing the treated vinasse effects by these technologies on living organisms are necessary and prudent. For this, terrestrial fauna invertebrates, such as diplopods, are one of the most appropriate organisms to evaluate the toxic effects of substances on the soil. In view of this problem, this work aimed to evaluate the vinasse toxicity after phytoremediation by water hyacinth in AACs, by means of histological and histochemical tests, analyzing the possible changes in the diplopods perivisceral fat body of the species *Rhinocricus padbergi*. The bioassay was performed in triplicate using two treatments: one control and one with application of phytoremediated vinasse at the maximum concentration recommended by CETESB. Twenty animals were placed in each terrarium for periods of 21 and 42 days of exposure. After exposure, three individuals from each terrarium were collected, euthanized and dissected for fat body removal. The material collected was fixed, embedded in resin and cut into a microtome for the preparation of slides for the application of histological and histochemical techniques. The results obtained by the phytoremediated vinasse physical chemical analysis showed that the typical characteristics of the vinasse were modified, but its fertilizer potential was maintained. Data from the fat body histological analysis showed that, at both exposure times, there was a small increase in spherocrystals numbers, as well as in enocit cells when compared to the control treatment. In the longer exposure period, some regions showed cell boundary loss and cytoplasmic degradation. Regarding the results of the histochemical analysis, few alterations were observed. Thus, since the

detoxification mechanisms presented by the diplopods were partially efficient and the damages observed were small, the treatment of vinasse through the use of Algae Area Constructed Systems deserves more attention and research. It is necessary to seek greater results and possible improvements in the treatment, since this alternative presented good initial indications as a possibility of treatment of this effluent.

Keywords: soil toxicity; phytoremediation; effluent; histology; histochemistry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Classe Diplopoda.....	16
2.2 Diplópodos como bioindicadores.....	19
2.3 Corpo gorduroso de diplópodos.....	21
2.4 Tratamento da vinhaça e Sistemas Construídos de Áreas Alagadas.....	22
3. OBJETIVOS.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Materiais.....	26
4.2 Métodos.....	27
4.2.1 Bioensaios com o diplópodo <i>R. padbergi</i>	27
4.2.2 Histologia.....	28
4.2.3 Histoquímica.....	28
5. RESULTADOS.....	29
5.1 Análises físico-químicas da vinhaça.....	29
5.2 Análises histológicas.....	30
5.3 Análises histoquímicas.....	30
6. DISCUSSÃO.....	30
7. CONCLUSÃO.....	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

O Brasil encontra-se como um dos maiores exportadores de recursos agrícolas do mundo. As monoculturas exercidas pelo país ocupam grandes áreas de terra, fazem uso excessivo de agrotóxicos e pesticidas e, como resultado, produzem grande quantidade de resíduos que podem conter substâncias poluidoras (RIBEIRO et al., 2007; ROSA et al., 2011). Assim, o agronegócio tem sido um dos setores da economia que mais causam impacto no meio ambiente, resultando em uma atenção voltada à minimização ou reuso desses resíduos gerados (ROSA et al., 2011).

Contribuindo para esta situação atual, o Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL), criado em 1975 estimulado pela crise do petróleo, incentivou a produção em grande escala de etanol produzido a partir de cana-de-açúcar. A iniciativa é considerada, atualmente, a mais importante e bem sucedida em relação a um programa de combustível comercial renovável já implantado no mundo. Esse sucesso é evidenciado pela produção brasileira de álcool, a qual passou de 555 milhões de litros em 1975-76 para mais de 27 bilhões de litros na safra de 2017-18 (UNICA, 2018).

Frente a esse cenário, o Brasil tornou-se o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e ocupa o segundo lugar em relação à produção de etanol, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (UNICA, 2018). Entretanto, juntamente com a elevada produção de cana-de-açúcar e de etanol, os resíduos gerados pela agroindústria sucroalcooleira, como a vinhaça, também aumentaram, sendo que para cada litro de etanol produzido, cerca de 10 a 14L de vinhaça são gerados (FONTANETTI; BUENO, 2017; CRISTOFOLETTI et al., 2013a).

A vinhaça consiste em um subproduto que é obtido através de diferentes matérias-primas, como a cana-de-açúcar, a laranja, o milho, a beterraba, entre outros (CRISTOFOLETTI et al., 2013a), podendo apresentar diferentes propriedades de acordo com a matéria prima que a produz. Apesar das possíveis diferenças, em geral, o principal componente da vinhaça é matéria orgânica na forma de ácidos orgânicos e cátions, como potássio, cálcio e magnésio (LAIME et al., 2011).

Além disso, a vinhaça apresenta, geralmente, uma cor escura, um pH

ácido (3,5 - 5,0) e uma alta demanda química de oxigênio (DQO). É, ainda, caracterizado como um efluente composto basicamente de água (93%) e de sólidos orgânicos e minerais (7%), de alto poder poluente e alto valor fertilizante e considerado altamente nocivo à flora, fauna, microflora e microfauna das águas doces, além de afugentar a fauna marinha (RAMALHO; SOBRINHO, 2001; FREIRE; CORTEZ, 2000; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011; LAIME et al., 2011).

Diversos estudos têm evidenciado a toxicidade da vinhaça. Pedro-Escher et al. (2014, 2016) analisaram a vinhaça de cana-de-açúcar em diferentes concentrações (12,5, 25 e 50%) utilizando como organismos teste, os vegetais *Allium cepa* e *Tradescantia pallida* e os resultados evidenciaram a genotoxicidade do efluente. De acordo com Garcia et al. (2017), até mesmo baixas concentrações de vinhaça (2,5 e 5%) podem ser genotóxicas. Alterações histopatológicas em fígado e brânquias de peixes e intestino médio de diplópodos foram observados por Marinho et al. (2014), Correia et al. (2017b) e Christofolletti et al. (2013b), respectivamente. Coelho et al. (2017) também observaram alterações na imunomarcagem de proteína de estresse HSP70 no intestino médio de diplópodos expostos à vinhaça.

Frente à elevada produção de vinhaça e de seus possíveis danos à natureza, pesquisadores estão preocupados e empenhados em encontrar um destino adequado e formas de tratamento eficazes para este efluente. Dentre as possibilidades propostas para o seu destino encontram-se: fertirrigação, alternativa mais utilizada; reciclagem de vinhaça por fermentação; produção de leveduras; concentração por evaporação; formação de biogás; matéria-prima para produção de ração animal, entre outras (LAIME et al., 2011; CHRISTOFOLETTI et al., 2013a).

Em relação ao tratamento da vinhaça, Botelho et al. (2012) apontam que esse efluente pode ser tratado por processos físico-químicos e/ou biológicos, podendo reduzir a toxicidade pela degradação de substâncias orgânicas.

Enquanto o tratamento por processos físico-químicos envolve reagentes capazes de oxidar compostos orgânicos, os tratamentos biológicos utilizam-se de técnicas empregando plantas e micro-organismos (aeróbios e anaeróbios) (MOHANA et al., 2009), como ocorre nos Sistemas Construídos

de Áreas Alagadas (SCAAs). Esses sistemas são construídos com macrófitas aquáticas que acumulam poluentes em seus tecidos e, ainda, atuam como catalisadores para reações de purificação (JENSSEN et al., 1993; LAUTENSCHLAGER, 2001), através de um processo de interação entre as plantas aquáticas e micro-organismos (COLLETTI, 2008).

Frente à problemática do destino da vinhaça e as diversas alternativas pesquisadas para solucionar tal impasse, estudos com o intuito de avaliar a eficácia das metodologias de descontaminação da vinhaça, como os SCAAs, são de extrema importância, uma vez que elas podem resultar em menos impacto para o meio ambiente. Para isso, diferentes organismos são atualmente utilizados como bioindicadores (KAMMENGA et al., 2000).

Os diplópodos são animais que podem ser utilizados como bioindicadores de poluição no solo, uma vez que estão em contato direto com ele (SOUZA et al., 2014). Nestes invertebrados, alterações morfológicas no intestino médio e no corpo gorduroso são utilizadas como biomarcadores no estudo da toxicidade de compostos químicos específicos e misturas complexas (FONTANETTI et al., 2010a).

Desse modo, frente à problemática da vinhaça e à procura de alternativas para o destino deste efluente, este estudo teve como objetivo analisar o potencial tóxico de uma vinhaça de cana-de-açúcar fitorremediada por aguapé, utilizando como biomarcador, análise histopatológica no corpo gorduroso perivisceral de diplópodos *Rhinocricus padbergi*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Classe Diplopoda

Diversos organismos têm como habitat o solo, no qual estão em constante interação e, assim, suas atividades possuem grande influência nas propriedades físicas e químicas do solo (THEENHAUS et al., 1996).

A macrofauna saprófaga é um grupo representado por diversos invertebrados, os quais diferem em termos tanto morfológicos, como comportamentais. Inclui minhocas, diplópodos e outros invertebrados com diâmetro corporal superior a 2 mm, com habilidade de cavar e criar estruturas

que permitem a sua movimentação e sobrevivência no solo, além de depositarem suas fezes resultantes de suas atividades alimentares. Assim, esses animais possuem efeitos diretos na ciclagem biogeoquímica do solo, promovendo um aumento na disponibilidade de recursos para os microrganismos e a transferência de partículas profundas no solo. Por fim, a macrofauna saprófaga possui ação sobre o arranjo físico das partículas do solo, alterando a distribuição de tamanho de poros, e conseqüentemente, dos padrões de infiltração e de emissão de gases (STRIGANOVÁ, 1995; BEARE et al., 1995).

Os diplópodos são conhecidos popularmente, no Brasil, como gongolos, embuás ou piolhos-de-cobra e formam um importante segmento da macrofauna saprófaga (KIME et al., 1984; DANGERFIELD et al., 1991, 1992). Eles habitam todo o mundo, especialmente os trópicos, mas as faunas melhores conhecidas são as da América do Norte e da Europa (RUPPERT; BARNES, 2005). Juntamente com as minhocas, eles contribuem para a decomposição da matéria orgânica do solo. Além disso, as fezes desses animais intensificam a ação microbiana de mineralização (HOPKIN et al., 1992), assim como sua motilidade tanto superficial, como subterrânea, influencia a natureza física do solo, alterando características como porosidade, umidade e transporte de substâncias (DANGERFIELD et al., 1991).

A classe Diplopoda é extremamente diversa e antiga, com mais de 12.000 espécies descritas, porém com uma diversidade estimada de aproximadamente 80.000 espécies (HOFFMAN et al., 2002; GOLOVATCH et al., 2009). Assim, o número de espécies conhecidas está muito aquém das estimativas de diversidade. Os diplópodos se distinguem das outras três classes de Myriapoda (Chilopoda, Symphyla e Pauropoda) pelo fato de apresentarem dois pares de pernas por segmentos. São classificados em cinco tipos ecomorfológicos dependendo, principalmente, do tipo de habitat que exploram: casca de árvores, rolares, escavadores, em forma de cunha e perfuradores (CORREIA; DE AQUINO, 2005).

O corpo desses animais pode ser dividido em três partes: (1) a cabeça, na qual se encontram o aparelho bucal e estruturas sensoriais como antenas e olhos, sendo que a cápsula cefálica é, em geral, extremamente

calcificada; (2) o tronco, o qual é geralmente longo, cilíndrico, formado por vários anéis que portam dois pares de pernas e, na face ventral, encontram-se estruturas especializadas na transferência de esperma (gonopódios); (3) o telson, que consiste em um anel pré-anal (CORREIA; DE AQUINO, 2005).

Em relação à locomoção, esses animais, em geral, rastejam lentamente sobre o solo, entretanto, apesar do andar lento, seu modo de locomoção é adaptado para exercer uma grande força de empurrão, permitindo que o animal se locomova efetivamente através do húmus, das folhas e da terra solta. Para compensar a falta de velocidade, os diplópodos possuem diferentes meios de proteção, como o exoesqueleto calcário, que fornece proteção para os lados superior e lateral do corpo, e/ou a capacidade de se proteger enrolando o tronco em uma espiral ou esfera quando em repouso ou perturbados. Glândulas de defesa, encontradas na região lateral do corpo, também são utilizadas como uma forma de proteção (RUPPERT; BARNES, 2005).

Embora não haja notícias de casos de envenenamento fatal em humanos devido ao contato com as substâncias de defesa excretadas por diplópodos, tais secreções podem resultar em lesões e necrose em áreas do corpo com pele mais sensível e, se em contato com os olhos, pode ocasionar até mesmo cegueira (CORREIA; DE AQUINO, 2005).

A maioria dos piolhos-de-cobra é herbívora, alimentando-se principalmente de vegetação em decomposição (RUPPERT; BARNES, 2005). O trato digestório é constituído de um tubo reto que vai da boca até o ânus, com um longo intestino médio, o qual é separado do intestino posterior (reto) por uma constrição. A digestão ocorre no intestino médio, no qual as enzimas são secretadas pelas células do epitélio, ou são derivadas de microorganismos associados ou ingeridos acidentalmente (CORREIA; DE AQUINO, 2005; FONTANETTI et al., 2015).

Esses animais apresentam hábitos predominantemente noturnos, evitando exposição ao sol e ao calor, exceto em condições que necessitam migrar para lugares alternativos para sobrevivência. São típicos de locais úmidos e com grande disponibilidade de material orgânico, sendo, em geral, encontrados em lugares sombrios de matas, sob folhas caídas, cascas e troncos apodrecidos. Muitos habitam galerias deixadas por outros animais e

ainda há aqueles que podem ser considerados como uma fauna sinantrópica, ou seja, que vivem na dependência direta do homem, habitando hortas, quintais, pomares, estufas e até mesmo nas próprias casas, onde se alimentam de detritos do lixo doméstico (SCHUBART, 1947; FONTANETTI et al., 2010b).

Devido à biologia que esse animal apresenta, assim como seu modo de vida, o impacto dos diplópodos nos processos do solo é variável em função das características das espécies e até mesmo do próprio solo. Através da sua alimentação e produção de fezes, esses invertebrados são capazes de produzir uma estrutura importante em muitos tipos de solo (HOLE, 1981); além disso, através da sua atividade fragmentadora da serrapilheira, esses animais estimulam a atividade microbiana e influenciam indiretamente o fluxo de nutrientes (ANDERSON et al., 1985). Entretanto, relatos sobre infestações e danos causados por milípedes têm ocorrido em diferentes partes do mundo (UMEH et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2002; INYANG; NDON, 2003; FONTANETTI et al., 2010b).

2.2. Diplópodos como bioindicadores

Com o objetivo de avaliar a poluição de ambientes aquáticos e terrestres, assim como as possíveis consequências para os organismos que habitam estes ecossistemas, ecotoxicologistas estabeleceram bioindicadores e biomarcadores capazes de fornecer informações dos efeitos adversos causados por substâncias tóxicas em invertebrados e vertebrados (KAMMENGA et al., 2000).

Bioindicadores são espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas cuja presença, abundância e condições biológicas, tanto em ecossistemas reais, como através do uso em testes toxicológicos em laboratório, fazem inferência sobre a qualidade do ambiente. Assim, o uso de organismos bioindicadores em programas de monitoramento pode auxiliar a detectar mudanças ambientais em estágios iniciais, assim como pode ser útil também na avaliação da eficácia de medidas tomadas para melhorar a qualidade ambiental (VAN STRAALLEN, 1998; SOUZA et al., 2014).

Há um crescente interesse pelo uso de bioindicadores para a

avaliação dos efeitos causados por substâncias químicas no solo, sendo que invertebrados terrestres têm sido utilizados por pesquisadores para analisar a exposição e os efeitos de poluentes no meio ambiente, uma vez que eles possuem um importante papel na dinâmica do solo, representam seu principal grupo de organismo e estão em contato direto com ele (KAMMENGA et al., 2000).

Dentre os invertebrados, os artrópodes da fauna terrestre de hábitos saprófagos, como os diplópodos, estão entre os organismos mais adequados para estudos que avaliem os efeitos da acumulação de substâncias tóxicas presentes no solo, uma vez que esses animais possuem contato direto com os contaminantes ali presentes (FONTANETTI et al., 2011).

O grupo dos diplópodos tem chamado atenção para as pesquisas de ecotoxicologia nos últimos 20 anos devido a várias razões: eles são componentes da fauna edáfica; estão continuamente expostos a contaminantes do solo; possuem alta eficiência de acumular metais em seus tecidos; há um grande número de representantes distribuídos em todo o mundo; a maioria das espécies de diplópodos são relativamente grandes e, assim, de fácil manuseio; podem ser utilizados tanto em experimentos realizados em condições laboratoriais quanto em condições de campo para o biomonitoramento; e os efeitos biológicos dos contaminantes ambientais podem ser avaliados em vários níveis de organização biológica (SOUZA et al., 2014).

Frente a este cenário, diferentes estudos voltados para a toxicologia ambiental têm sido realizados com esses animais. Coelho et al. (2017) avaliou o potencial tóxico da vinhaça de cana-de-açúcar e de um biossólido por meio de análises de imunomarcagem da proteína de estresse HSP70 no intestino médio dos diplópodos. Seus resultados evidenciaram um aumento significativo na imunomarcagem dessas proteínas em resposta a ambos os resíduos, sendo que a imunomarcagem foi maior naqueles animais expostos à vinhaça em comparação àqueles expostos ao biossólido. Souza et al. (2012) realizaram um estudo utilizando espécimes de diplópodos como organismo teste a fim de avaliar a toxicidade de lodo de esgoto. A análise morfológica do corpo gorduroso desses animais evidenciou alterações para todos os períodos de exposição estudados, sugerindo que esta substância

pode ter agentes tóxicos responsáveis pelos resultados obtidos. As alterações morfológicas no corpo gorduroso também foram utilizadas como biomarcadores por Souza et al. (2011) e Francisco et al. (2015) para a análise da toxicidade de solo industrial contaminado e de bio sólido, respectivamente.

Assim, através do uso de diplópodos como bioindicadores, as alterações morfológicas no corpo gorduroso e no intestino médio desses animais são utilizadas como biomarcadores para a investigação da toxicidade de diferentes substâncias, uma vez que tais órgãos são capazes de metabolizar e/ou acumular vários tipos de metais. Frente a isso, a análise morfológica se tornou uma ferramenta amplamente utilizada em estudos com invertebrados, objetivando analisar danos resultantes de substâncias tóxicas (KÖHLER et al., 1995; HOPKIN et al., 1985; FONTANETTI et al., 2010a).

2.3. Corpo gorduroso de diplópodos

O corpo gorduroso é caracterizado por ser um órgão difuso, o qual preenche toda a cavidade corpórea dos diplópodos. Ele é responsável, primariamente, pelo armazenamento de glicogênio, lipídios, proteínas e ácido úrico. Além disso, o corpo gorduroso apresenta a função de estocar resíduos que serão posteriormente excretados (HOPKIN et al., 1992). Outra característica do órgão, segundo Hubert (1979), é que suas células apresentam uma variedade de grânulos contendo metais ou urato de potássio.

Este órgão, em diplópodos, é diferenciado em duas porções: parietal e perivisceral. O primeiro recobre internamente todo o corpo do animal e encontra-se firmemente aderido ao seu tegumento, enquanto o perivisceral preenche as cavidades do corpo e envolve vários órgãos, como por exemplo, o trato digestório e as gônadas (FONTANETTI et al., 2004).

Em geral, o corpo gorduroso de *R. padbergi* tem uma aparência esbranquiçada, sendo que os principais tipos celulares que constituem esse órgão de diplópodos são os adipócitos ou trofócitos e enócitos (CAMARGO-MATHIAS et al., 2000; FONTANETTI et al., 2004).

Os trofócitos estão dispostos em fileiras e apresentam como

característica núcleo esférico e citoplasma heterogêneo, com grande quantidade de grânulos, alguns na forma de esferas organizadas em camadas concêntricas. Estas estruturas são semelhantes à esferocritais e apresentam como função o acúmulo de metais em excesso, com o objetivo de manter a homeostase do organismo (FONTANETTI et al., 2006). Além disso, os trofócitos são células atingidas por um grande número de traqueíolas, o que sugere uma alta atividade metabólica (FONTANETTI et al., 2004).

Os enócitos são células menores que se encontram associadas aos trofócitos e possuem citoplasma repleto de grânulos (FONTANETTI et al., 2004). Segundo Camargo-Mathias et al. (2000), em *R. padbergi*, os enócitos parecem estar envolvidos mais na síntese e armazenamento de proteínas do que de lipídios.

Estudos que buscam avaliar danos resultantes de substâncias tóxicas em invertebrados terrestres têm utilizado, preferencialmente, órgãos que estão relacionados com a absorção e assimilação de nutrientes essenciais, como lipídios, carboidratos e proteínas (PIGINO, 2005). Assim, o corpo gorduroso é um órgão com potencial para ser utilizado em estudos de toxicidade. Entretanto, em um estudo realizado por Souza et al. (2012), o qual avaliou os efeitos de lodo de esgoto, utilizando a análise de alterações morfológicas no corpo gorduroso parietal e perivisceral de *R. padbergi*, os autores concluíram que apenas o corpo gorduroso perivisceral pode ser utilizado como órgão alvo em estudos de toxicidade, uma vez que a porção parietal do órgão não apresentou alterações morfológicas após a exposição dos animais ao contaminante.

2.4. Tratamento da vinhaça e Sistemas Construídos de Áreas Alagadas

O destino inadequado de resíduos líquidos, principalmente efluentes resultantes de processos industriais e o esgoto doméstico, tem ocasionado sérios problemas ambientais. Aproximadamente 70.000 compostos químicos estão presentes no mercado e 500 a 1000 substâncias são produzidas anualmente. De alguma maneira, tais compostos são descartados como

efluentes domésticos ou industriais, sendo responsáveis pela contaminação de corpos hídricos (EPA, 2017).

Dentre os resíduos produzidos que necessitam de um destino adequado encontra-se a vinhaça, um subproduto que é obtido através de diferentes matérias-primas, como a cana-de-açúcar, a laranja, o milho, a beterraba, entre outros (CHRISTOFOLETTI et al., 2013a). Durante anos seu descarte nos rios foi permitido, resultando em uma grande poluição do ambiente.

Entretanto, devido à legislações mais rigorosas, alternativas têm surgido para o despejo desse efluente. Dentre tais alternativas, a mais utilizada tem sido a fertirrigação, uma vez que o uso dessa substância como fertilizante em quantidades racionais apresenta efeitos amplamente positivos para a produtividade agrícola (CHRISTOFOLETTI et al., 2013a; CABELLO et al., 2009); porém, sua aplicação tem sido contestada pelos seus efeitos adversos no solo e nas águas subterrâneas e, conseqüentemente, para a biota presente nestes ambientes (SILVA et al., 2007).

Frente a este cenário e pelo fato da vinhaça encontrar-se entre os resíduos industriais de maior potencial poluidor devido ao seu baixo pH e sua elevada DQO (DAMIANO, 2005), o tratamento desse efluente tem sido estudado por diversos pesquisadores como uma alternativa para redução dos danos ao ambiente.

Botelho et al. (2012) apontam que esse efluente pode ser tratado por processos físico-químicos e/ou biológicos, podendo reduzir a toxicidade pela degradação de substâncias orgânicas. Enquanto o tratamento por processos físico-químicos envolve reagentes capazes de oxidar compostos orgânicos, os tratamentos biológicos utilizam-se de técnicas empregando plantas e micro-organismos (aeróbios e anaeróbios) (MOHANA et al., 2009).

Alguns dos processos físico-químicos passíveis de serem empregados para o tratamento da vinhaça são adsorção, oxidação, coagulação-floculação e filtração por membranas (MOHANA et al., 2009). Entretanto, pelo fato dos processos biológicos constituírem uma tecnologia consolidada de tratamento de efluentes, eles são os mais aplicados em pesquisas que estudam o tratamento da vinhaça. A aplicação desse tratamento busca, principalmente, transformar partículas biodegradáveis em produtos simples; incorporar

sólidos coloidais na forma de biofilme ou de flocos; transformar nutrientes e remover constituintes orgânicos específicos do resíduo (METCALF et al., 2003).

O tratamento da vinhaça por micro-organismos aeróbios tem sido realizado, principalmente após o tratamento anaeróbio, com o objetivo de reduzir a concentração da matéria orgânica (DBO e DQO) e cor. Dentre esses sistemas aeróbios empregados para o tratamento desse efluente destacam-se as “wetlands” ou Sistemas Construídos de Áreas Alagadas (SCAA) (MOHANA et al., 2009). O uso desse sistema para o tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar já foi apresentado como uma alternativa viável por Olgúin et al. (2008).

O termo áreas alagáveis ou “wetlands” é utilizado para referir-se a vários ecossistemas naturais, os quais ficam parcialmente ou totalmente inundados durante o ano. Tais locais possuem importantes funções dentro dos ecossistemas que estão inseridos, uma vez que são capazes de regularizar os fluxos de água; de modificar e controlar a qualidade das águas; de controlar a erosão, evitando assoreamento dos rios; e são importantes para reprodução e alimentação da fauna aquática e para proteção da biodiversidade, funcionando como área de refúgio da fauna terrestre (SALATTI et al., 2003).

Devido à proibição do uso destas áreas para propósitos aplicados, diversos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de simulá-las (HAMMER, 1989). Assim, os Sistemas Construídos de Áreas Alagadas compreendem estratégias que visam simular ecossistemas naturais com tais características, utilizando os princípios básicos de controle e modificação da qualidade da água que essas áreas naturais apresentam (WOLVERTON, 1989).

Esses sistemas envolvem processos bióticos e abióticos para exercerem sua função de remoção dos poluentes de um determinado resíduo. O primeiro envolve a ação de micro-organismos e plantas. Os micro-organismos crescem aderidos à parte sólida do substrato ou na raiz e colo das plantas e mineralizam o material orgânico presente no resíduo, transformando os compostos químicos; as plantas são responsáveis por absorver nutrientes presentes no meio. Já os processos abióticos incluem a

sedimentação, precipitação química e adsorção de íons no substrato do sistema (LIN et al., 2005). Dessa forma, as plantas e os micro-organismos presentes nesses sistemas são os principais responsáveis pela degradação de poluentes do efluente (DORNELAS, 2008).

Esses sistemas são constituídos por um leito, por um material filtrante e por macrófitas. O leito pode ser feito de fibra, plástico, alvenaria ou até mesmo escavado na terra, impermeabilizado para não ocorrer infiltração; o material filtrante preenche o leito, no qual o efluente irá percolar; as macrófitas são plantadas entre eles de modo a fixarem suas raízes que se estenderão até o fundo do leito (SEZERINO, 2006). Assim, fatores como temperatura, radiação solar, vento, efluente, precipitação, formação do solo e espécie de planta utilizada são levados em consideração para construção de um sistema de área alagada (LAUTENSCHLAGER, 2001).

Como mencionado, as macrófitas possuem grande importância nos sistemas construídos de áreas alagadas, uma vez que elas possuem diversas funções, como: facilitar a transferência de gases do sistema; estabilizar a superfície do leito através da formação de um denso sistema radicular; absorver micro e macronutrientes; atuar como isolante térmico; impedir a exposição direta do sol sobre o leito filtrante; controlar a velocidade do vento e do escoamento do efluente; aumentar a taxa de sedimentação, servir de suporte para a adesão de micro-organismos; e proporcionar habitat para a vida selvagem (TANNER, 2001; ANDRADE, 2012).

Entretanto, uma grande variedade de macrófitas pode ser utilizada para o tratamento, sendo necessário considerar quais plantas apresentam tolerância às condições de alagamento contínuo, tolerância a altas concentrações de poluentes presentes no resíduo (DAVIS, 1995) e considerar o clima original onde é encontrada naturalmente para sua melhor adaptação e crescimento (SEZERINO, 2006). Os sistemas de purificação de água utilizando aguapé, por exemplo, estão suficientemente desenvolvidos para serem utilizados em regiões tropicais e subtropicais (SALATTI et al., 2003).

Comparado com sistemas convencionais de tratamentos, os sistemas construídos de áreas alagadas apresentam vantagens devido ao seu baixo custo de instalação e operação; fácil manutenção; aparência estética quando

cultivado com plantas ornamentais; e capacidade de tolerar variações hidráulicas e de carga (CEVE, 2015). Assim, os dados da literatura sugerem que este é um sistema que deve ser estudado e empregado para o tratamento de diferentes efluentes, dentre eles, a vinhaça.

3. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi verificar a eficácia da fitorremediação de vinhaça realizada por aguapé em um SCAA, na tentativa de disponibilizar um resíduo ambientalmente mais seguro para a fertirrigação. Para o alcance deste objetivo foi testada a toxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar fitorremediada por aguapé em SCAA, por meio da exposição de espécimens de diplópodos *R. padbergi* em solo contendo vinhaça fitorremediada por 15 dias em concentrações de campo realistas.

A toxicidade foi testada por meio de análise histológica e histoquímica do corpo gorduroso perivisceral desses animais a fim de verificar possíveis alterações morfológicas e fisiológicas.

Foi objetivo também relacionar os dados obtidos na análise físico-química da vinhaça fitorremediada a fim de melhor compreender os resultados encontrados, buscando verificar a eficácia do tratamento empregado na fitorremediação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Foram utilizados os seguintes materiais:

- Vinhaça fitorremediada por 15 dias, obtido pela Profa. Ana Claudia de Castro Marcato, membro do mesmo grupo de pesquisa e responsável pela idealização do projeto de fitorremediação da vinhaça por meio do Sistema Construído de Área Alagada (SCAA), financiado pela FAPESP (processo número 2014/23919-2) e com apoio do Projeto Temático FAPESP “Ação de produtos empregados no cultivo da cana-de-açúcar sobre organismos não alvos” (processo número 2012/50197-2), coordenado pela Profa. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti.

- Espécimens adultos de ambos os sexos do diplópodo *R. padbergi*, coletados manualmente no câmpus da UNESP, Rio Claro.
- Solo coletado no câmpus da UNESP Rio Claro, o qual é classificado como latossolo, sendo este o agrupamento mais extenso do estado de São Paulo (OLIVEIRA, 1999).

4.2. Métodos

4.2.1. Bioensaios com o diplópodo *R. padbergi*

Os animais coletados foram previamente aclimatados em laboratório por 15 dias em terrário contendo solo do mesmo local da coleta, com temperatura ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo (ciclo claro/escuro de 12h) controlados.

Para os bioensaios com os diplópodos *R. padbergi*, a dosagem de vinhaça aplicada ao solo foi estabelecida com base na norma da P4.231 da CETESB.

A dosagem máxima de vinhaça a ser aplicada foi determinada pela equação:

$$\text{m}^3 \text{ de vinhaça/ha} = [(0,05 \times \text{CTC} - \text{ks}) \times 3744 + 185] / \text{kvi}$$

Sendo: **0,05** = 5% da CTC do solo. **CTC** = Capacidade de Troca Catiônica, expressa em cmolc/dm^3 ; **ks** = concentração de potássio no solo, expresso em cmolc/dm^3 , à profundidade de 0 a 0,80 metros; **3744** = constante para transformar os resultados da análise de fertilidade, expressos em cmolc/dm^3 ou meq/100cm^3 , para kg de potássio em um volume de 1 (um) hectare por 0,80 metros de profundidade; **185** = massa, em kg, de K_2O extraído pela cultura por hectare, por corte; **kvi** = concentração de potássio na vinhaça, expressa em $\text{kg de K}_2\text{O/m}^3$.

A montagem dos bioensaios foi realizada utilizando dois terrários: um terrário controle, contendo apenas terra do local de coleta dos animais e um terrário contendo terra do local de coleta com vinhaça fitorremediada por 15 dias (100% da dosagem permitida no solo segundo as normas da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo-CETESB).

Após o período de aclimação, foram distribuídos, aleatoriamente, 20

animais em cada terrário, onde ficaram expostos por períodos de 21 e 42 dias. Durante o período de exposição, os animais foram mantidos nas mesmas condições de temperatura e luminosidade da aclimação. O experimento foi realizado em triplicata.

4.2.2. Histologia

Após cada período de exposição, três indivíduos de cada bioensaio foram anestesiados com éter e dissecados para a retirada do corpo gorduroso perivisceral, os quais foram fixados em solução Bouin aquoso. Após a fixação, o material foi colocado em solução tampão fosfato de sódio pH=7,4, durante 24 horas e mantido na geladeira. O material foi desidratado em soluções de etanol 70, 80, 90 e 95%, durante 20 minutos cada banho. Posteriormente, o material foi processado seguindo rotina histológica para inclusão em resina. Os blocos foram cortados com o auxílio de micrótomo; os cortes foram hidratados e recolhidos em lâminas. Após secagem, as lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris por 10 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos para a reação; em seguida, foram coradas com eosina aquosa por 5 minutos e lavadas em água. Após secagem, as lâminas foram montadas com Entellan para posterior análise.

4.2.3. Histoquímica

Após a retirada do corpo gorduroso dos animais, o material foi fixado em diferentes soluções e processado para o desenvolvimento dos seguintes testes histoquímicos:

a. Técnica do Azul de Bromofenol, segundo Pearse (1985) – Detecção de Proteínas Totais: o material foi fixado em solução Bouin por 24 horas; corado pela solução de azul de bromofenol à temperatura ambiente por 2 horas; os cortes foram lavados em água e banhados em ácido acético por 5 minutos.

b. Técnica do PAS (Ácido Periódico de Schiff), segundo Junqueira e Junqueira (1983) – Detecção de Polissacarídeos Neutros: o material foi fixado em solução Bouin por 24 horas; foi realizada a oxidação por 30 minutos em ácido periódico 1%; exposição ao reativo de Schiff por aproximadamente 1 hora no escuro; passagem em água sulfurosa por 9 minutos; lavagem por 30 minutos em água corrente.

c. Método de von Kossa, segundo Junqueira e Junqueira (1983) – Detecção de Cálcio: o material foi fixado em solução Bouin por 24 horas; realizou-se a imersão dos cortes em nitrato de prata por 20 minutos; lavagem em água e transferência dos cortes para hidroquinona; imersão em fixador F-5 por 5 minutos; contracoloração dos núcleos com hematoxilina.

d. Técnica do Azul do Nilo, segundo Junqueira e Junqueira, 1983 – Detecção de Lipídeos Totais: o material foi fixado em formolcálcio; realizou-se a coloração em azul do nilo por 5 minutos à 37°C; lavagem em água; imersão em ácido acético 1% por 1 minuto e montagem das lâminas em glicerina gélida.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização físico-química da vinhaça

Os valores obtidos pelas análises físico-químicas da vinhaça de cana-de-açúcar fitorremediada por 15 dias estão apresentados na tabela 1.

De acordo com os resultados, o pH da amostra apresentou-se levemente básico e altas concentrações de DBO, DQO e potássio foram observadas.

Os metais analisados e os valores permitidos pela legislação estão presentes na tabela 2. Observou-se que os metais mais encontrados, em ordem decrescente, foram bário, arsênio, zinco e níquel, porém apenas o arsênio foi encontrado em concentração maior que a permitida pela legislação.

5.2. Análises histológicas

O corpo gorduroso dos animais expostos ao controle apresentou o padrão descrito para a espécie (Figura 1A) (FONTANETTI et al., 2004). Observou-se que houve, em ambos os tempos de exposição à vinhaça, um pequeno aumento na quantidade de esferocristais (Figura 1B), assim como de enócitos (Figura 1C) quando comparado com o tratamento controle. Além disso, as análises evidenciaram, no maior período de exposição, regiões que apresentaram perda de limite celular e degradação citoplasmática (Figura 1D). A morfologia do núcleo dos trofócitos dos animais expostos à vinhaça não apresentou alteração em nenhum dos períodos estudados (Tabela 3).

5.3. Análises histoquímicas

Nos animais expostos ao controle, os trofócitos apresentaram pequena quantidade de proteínas totais, polissacarídeos neutros, cálcio e lipídios em ambos os períodos de exposição. Os enócitos apresentaram moderada quantidade de polissacarídeos neutros e proteínas totais em ambos os tempos de exposição; pequena quantidade de cálcio e grande quantidade de lipídios foram encontradas em ambos os tempos de exposição (Figura 2 A-C) (Tabela 4).

Nos animais expostos à vinhaça fitorremediada, poucas alterações foram encontradas em relação ao controle. Nos animais expostos à vinhaça por 21 dias foi verificado pequeno aumento na quantidade de polissacarídeos neutros nos enócitos (Figura 2E). Nos animais expostos à vinhaça fitorremediada por 42 dias foi observado pequeno aumento na quantidade de grânulos de proteínas totais no citoplasma dos trofócitos (Figura 2D), bem como na quantidade de lipídios (Figura 2F). Cálcio não sofreu alteração (Tabela 4).

6. DISCUSSÃO

Devido ao hábito de revolver o solo, os diplópodos entram em contato direto com contaminantes presentes neste substrato (HEIKENS et al., 2001) e, por isso, esses animais têm sido utilizados como bioindicadores da poluição

ambiental, buscando a avaliação de risco ao meio ambiente (FONTANETTI et al., 2010a; SOUZA et al., 2014).

Frente aos hábitos que os diplópodos apresentam, estes animais podem ser extremamente influenciados pela presença de metais no solo. Neste sentido, enquanto algumas espécies de milípedes podem reduzir seu número de indivíduos em locais muito contaminados (HOPKIN et al., 1985), outras apresentam estratégias para detoxificar o organismo, metabolizando e/ou acumulando diversos tipos de substâncias e íons de metais, principalmente no intestino médio e corpo gorduroso (KÖHLER et al., 1995).

Assim, frente ao cenário descrito, o uso do corpo gorduroso de *R. padbergi* expostos à vinhaça de cana-de-açúcar fitorremediada por aguapé durante 15 dias permitiu analisar se houve redução no potencial tóxico desta substância, buscando uma alternativa à utilização da vinhaça bruta, a qual possui toxicidade comprovada para diferentes organismos (GARCIA et al., 2017; CORREIA et al., 2017b; COELHO et al., 2017; PEDRO-ESCHER et al., 2016; MARINHO et al., 2014; CHRISTOFOLETTI et al., 2013b).

Independente de sua matéria-prima, o principal constituinte da vinhaça é a matéria orgânica, com predominância de potássio, cálcio e magnésio (RAMALHO, 2001; GIANCHINI; FERRAZ, 2009). Essa composição, entretanto, auxilia no poder poluente apresentado por tal efluente. Seu poder poluente provém, além da presença de matéria orgânica, do seu baixo pH, de sua elevada corrosividade e dos seus altos índices de demanda bioquímica de oxigênio (FREIRE; CORTEZ, 2000; TAVARES, 1998). Somando a estes fatores, pode ocorrer ainda a presença de metais traço, alguns dos quais reconhecidamente tóxicos para diversos tipos de organismos, influenciando, assim, na toxicidade do composto.

Neste sentido, buscando a redução da toxicidade deste efluente para proporcionar um descarte melhor, o tratamento da vinhaça por micro-organismos aeróbios tem sido realizado, principalmente após o tratamento anaeróbio, buscando reduzir a concentração da matéria orgânica (DBO e DQO) e cor. Dentre esses sistemas aeróbios empregados para o tratamento desse efluente destacam-se os Sistemas Construídos de Áreas Alagadas (MOHANA et al., 2009), sendo que o uso desse sistema para o tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar já foi apresentado como uma alternativa viável

(OLGUÍN et al., 2008).

A análise físico-química da vinhaça fitorremediada evidenciou que, quando comparado com as características típicas relacionadas ao poder poluente da vinhaça bruta descritas na literatura (CORREIA et al., 2017a; CORREIA et al., 2017b; COELHO et al., 2017; PEDRO-ESCHER et al., 2016), houve alteração do pH da vinhaça tratada, o qual se apresentou levemente básico. As concentrações de DBO e DQO também foram alteradas, uma vez que foram reduzidas quando comparadas aos dados disponíveis sobre a vinhaça bruta. Porém, a alta concentração de potássio, típica do efluente, manteve-se mesmo após a fitorremediação.

Além disso, a análise da substância evidenciou a presença de metais, dentre os quais merecem destaque o arsênio, o níquel, o zinco e o bário. Até o ano de 2005, a legislação em vigor era mais rigorosa em relação aos valores máximos permitidos para alguns metais, porém, em 2014, a norma foi alterada, permitindo maiores concentrações para o cádmio (de 0,005 mg/L para 2,4 mg/L) e para o níquel (de 0,02 mg/L para 0,007 mg/L). A concentração de arsênio encontrada na vinhaça fitorremediada está acima do permitido pela nova legislação, enquanto que a concentração de níquel está abaixo do permitido pela norma atual, mas acima da permitida pela norma de 2005.

Os resultados obtidos da análise histológica do tecido dos milípedes expostos ao efluente evidenciaram que, em ambos os tempos de exposição, houve um pequeno aumento na quantidade de esferocristais, assim como de enócitos quando comparado com o tratamento controle. Além disso, as análises evidenciaram que na exposição crônica houve regiões que apresentaram perda de limite celular e degradação citoplasmática, resultando em pequenos danos ao corpo gorduroso desses animais.

Tais resultados, juntamente com os dados da caracterização físico-química da vinhaça fitorremediada, evidenciaram que os animais expostos ao efluente apresentaram respostas celulares típicas para minimizar os efeitos provocados pelas substâncias tóxicas que permaneceram na vinhaça após a fitorremediação. Entretanto, os danos no tecido, caracterizados pela perda de limite celular e degradação citoplasmática, foram poucos e observados apenas na exposição crônica.

Nos milípedes, o epitélio do trato digestório é composto por uma

camada de células que estabelece contato direto com o meio externo, garantindo, assim, uma primeira linha de defesa contra uma variedade de substâncias tóxicas (KÖHLER et al., 1995). Os diplópodos também apresentam um eficiente mecanismo de detoxificação no intestino médio para evitar que contaminantes sejam distribuídos por todo o corpo do animal, sendo que, quando os agentes invasores conseguem ultrapassar o tegumento e o trato digestório, o animal se torna exposto a uma gama de mecanismos celulares e humorais influenciando na defesa do hospedeiro. Porém, nem sempre o epitélio intestinal consegue funcionar de maneira eficiente como uma barreira à passagem de determinadas substâncias do lúmen para outros tecidos do corpo (HOPKIN et al., 1985).

Nesse sentido, as alterações morfológicas observadas nas células do corpo gorduroso perivisceral, o qual preenche as cavidades do corpo e envolve diferentes órgãos, como o trato digestório, evidenciaram que, provavelmente, a barreira formada pelo intestino médio não foi suficiente para impedir que as substâncias tóxicas presentes no efluente chegassem a outras regiões do corpo do animal.

Dessa forma, mecanismos de desintoxicação, como o aumento de esferocristais, foram observados. Segundo Köhler (2002), a acumulação intracelular de metais potencialmente tóxicos em formas insolúveis e inativas é um mecanismo efetivo de desintoxicação em invertebrados. Nesse sentido, as células do corpo gorduroso dos diplópodos têm locais para o estoque permanente de substâncias desnecessárias aos animais que são incorporados sob a forma de esferocristais (HOPKIN et al., 1992). Considerando que a função principal do corpo gorduroso nos diplópodos é de armazenamento de lipídios, glicogênio, proteínas, ácido úrico e de produtos excretados, o acúmulo de minerais na forma de esferocristais é um mecanismo importante para a manutenção da homeostase do organismo (FONTANETTI et al., 2006). Deste modo, sugere-se que a vinhaça estudada possuía substâncias desnecessárias para o organismo.

Outro mecanismo de detoxicação observado refere-se ao aumento na quantidade de enócitos, uma vez que estas células também estão envolvidas no processo de desintoxicação do organismo (ROMA et al., 2005; SOUZA et al., 2011).

Os metais presentes na vinhaça fitorremediada provavelmente agiram como substâncias estressoras para as células do corpo gorduroso dos diplópodos. Assim, células submetidas a estresse podem sobreviver ou morrer dependendo do tipo celular, assim como do tipo e intensidade de estresse, além de outros fatores (MEYER; SILVA, 1999).

Como resultado desse estresse, as células podem sofrer necrose, tipo de morte celular na qual ocorre aumento do volume celular, agregação da cromatina, degradação do citoplasma, perda da integridade da membrana celular e, conseqüentemente, ruptura da célula (GRIVICICH, 2007). Como consequência, ocorre a geração de uma resposta inflamatória, a qual pode resultar injúria e até morte das células vizinhas, fazendo com que um grande número de células seja afetado e lesado ao mesmo tempo, além de ocasionar alterações irreversíveis ao tecido e/ou órgão afetado (CURTIN et al., 2002). Porém, diferentemente do encontrado por Souza e Fontanetti (2012) no corpo gorduroso de diplópodos expostos a lodo de esgoto, neste estudo a ocorrência de necrose foi descartada, uma vez que danos aos núcleos, como picnose ou deformação, não foram observados.

Assim, a presença de metais causa preocupação, uma vez que estes são altamente persistentes no solo (MCGRATH, 1987) e podem expressar seu potencial de poluição diretamente nos organismos do solo devido a sua disponibilidade para plantas e transferência para a cadeia alimentar (CHANG et al., 2018).

Segundo Alloway (2013) e Ratnaike (2003), o arsênio, metal encontrado em quantidade maior do que a permitida pela legislação no efluente em estudo é um dos metais traço mais preocupantes do ponto de vista da saúde humana, da agricultura e da ecotoxicologia. Raitnaike (2003) apontou que a ingestão prolongada de água contaminada com arsênio pode resultar em manifestações de toxicidade em praticamente todos os sistemas do corpo humano, sendo ainda mais preocupante o fato de que este metal apresenta um potencial para atuar como cancerígeno.

A toxicidade e a preocupação com o arsênio foi relatada em outros estudos. Além de pesquisas que mostraram esse efeito nocivo para mamíferos, incluindo seres humanos (ABDUL et al., 2015; ALAMOLHODAEI et al., 2015; JOSEPH et al., 2015), o mesmo foi evidenciado para os principais

invertebrados do solo (CROUAU et al., 2006; LEE et al., 2008; LOCK et al., 2002; ROMERO-FREIRE et al., 2015).

Crouau et al. (2006), por exemplo, utilizaram teste de reprodução de Collembola (*Folsomia Candida*) com o objetivo de avaliar a sensibilidade da reprodução destes invertebrados a quatro xenobióticos: cádmio, alumínio, arsênio e um composto orgânico (pentaclorofenol). Os resultados mostraram que o arsênio foi a substância que mais afetou a reprodução desses organismos, apresentando um valor EC20 (concentração que inibe 20% da taxa de reprodução) de 1,25 µg/g, uma concentração bem menor do que àquela encontrada na vinhaça utilizada neste estudo.

Assim, devido à toxicidade já relatada do arsênio e acrescentado o fato de que o principal sítio de absorção deste metal é o intestino (GONZALEZ et al., 1997), a presença deste composto na vinhaça fitorremediada pode ter auxiliado no dano observado no corpo gorduroso daqueles animais que permaneceram mais tempo em contato com o efluente.

Além do arsênio, outro metal presente na vinhaça fitorremediada merece destaque. O níquel presente no efluente está no limiar da quantidade permitida pela legislação mais antiga do estado de São Paulo. Assim, apesar das mudanças realizadas nestes valores e o aumento da concentração permitida pela lei, este metal pode estar relacionado com os danos observados, considerando uma legislação mais preventiva.

Assim como o arsênio, o níquel causa preocupação devido aos seus efeitos nocivos. Além da Organização Mundial da Saúde (OMS) classificar este metal como carcinógeno humano, sua toxicidade foi confirmada para diferentes organismos. O efeito tóxico do níquel é capaz de reduzir a atividade fotossintética e de crescimento de algas; taxa de crescimento de bactérias marinhas; metabolismo de bactérias no solo; esporulação de fungos (BABICH et al., 1982); assim como outros efeitos adversos em leveduras, plantas, protozoários, moluscos, insetos, crustáceos, anelídeos, equinodermos, peixes, anfíbios, aves e mamíferos (FISHER, 1975; FRANCISCO et al., 2014).

Dessa maneira, apesar do níquel ser um elemento essencial às plantas, animais e micro-organismos, ele é necessário apenas em pequenas quantidades (SIQUEIRA et al., 1994), sendo, então, potencialmente tóxico quando presente em altas quantidades, podendo causar desnaturação de

proteínas, inativação de grupos –SH e bloqueio de sítios de ligação de enzimas (MACÊDO et al., 2008). Com isso, assim como o arsênio, a presença do níquel na vinhaça fitorremediada pode ter auxiliado no dano observado no corpo gorduroso daqueles animais que permaneceram mais tempo em contato com o efluente.

Entretanto, é importante destacar que, considerando o fato de a vinhaça ser uma substância complexa, é difícil afirmar qual dos compostos ou características físicas/químicas foram responsáveis pelos resultados observados. Neste caso, é necessário se atentar à possibilidade de um composto interferir na ação do outro, uma vez que em uma mistura complexa pode haver alterações nos efeitos que cada elemento produziria separadamente. Pode haver efeito aditivo, em que o efeito tóxico final da substância é igual à soma dos efeitos produzidos separadamente dos elementos presentes; efeito sinérgico, em que o efeito final é maior que a soma dos efeitos individuais; pode ocorrer ainda potenciação, com o efeito da substância aumentado por interagir com outro toxicante que, originalmente, não produziria tal efeito tóxico (AZEVEDO et al., 2004).

Os testes histoquímicos evidenciaram um pequeno aumento de polissacarídeos neutros, proteínas totais e lipídios. Enquanto o aumento de polissacarídeo foi observado apenas na exposição de 21 dias, os demais ocorreram somente na exposição de 42 dias.

O acúmulo de polissacarídeo no menor tempo de exposição pode ser explicado pela alta quantidade de compostos orgânicos presentes na vinhaça fitorremediada, assim como foi observado também por Marinho et al. (2014) quando a vinhaça bruta foi estudada utilizando peixe como organismo teste. Assim, considerando que o principal constituinte da vinhaça de cana-de-açúcar é a matéria orgânica e que, apesar de a vinhaça tratada ter a quantidade de tal componente diminuída, os resultados demonstram que a natureza do composto teve a mesma influência da vinhaça bruta no organismo teste. Desta forma, foi observado acúmulo de polissacarídeos no primeiro período de exposição e a manutenção do mesmo no período de exposição mais longo.

Além disso, a exposição prolongada do corpo gorduroso de tais milípedes absorveu compostos presentes no efluente em quantidades maiores

que a necessária para o organismo, aumentando, assim, o acúmulo de proteínas e lipídios.

Assim, frente ao discutido, estudos que busquem alternativas para efluentes que causam grandes impactos ao meio ambiente, como é o caso da vinhaça de cana-de-açúcar, são de extrema importância no cenário atual. Nesse sentido, os resultados obtidos com este estudo alertam para uma alternativa viável, uma vez que os mecanismos de desintoxicação dos diplópodos foram parcialmente eficientes e os danos observados foram pequenos, principalmente quando comparado aos danos causados pelo efluente sem tratamento.

7. CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos com as análises histológicas e histoquímicas do corpo gorduroso de diplópodos, pode-se concluir que esses animais apresentaram mecanismo de desintoxicação quando submetidos ao efluente. Juntamente com o aumento de esferocritais, observou-se aumento de enócitos. Apesar disso, os resultados também evidenciaram que, quando o animal ficou exposto ao efluente por um maior período, pequenos danos ao tecido foram observados, caracterizados pela perda de limite celular e degradação do citoplasma dos trofócitos. A presença de metais como o arsênio e o níquel pode ter contribuído para os resultados obtidos. Entretanto, devido à natureza complexa da vinhaça, não é possível afirmar que apenas um composto seja o responsável pelo resultado obtido. Dessa maneira, os resultados obtidos com este estudo alertam para uma alternativa interessante e viável, já que os mecanismos de desintoxicação apresentados pelos diplópodos foram parcialmente eficientes e os danos observados foram pequenos. Assim, o tratamento da vinhaça através do uso de Sistemas Construídos de Áreas Alagadas mostra-se como uma alternativa viável frente ao problema atual que envolve este efluente. Dessa forma, é extremamente importante um maior número de pesquisas que busquem mais indicativos da diminuição na toxicidade da vinhaça após o tratamento proposto, o que possibilitaria um menor impacto deste efluente no ecossistema.

13. REFERÊNCIAS

ABDUL K. S. M.; JAYASINGHE S. S.; CHANDANA E. P. S.; JAYASUMANA C.; DE SILVA P. M. C. S. Arsenic and human health effects: a review. **Environmental Toxicology Pharmacology**. v. 40, n. 3, p. 828–846, 2015.

ALAMOLHODAEI N. S.; SHIRANI K.; KARIMI G. Arsenic cardiotoxicity: an overview. **Environmental Toxicology Pharmacology**. v. 40, n. 3, p. 1005–1014, 2015.

ALLOWAY, B. J. Sources of heavy metals and metalloids in soils. In: **Heavy metals in soils**. Springer Netherlands, p. 11-50, 2013.

ANDERSON, J. M.; HUIISH, S. A., INESON, P.; LEONARD, M. A.; SPLATT, P. R. Interactions of invertebrates, microorganisms and tree roots in nitrogen and mineral fluxes in deciduous woodland soils. In: FITTER, A. H.; ATKINSON, D.; READ, D. J.; USHER, M. B. (Ed.). **Ecological interactions in soil**. Oxford: Blackwell, p. 377- 392, 1985.

ANDRADE, H. H. B. de. **Avaliação do desempenho de sistemas de zona de raízes (Wetlandd construídas) em escala piloto aplicados ao tratamento de efluente sintético**. Dissertação (Mestre em Engenharia Civil). Programa de Pós Graduação em Engenharia Civil da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Paulo: Rima, 340 p., 2004.

BABICH, H.; STOTZKY, G. Nickel toxicity to microbes: effect of pH and implications for acid rain. **Environmental research**, v. 29, n. 2, p. 335-350, 1982.

BEARE, M. H.; COLEMAN, D. C.; CROSSLEY J. R., D. A.; HENDRIX, P. F.; BOTELHO, R. G.; TORNISIELO, V. L.; de OLINDA, R.A.; MARANHO, L. A.; **Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

CABELLO, P. E.; SCOGNAMIGLIO, F. P.; TERÁN, F. J. C. Tratamento de vinhaça em reator anaeróbio de leito fluidizado. **Engenharia Ambiental**, v. 6, n. 1, p. 321-338, 2009.

CAMARGO-MATHIAS, M.I.; FONTANETTI, C.S. Ultrastructural features of the fat body and oenocytes of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Diplopoda, Spirobolida). **Biocell**, v. 24, n. 1, p. 1-12, 2000.

CEVE, A. **Avaliação de wetland construído de fluxo subsuperficial horizontal para o tratamento de esgoto sanitário**. Trabalho de Conclusão

de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 52 f., 2015.

CHANG, A. C.; HINESLY, T. D.; BATES, T. E.; PONER, H. E.; DOWDY, R. H.; RYAN, J. A. Effects of long-term sludge application on accumulation of trace elements by crops. In: **Land application of sludge**. CRC Press, p. 53-66, 2018.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C. S. Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* assay. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 224, n. 4, p. 1–14, 2013b.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO-ESCHER, J.; CORREIA, J.E.; MARINHO, J.F.U.; FONTANETTI, C.S. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752-2761, 2013a.

COELHO, M. P. M.; MOREIRA-DE-SOUSA, C.; SOUZA, R. B.; ANSOAR-RODRÍGUEZ, Y.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; FONTANETTI, C. S. Toxicity evaluation of vinasse and biosolid samples in diplopod midgut: heat shock protein in situ localization. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 27, p. 1-11, 2017.

COLLETTI, M.P.B. **Sistemas construídos de áreas alagadas: levantamento bibliográfico sobre eficiência de redução das variáveis químicas e físicas da água**. 2008. 76 f. Monografia (Especialista em Sustentabilidade Ambiental), Centro de Estudos Ambientais, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

CORREIA, J. E.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; ANSOAR-RODRÍGUEZ, Y.; GUEDES, T. A.; FONTANETTI, C. S. Comet assay and micronucleus tests on *Oreochromis niloticus* (Perciforme: Cichlidae) exposed to raw sugarcane vinasse and to physicochemical treated vinasse by pH adjustment with lime (CaO). **Chemosphere**, v. 173, p. 494-501, 2017a.

CORREIA, J. E.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; MARCATO, A. C. C.; MARINHO, J. F.U.; FONTANETTI, C. S. Histopathological analysis of tilapia gills (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) exposed to sugarcane vinasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, p. 319-326, 2017b.

CORREIA, M. E. F.; DE AQUINO, A. M. Os diplópodes e suas associações com microrganismos na ciclagem de nutrientes. **Embrapa Agrobiologia. Documentos**, 2005.

CROUAU, Y.; MOIA, C. The relative sensitivity of growth and reproduction in the springtail, *Folsomia candida*, exposed to xenobiotics in the laboratory: an

indicator of soil toxicity. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 64, n. 2, p. 115-121, 2006.

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **Journal of Immunological Methods**. v. 265, p. 49-72, 2002.

DAMIANO, E. S. G. **Tratamento da vinhaça em reator anaeróbio de leito fluidificado**. Dissertação (Mestrado). EESC-USP, São Carlos. 98 p. 2005.

DANGERFIELD, J. M.; TELFORD, S. R. Seasonal activity patterns in julid millipeds in Zimbabwe. **Journal of Tropical Ecology**, New York, v. 7, p. 281-285, 1991.

DANGERFIELD, J. M.; TELFORD, S. R. Species diversity of Julid millipedes: between habitats comparisons within the seasonal tropics. **Pedobiologia**, Jena, v. 36, p. 321-329, 1992.

DAVIS, L.A. Handbook of Constructed Wetlands. A Guide to Creating Wetlands for: Agricultural Wastewater, Domestic Wastewater, Coal Mine Drainage, Stormwater in the Mid-Atlantic Region. **Volume 1: (USEPA Region III with USDA, NRCS, ISBN 0-16-052999-9)**, 1995.

DORNELAS, F. L. **Avaliação do desempenho de Wetland horizontais subsuperficiais como pós-tratamento de efluentes de reatores UASB**. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 115 f., 2008.

EPA (Agência Americana de Proteção Ambiental). Disponível em: <https://www.epa.gov/>. Acesso em 02 de março de 2017.

ESPAÑA-GAMBOA, E.; MINAGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasse: characterization and treatments. **Waste Management and Research**, v.29, p.1235-1250, 2011.

FISHER, F. Preliminary investigation of effects on the environment of boron, indium, nickel, selenium, tin, vanadium and their compounds. **US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1975**.

FONTANETTI, C.S.; BUENO, O. C. (Org.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. 1. ed. Bauru, SP: Canal 6, 2017. v. 1. 275p.

FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; TIRITAN, B. M. S. Mineralized bodies in the fat body of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda).

Brazilian Journal of Morphology Science Iheringia., v. 23, p. 487-493, 2006.

FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; TIRITAN, B. M. S. The fat body in *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda, Spirobolida). **Iheringia, Série Zoologia.**, v. 94, n. 4, p. 351-355, 2004.

FONTANETTI, C. S.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; PINHEIRO, T. G.; SOUZA, T. S.; PEDROESCHER, J. Microscopy as a tool in toxicological evaluations. In: **MÉNDEZ-VILAS, A.; DIAZ, J. (Eds.). Microscopy: Science, Technology, Applications and Education. Badajoz: Formatex Research Center**, p. 1001-1007, 2010a.

FONTANETTI, C.S.; CALLIGARIS, I. B.; SOUZA, T. S. A millipede infestation of an urban area of the city of Campinas, Brazil and preliminary toxicity studies of insecticide Bendiocarb to the *Urostreptus atrobrunneus* Pierozzi & Fontanetti, 2006. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 165-166, 2010b.

FONTANETTI, C. S.; MOREIRA-DE-SOUSA, C.; PINHEIRO, T. G.; SOUZA, R. B.; FRANCISCO, A. Diplopoda-digestive system. In: MINELLI, A. (Ed.) **The Myriapoda**. v. 2 Boston: Brill, 2015. p. 109-127.

FONTANETTI, C.S.; NOGAROL, L. R.; SOUZA, R. B.; PEREZ, D. G.; MAZIVIERO, G. Bioindicators and Biomarkers in the Assessment of Soil Toxicity. In: **Simone Pascucci. (Org.). Soil Contamination. Rijeka, Croácia: InTech**, p. 143-168, 2011.

FRANCISCO, A.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; NETO, N. R.; FONTANETTI, C. S. Histopathological changes in the perivisceral fat body of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda, Spirobolida) triggered by biosolids. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 23, p. 18590-18600, 2015.

FRANCISCO, A.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; FONTANETTI, C.S. Evaluation of allowed parameters for nickel in freshwater bodies using the *Allium cepa* test. **Semina. Ciências Biológicas e da Saúde** (Online), v. 35, p. 49-60, 2014.

FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. A. Vinhaça de cana-de-açúcar. **Agropecuária**, p.203, 2000.

GARCIA, C. F. H.; SOUZA, R. B.; DE SOUZA, C. P.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; FONTANETTI, C. S. Toxicity of two effluents from agricultural activity: Comparing the genotoxicity of sugar cane and orange vinasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p. 216-221, 2017.

GIANCHINI, C. F.; FERRAZ, M. V. Benefícios da utilização de vinhaça em terras de plantio de cana-de-açúcar – Revisão de Literatura. São Paulo: **Revista científica Eletrônica de Agronomia**, n. 15, 2009.

GOLOVATCH; S. I. KIME, D. Millipede (Diplopoda) distributions: a review. **Soil Org.**, v. 81, p. 565–597, 2009.

GONZALEZ, M. J.; AGUILAR, M. V.; MARTINEZ, M. C. Mechanisms of absorption of As_2O_5 from rat small intestine: the effect of different parameters. **Journal of trace elements in medicine and biology**, v. 11, n. 4, p. 239-247, 1997.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA. A.B. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HAMMER, D. A. **Constructed wetlands for wastewater treatment: municipal, industrial and agricultural**. CRC Press, 1989.

HEIKENS, A.; PEIJNENBURG, W. J. G. M.; HENDRIKS, A. J. Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. **Environmental Pollution**, v. 113, n. 3, p. 385-393, 2001.

HOFFMAN R. L., GOLOVATCH S. I., ADIS J, DE MORAIS J. W. Diplopoda. In **Arachnida and Myriapoda**, ed. J Adis, Sofia-Moscow: Pensoft, p. 505-33, 2002.

HOLE, F. D. Effects of animals on soil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 75, p. 75-112, 1981.

HOPKIN, S. P.; READ, H. J. The biology of millipedes. **New York: Oxford University Press**, 223p, 1992.

HOPKIN, S. P.; WATSON, K.; MARTIN, M. H.; MOULD, M. L. The assimilation of heavy metals by *Lithobius variegatus* and *Glomeris marginata* (Chilopoda; Diplopoda). **Bijdr. Dierk.**, v. 55, n. 1, p. 88-94, 1985.

HUBERT, M. Localization and identification of mineral elements and nitrogenous waste in Diplopoda. In: CAMATINI, M. (ed.) **Myriapod Biology**. Academic Press, London, p. 127- 134, 1979.

INYANG, U.E.; NDON, B.A. Millipede outbreaks in Akwa Ibom State, Southeastern Nigeria. **Global Journal of Pure and Applied Sciences**. v. 9, n. 4, p. 435-444, 2003.

JENSSEN, P.D.; KROGSTAD, T.; MAHLUM, T. Potential Use of Constructed Wetland for Wastewater Treatment in Northern Environment. Department of Soil Science, **Agricultural University of Norway**, Norway. N-1432 As, 1993.

JOSEPH, T.; DUBEY, B.; MCBEAN, E. A. Human health risk assessment from arsenic exposures in Bangladesh. **Science of the Total Environment**, v. 527, p. 552-560, 2015.

KAMMENGA, J. E.; DALLINGER, R.; DONKER, M. H.; KÖHLER, H. R.; SIMONSEN, V.; TRIEBSKORN, R.; WEEKS, J. M. Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment. **Environmental Contamination Toxicology**, v. 164, p. 93-147, 2000.

KIME, R. D.; WAUTHY, G. Aspects of relationships between millipedes, soil texture and temperature in deciduous forests. **Pedobiologia**, Jena, v. 26, p. 387-402, 1984.

KÖHLER, Heinz-R. Localization of metals in cells of saprophagous soil arthropods (Isopoda, Diplopoda, Collembola). **Microscopy research and technique**, v. 56, n. 5, p. 393-401, 2002.

KÖHLER, H. R.; KÖRTJE, K. H.; ALBERTI, G. Content, absorption quantities and intracellular storage sites of heavy metals in Diplopoda (Arthropoda). **BioMetals**, v. 8, p. 37-46, 1995.

KÖHLER, H. R.; TRIEBSKORN, R. Assessment of the cytotoxic impact of heavy metals on soil invertebrates using a protocol integrate qualitative and quantitative components. **Biomarkers**, v. 3, n. 2, p. 109-127, 1998.

LAIME, E. M. O.; FERNANDES, D. C. S.; FREIRE, E. A. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. **Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 5, n. 16, 2011.

LAUTENSCHLAGER, S. R. **Modelagem do desempenho de Wetland construídas**. Dissertação (Mestre em Engenharia Hidráulica e sanitária) Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 90 f., 2001.

LEE, B. T.; KIM, K. W. Arsenic accumulation and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida* affected by chloride and phosphate. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 27, n. 12, p. 2488-2495, 2008.

LIN, Y. F.; JING, S. R.; LEE, D. Y.; CHANG, Y. F.; CHEN, Y. M.; SHIH, K. C. Performance of a constructed wetland treating intensive shrimp aquaculture wastewater under high hydraulic loading rate. **Environmental Pollution**, v. 134, n. 3, p. 411-421, 2005.

LOCK, K.; JANSSEN, C. R. Toxicity of arsenate to the compostworm *Eisenia fetida*, the potworm *Enchytraeus albidus* and the springtail *Folsomia candida*. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 68, n. 5, p. 760-765, 2002.

MACÊDO, L. S.; MORRIL, W. B. B. Origem e comportamento dos metais fitotóxicos: revisão da literatura. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 2, n. 2, p. 29-38, 2008.

MACHADO-NETO, L. Acute toxicity of sugarcane vinasse to aquatic organisms before and after pH adjustment. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 94, n. 10, p. 1-11, 2012.

MARINHO, J. F. U.; CORREIA, J. E.; de CASTRO MARCATO, A. C.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C. S. Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 110, p. 239-245, 2014.

MCGRATH, S. P. Long-term studies of metal transfers following application of sewage sludge. **Special publications of the British Ecological Society**, 1987.

METCALF; EDDY, **Wastewater engineering: treatment and reuse**. Boston: McGraw-Hill, p. 1819, 2003.

MEYER, T. N.; DA SILVA, A. L. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 181-188, 1999.

MOHANA, S.; ACHARYA, B. K.; MADAMWAR, D. Distillery spent wash: Treatment Technologies and potential applications. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p. 12-25, 2009.

NASCIMENTO, B.; SERMANN, H.; BÜTTNER, C. Biology and natural control of pest millipedes *Spinotarsus caboverdus* Pierrard (1987) from Cape Verde. In: **Deutscher Tropentag – Challenges to Organic Farming and Sustainable Land Use in the Tropics and Subtropics**, Witzhausen, Alemanha, 2002.

ODUM, E. P. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. **Plant and soil**, v. 170, p. 5-22, 1995.

OLGUÍN, E. J.; SÁNCHEZ-GALVÁN, G.; GONZÁLEZ-PORTELA, R. E.; LÓPEZ-VELA, M. Constructed wetland mesocosms for the treatment of diluted sugarcane molasses stillage from ethanol production using *Pontederia sagittata*. **Water research**, v. 42, n. 14, p. 3659-3666, 2008.

OLIVEIRA, J. B. Solos do Estado de São Paulo: descrição das classes registradas no mapa pedológico. **Campinas: Instituto Agrônomo**, Campinas, 1999. (Boletim Científico, 45).

PEDRO-ESCHER, J.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; ANOAR-RODRÍGUEZ, Y.; FONTANETTI, C. S. Sugarcane vinasse, a residue of ethanol industry: toxic, cytotoxic and genotoxic potential using the *Allium cepa* test. **Journal of Environmental Protection**, v. 7, p. 602–612, 2016.

PEDRO-ESCHER, J.; MAZIVIERO, G. T.; FONTANETTI, C. S. Mutagenic action of sugar cane vinasse in the *Tradescantia Pallida* test system. **Journal of Ecosystem & Ecography**, v. 4, p. 145, 2014.

PIGINO, G.; MIGLIORINI, M.; PACCAGNINI, E.; BERNINI, F.; LEONZIO, C. Fine structure of the midgut and Malpighian papillae in *Campodea* (*Monocampa*) *quilisi* Silvestri, 1932 (Hexapoda, Diplura) with special reference to the metal composition and physiological significance of midgut intracellular electron-dense granules. **Tissue and Cell**, v. 37, n. 3, p. 223-232, 2005.

RAMALHO, J. F. G. P.; SOBRINHO, N. M. B. A. Metais pesados em solos cultivados com cana-de-açúcar pelo uso de resíduos agroindustriais. **Revista Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 120-129, 2001.

RATNAIKE, R. N. Acute and chronic arsenic toxicity. **Postgraduate medical journal**, v. 79, n. 933, p. 391-396, 2003.

RIBEIRO, B.T.; LIMA, J.M.; JULIÃO, L.G.F. Influência da vinhaça na adsorção e dessorção de Cd e Pb em um cambissolo. **XXXI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**, 2007.

ROMA, G. C.; CORREA BUENO, O.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Comparative study of the fat body in some genera of the *Attini* tribe (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 45, n. 2, p. 449-462, 2005.

ROMERO-FREIRE, A.; PEINADO, F. M.; ORTIZ, M. D.; VAN GESTEL, C. A. M. Influence of soil properties on the bioaccumulation and effects of arsenic in the earthworm *Eisenia andrei*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 19, p. 15016-15028, 2015.

ROSA, M. F.; SOUZA FILHO, M. S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; SANTAELLA, S. T.; LEITÃO, R. C. Valorização de resíduos da agroindústria. **II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais-II SIGERA**, v. 15, 2011.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D.; FOX, R. S. **Zoologia dos Invertebrados: Uma Abordagem Funcional-evolutiva**. 7ª ed, Editora Roca LTDA, São Paulo (SP), 2005, 1146p

SALATTI, E.; SALATTI FILHO, E.; SALATTI, E. Utilização de sistemas de wetlands construídas para tratamento de águas. **Biológico, São Paulo**, v. 65, n. 1/2, p. 113-116, 2003.

SCHUBART, O. O elemento "Synanthropo" e estrangeiro entre os Diplopoda do Brasil. **Arthropoda**, v.1, n.1, p.23-40, 1947.

SEZERINO, P. H. **Potencialidade dos filtros plantados com macrófitas (constructed Wetland) no pós-tratamento de lagoas de estabilização sob condições de clima tropical.** Tese (Doutor em Engenharia Ambiental). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 171 f., 2006.

SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola**, v. 11, n. 1, 2007.

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. D. S.; GRISI, B. M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. **Embrapa Arroz e Feijão-Documentos (INFOTECA-E)**, 1994.

SOUZA, R. B.; FONTANETTI, C. S. Alterations in the fat body cells of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda) resulting from exposure to substrate containing sewage sludge. **Microscopy and Microanalysis**, v. 18, n. 02, p. 317-323, 2012.

SOUZA, T. S.; ANGELIS, D. D. F.; FONTANETTI, C. S. Histological and histochemical analysis of the fat body of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda) exposed to contaminated industrial soil. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 221, n. 1-4, p. 235-244, 2011.

SOUZA, T. S.; CHRISTOFOLETTI, C.A.; BOZZATTO, V.; FONTANETTI, C.S. The use of diplopods in soil ecotoxicology - A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 103, p.68-73, 2014.

SOUZA, T. S.; DE ANGELIS, D. F.; FONTANETTI, C. S. Histological and histochemical analysis of the fat body of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda) exposed to contaminated industrial soil. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 221, n. 1-4, p. 235-244, 2011.

STRIGANOVA, B. R. Mutualistic interactions between soil macrofauna and microorganisms. In: EDWARDS, C. A.; ABE, T.; STRIGANOVA, B. R. (Ed.). **Structure and function of soil communities**. Kyoto: Kyoto University Press, 152 p., 1995.

TANNER, C. C. Plants as ecosystem engineers in subsurface-flow treatment wetlands. **Water Science Technology**, v. 44, n. 11-12, p. 9-17, 2001.

TAVARES, V. B.; SIVIERI, K.; CERON, C. R.; SILVA, R.; TRABUCO, E.; LOMBARDI, F. R.; GOMES, E. Utilização do resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Química nova**, v. 21, n. 6, p. 722-725, 1998.

THEENHAUS, A.; SCHEU, S. Successional changes in microbial biomass activity and nutrient status in faecal material of the slug *Arion rufus* (Gastropoda) deposited after feeding on different plant materials. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 28, p. 569-577, 1996.

UNICA - UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Setor Sucroenergético**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/faq/>>. Acesso em: 20 ago. 2018.

VAN STRAALLEN, N. M. Evaluation of bioindicator systems derived from soil arthropod communities. **Applied Soil Ecology**, v. 9, n. 1-3, p. 429–437, 1998.

WOLVERTON, B. C. **Aquatic plant/microbial filters for treating septic tank effluent**. Lewis Publishers, Chelsea, MI, 1989.

Tabela 1 - Características físico-químicas da vinhaça de cana-de-açúcar fitorremediada por 15 dias.

Parâmetros	Vinhaça fitorremediada por 15 dias
Ortofosfato (mg PO ₄ /L)	4,57
Fósforo dissolvido (mg/L)	8,54
Fósforo total (mg/L)	13,94
Nitrato (mg NO ₃ /L)	3,18
Nitrito (mg NO ₂ /L)	0,16
Nitrogênio amoniacal (mg/L)	0,47
Nitrogênio total (mg/L)	21,86
pH	8,00
Sólidos suspensos (mg/L)	218,60
Amônia (mg NH ₃ /L)	32,97
Cálcio (mg/L)	226,00
Enxofre (mg/L)	39,96
Magnésio (mg/L)	158,60
Potássio (mg/L)	1069,00
Sódio (mg/L)	41,76
Sulfato Diluição (mg/L)	<10,00
DBO (mg/L)	657,00
DQO (mg O ₂ /L)	3077,00
Condutividade eletrolítica (µS/L)	3828,00
Dureza calculada (CaCO ₃ /L)	1217,50
DQO/DBO	4,78

DBO: Demanda bioquímica de oxigênio; **DQO:** Demanda química de oxigênio.

Tabela 2 - Análises de metais da vinhaça de cana-de-açúcar fitorremediada por 15 dias

Parâmetros	Vinhaça fitorremediada por 15 dias	VMP 045/2014/E/C/I	VMP 195/2005/E
Arsênio (mg/L)	0,05100	0,0100	0,0100
Bário (mg/L)	0,1930	0,7000	0,7000
Cádmio (mg/L)	<0,0010	2,4000	0,0050
Cobre (mg/L)	<0,0050	0,0050	2,0000
Cromo (mg/L)	0,0140	0,0500	0,0500
Mercúrio (mg/L)	<0,0002	0,0010	0,0010
Molibdenio (mg/L)	<0,0050	0,0300	0,0700
Níquel (mg/L)	0,0200	0,0700	0,0200
Chumbo (mg/L)	<0,0050	0,0100	0,0100
Selênio (mg/L)	<0,0050	0,0100	0,0100
Zinco (mg/L)	0,0490	1,8000	5,0000

VMP: Valores Máximos Permitidos; **045/2014/E/C/I:** Norma CETESB nº 045/2014/E/C/I – Valores Orientados para Água Subterrânea no Estado de São Paulo; **195/2005/E:** Norma CETESB nº 195/2005/E – Valores Orientados para Água Subterrânea no Estado de São Paulo.

Tabela 3 – Análise histológica do corpo gorduroso perivisceral de *R. padbergi* (Diplopoda) exposto à vinhaça de cana-de-açúcar fitorremediada por 15 dias

Exposição	Tratamento	Perda de limite celular	Degradação citoplasmática	Esferocristais	Enócitos	Morfologia do núcleo do trofócito
21 dias	GC	-	-	++	+	-
	100%	-	-	+++	++	-
42 dias	GC	-	-	++	+	-
	100%	++	++	+++	++	-

GC: grupo controle; **100%:** 100% da dosagem de vinhaça fitorremediada a ser aplicada no solo segundo as normas da CETESB; **+++:** muito frequente; **++:** frequente; **+**: raro; **-:** sem alteração.

Tabela 4 – Análises histoquímicas do corpo gorduroso perivisceral de *R. padbergi* (Diplopoda) exposto à vinhaça de cana-de-açúcar fitorremediada por 15 dias

Técnica	Exposição	Trofócito		Enócito	
		GC	100%	GC	100%
Polissacarídeos neutros	21 dias	+	+	++	+++
	42 dias	+	+	+++	+++
Proteínas totais	21 dias	+	+	++	++
	42 dias	-	+	++	++
Cálcio	21 dias	-	-	+	+
	42 dias	++	++	+	+
Lípido	21 dias	+	+	+++	+++
	42 dias	-	+	+++	+++

GC: grupo controle; **100%:**100% da dosagem de vinhaça fitorremediada a ser aplicada no solo segundo as normas da CETESB; **+++:** reação fortemente positiva; **++:** reação moderadamente positiva; **+**: reação fracamente positiva; **-:** reação negativa.

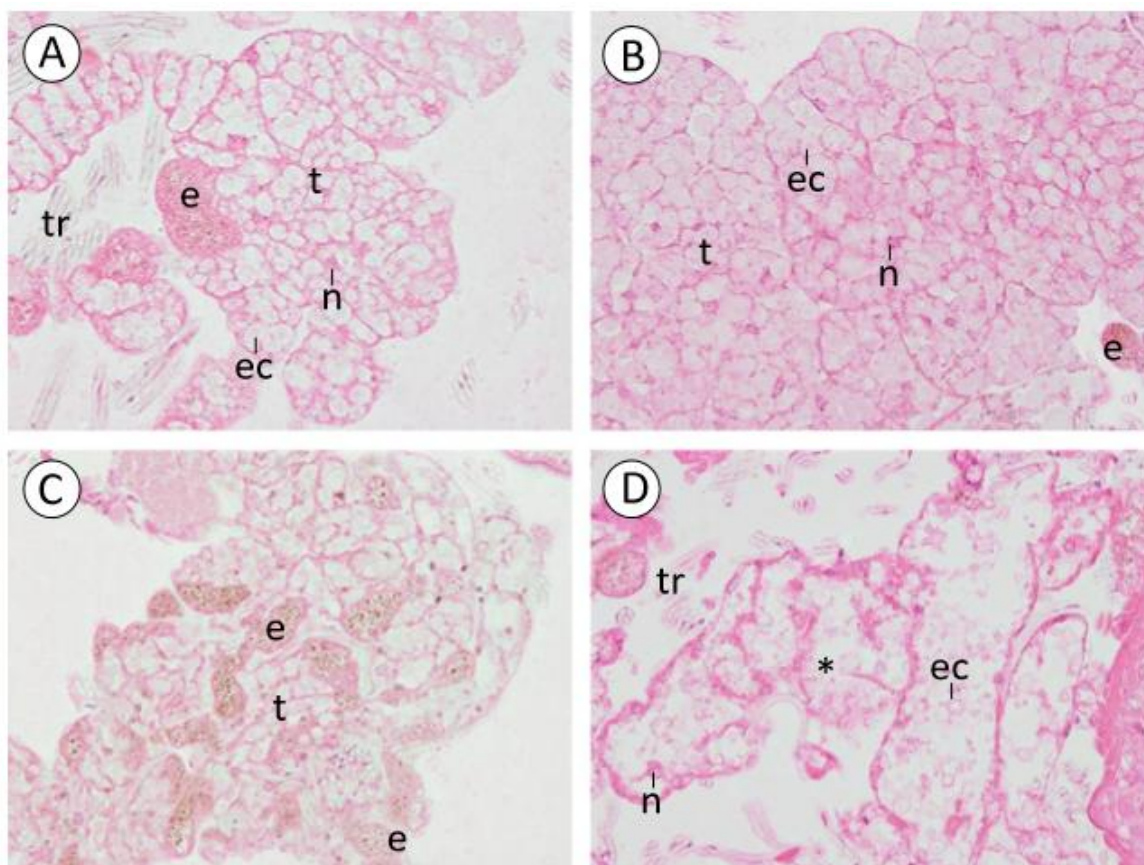


Figura 1. Secções histológicas do corpo gorduroso perivisceral de *R. padbergi* corados com eosina-hematoxilina. (A) Grupo Controle; (B) exposição dos animais por 21 dias a vinhaça fitorremediada; (C-D) exposição por 42 dias. Aumento: 40x; **e** = enócito; **ec** = esferocristal; **n** = núcleo; **t** = trofócito; **tr** = traqueíola; * = perda de limite celular.

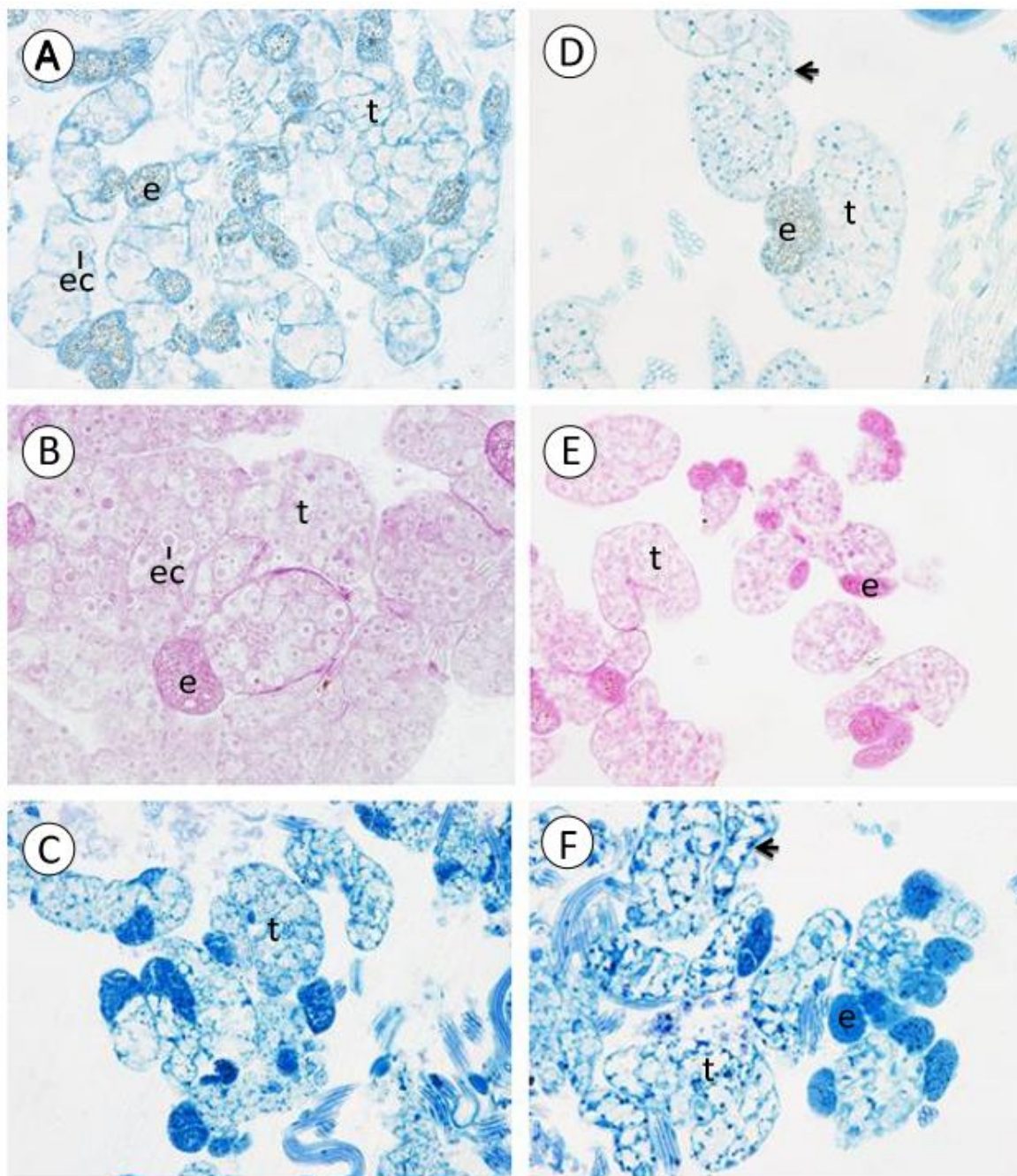


Figura 2. Secções histológicas do corpo gorduroso perivisceral de *R. padbergi* submetidos às técnicas de azul de bromofenol (A e D), PAS (B e E) e azul do Nilo (C e F). Grupo Controle (A, B e C); Exposição dos animais por 42 dias (D e F); exposição por 21 dias (E). Aumento = 40x; **e** = enócito; **ec** = esferocristal; **t** = trofócito; **seta em (D)** = grânulos de proteínas; **seta em (F)** = lipídeos.