
Ciências Biológicas

Larissa Rosa Nogarol

**Análise do potencial bioindicador do diplópodo
Rhinocricus padbergi exposto a substrato contendo
lodo de esgoto por meio de estudos histológico e
histoquímico do tubo digestivo.**

LARISSA ROSA NOGAROL

ANÁLISE DO POTENCIAL BIOINDICADOR DO DIPLÓPODO
Rhinocricus padbergi EXPOSTO A SUBSTRATO CONTENDO LODO
DE ESGOTO POR MEIO DE ESTUDOS HISTOLÓGICO E
HISTOQUÍMICO DO TUBO DIGESTIVO.

Orientadora: PROF^a. DR^a. CARMEM S. FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Campus de Rio Claro, para obtenção dos
graus de Bacharel e Licenciado em Ciências
Biológicas.

Rio Claro
2009

595.61 Nogarol, Larissa Rosa
N775a Análise do potencial bioindicador do diplópodo *Rhinocricus padbergi* exposto a substrato contendo lodo de esgoto por meio de estudos histológicos e histoquímico do tubo digestivo. / Larissa Rosa Nogarol. - Rio Claro : [s.n.], 2009
60 f. : il., figs., gráfs.

Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura e Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Carmem S. Fontanetti Christofolletti

1. Milípede. 2. Toxicidade de solo. 3. Histopatologia. 4. Histoquímica. 5. ETE. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

*Ao meu tesouro mais precioso,
minha família, dedico.*

Agradecimentos

Diferentes etapas da vida se encerram para que novos desafios possam surgir. Junto com esses desafios, pessoas especiais se fazem presentes, as quais merecem todo o nosso agradecimento. O famoso momento de agradecer por todos aqueles que contribuíram de alguma forma para que essa etapa fosse concluída chegou, e agora percebo a dificuldade de agradecer por algo tão grandioso e significativo na minha vida.

Com certeza, o meu maior agradecimento é para Deus que me acompanhou em todos os momentos, enchendo meu coração de força, coragem e perseverança. Aos meus amados pais, José e Genezaré, os quais sempre me incentivaram a lutar pelo o que acredito e jamais desistir dos meus sonhos. Espero sempre dar-lhes muito orgulho durante toda minha vida, pois sempre me sentirei orgulhosa de ser sua filha. À minha irmã Vanessa que me dedicou muitas palavras de incentivo durante os momentos de dificuldade. Amo vocês infinitamente!

A minha querida amiga e orientadora Carmem, um grande exemplo de pessoa e profissional, quem admiro e agradeço muito pela atenção, carinho e ensinamentos. Aos meus amigos pertencentes ao grupo de pesquisa, Cintya, Tati, Cris, Dani, Lu, Gui e em especial ao Bairral e Sam. Ao Gerson Mello Souza por todo o apoio técnico e principalmente por fazer as horas no laboratório mais divertidas, a Cristiane M. Mileo pelos ensinamentos e paciência enquanto aprendia a mexer com o famoso Corel Draw.

Aos meus colegas de turma, em especial Pam e Gandhi, pelos quais tenho grande carinho diante das trocas e experiências que vivenciamos. Sucesso a todos! Ao meu querido namorado e companheiro de longas conversas André que sempre me fortaleceu com seus conselhos. Muito obrigada por tudo! Adoro-te!

Agradeço a FAPESP pelo apoio financeiro e a CETESB por ceder o material.

“Nunca desista de seus sonhos, pois eles trazem beleza e sentido à vida”.
(Augusto Cury)

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	10
2.1. Bioindicadores e biomonitores.....	10
2.2. Invertebrados de solo como bioindicadores.....	13
2.3. A espécie <i>Rhinocricus padbergi</i>	16
2.4. Lodo de esgoto.....	18
3. OBJETIVOS.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1. Material.....	23
4.2. Métodos.....	23
4.2.1. Histologia.....	24
4.2.2. Histoquímica.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1. Biomonitoramento.....	26
5.2. Análise histológica e histoquímica do intestino médio.....	29
6. CONCLUSÕES.....	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

1. INTRODUÇÃO

Os Myriapoda compreendem quatro classes: Chilopoda, Diplopoda, Paupoda e Symphyla. A classe Diplopoda caracteriza-se pela presença de segmentos duplos, portando dois pares de pernas. Devido ao número de pernas que apresentam, os diplópodos são comumente conhecidos como milípedes e popularmente como piolhos-de-cobra ou embuás. Entre as 20 famílias de diplópodos brasileiros, as mais conhecidas são Leptodesmidae, Spirostreptidae e Rhinocricidae. Os Diplopoda estão entre os maiores grupos de organismos terrestres com mais de 12.000 espécies descritas e com uma diversidade estimada de aproximadamente 80.000 espécies (HOFFMAN et al., 2002), sendo a terceira maior classe de Arthropoda, depois de Insecta e Arachnida. Apresentam distribuição cosmopolita, podendo ser encontrados em todas as regiões zoogeográficas, exceto na Antártida.

Os milípedes representam um grupo de invertebrados terrestres capazes de colonizar diferentes camadas superficiais do solo. São encontrados em diversos microhabitats, preferencialmente úmidos e escuros, como sob a serapilheira nas matas ou até mesmo embaixo de pedras e troncos de árvores em jardins e quintais, os quais representam possíveis abrigos e fontes adequadas de alimento (BOCCARDO, 1992; HOPKIN; READ, 1992). Um grande número de diplópodos também habita cavernas (MEAD; GILHODES, 1974; TRAJANO et al., 2000). Poucas espécies são encontradas no litoral, deserto ou ambiente semi-aquático (KIME; GOLOVATCH, 2000). Ninhos de pássaros representam um habitat pouco usual, onde estes invertebrados podem ser encontrados até mesmo em abundância (TAJOVSKY et al., 2001).

Ecologicamente, esses animais ocupam o nível trófico de decompositores, sendo reconhecidos como invertebrados saprófagos e detritívoros, consumindo uma grande variedade de alimentos, como folhas em decomposição (WOOTON; CRAWFORD, 1975; KHEIRALLAH, 1979), material vegetal vivo (WALLWORK, 1970), solo (FRYER, 1957;

BOCOCK; HEATH, 1966), algas (LEWIS, 1971) e até mesmo invertebrados mortos (COLE, 1946). Embora as exigências energéticas e nutricionais sejam fornecidas em parte pela seleção de itens alimentares (KHEIRALLAH, 1979; DANGERFIELD, 1993), a qualidade relativamente baixa da maioria da dieta requer altas taxas de ingestão. Na maioria das espécies, as taxas de ingestão estão por volta de 1% a 5% da massa corpórea por dia (WOOTON; CRAWFORD, 1975) e variam em função do tipo de alimento (NEUHAUSER; HARTENSTEIN, 1978; STRIGANOVA; PRISHUTOVA, 1990), massa corpórea e a proporção de solo ingerido (DANGERFIELD, 1993).

Estudos sobre os efeitos da presença de diferentes animais de solo na decomposição de matéria orgânica (ANDRESON; BIGNELL, 1980; HANLON; ANDRESON, 1980) sugerem o importante papel destes invertebrados nos processos de decomposição e, subseqüentemente, na dinâmica de nutrientes (LAVELLE, 1988). A colonização dos diplópodos no solo também fornece maior aeração e condições favoráveis ao trabalho de decomposição de fungos e bactérias, promovendo a mineralização. Além disso, os produtos de excreção dos diplópodos (amônia e ácido úrico), quando degradados, enriquecem o solo com nitratos (BOCCARDO; PENTEADO, 1997).

Embora eles desempenhem um importante papel ecológico na maioria dos ecossistemas terrestres, pouco se sabe sobre a morfologia, filogenia e diversidade do grupo quando comparado com outros grupos de artrópodes.

Devido ao hábito dos diplópodos, eles têm sido considerados como bons indicadores ambientais, sendo utilizados como organismos-testes em algumas análises de solo (HOPKIN et al., 1985; TRIEBSKORN et al., 1991; KÖHLER; TRIEBSKORN, 1998). Paoletti et al. (1991) enfatizam que, de maneira geral, os invertebrados do solo indicam eficientemente determinadas alterações nos ecossistemas terrestres, uma vez que são sensíveis a mudanças ambientais. Desta forma, variações fisiológicas de órgãos e tecidos podem ocorrer, sendo prontamente detectadas na análise de células (KÖHLER; TRIEBSKORN, 1998). Dependendo da intensidade do fator estressante e do tipo de órgão afetado, as alterações celulares podem ser diversas.

De acordo com Meyers e Hendricks (1985), as alterações morfológicas podem ser empregadas nas investigações da toxicidade de compostos químicos específicos e no monitoramento dos efeitos agudo e crônico, em ambientes impactados. Tais alterações morfológicas podem proporcionar indícios qualitativos de uma adaptação funcional ao ambiente externo. A avaliação qualitativa dessas mudanças antes da morte do organismo fornece indicações antecipadas de toxicidade. Neste contexto, a histologia passou a ser

amplamente utilizada em estudos com invertebrados, visando a identificação de diferentes danos causados por substâncias nocivas aos organismos (TRIEBSKORN et al., 1999).

A crescente população dos centros urbanos é importante produtora de diversos resíduos, os quais, muitas vezes, são acumulados no ambiente sem o adequado tratamento, ou utilização, que possibilite sua reciclagem. Dentre esses resíduos, pode-se destacar o lodo de esgoto, predominantemente orgânico com teores variáveis de componentes inorgânicos, proveniente do tratamento de águas residuárias domiciliares ou industriais (ANDRADE, 1999).

Este resíduo apresenta potencialidades para utilização agrícola, visto que contém considerável percentual de matéria orgânica e de elementos essenciais para as plantas, podendo substituir, ainda que parcialmente, os fertilizantes minerais. Graças a essas características, o lodo de esgoto pode desempenhar importante papel na produção agrícola e na manutenção da fertilidade do solo.

Desta maneira, o uso do lodo de esgoto na agricultura constitui uma alternativa que apresenta vantagens ambientais, quando comparado com outras práticas de destinação final, uma vez que se enquadra nos princípios de reutilização de resíduos de uma forma ambientalmente adequada (MMA, 2006).

Esse lodo provém de ETEs (Estações de Tratamento de Esgoto), as quais realizam os tratamentos primários e secundários. Esses tratamentos são eficientes apenas na remoção da matéria orgânica biodegradável, não removendo os nutrientes existentes neste esgoto (CETESB, 2004). Portanto, lodos de esgotos podem conter diferentes concentrações de elementos, potencialmente tóxicos, como contaminantes orgânicos e inorgânicos, além de patógenos, os quais ficam retidos nos nutrientes do esgoto.

Segundo Oliveira et al. (2005) a principal limitação do uso agrícola do lodo de esgoto é a presença de metais potencialmente tóxicos. A concentração de metais no lodo depende da atividade, do desenvolvimento urbano e industrial da área que abastece a estação de tratamento.

Assim, para viabilizar a aplicação do lodo de esgoto, ou de qualquer outro produto derivado deste lodo, na agricultura, é necessário que este passe por uma caracterização quanto ao seu potencial agrônômico, às substâncias inorgânicas e orgânicas potencialmente tóxicas, à presença de agentes patogênicos, além de estudos sobre a sua estabilidade no ambiente (MMA, 2006).

Neste sentido, considerando os hábitos dos diplópodos e o número reduzido de trabalhos utilizando-os como ferramentas de avaliação de potenciais contaminantes

ambientais, este projeto visou analisar os possíveis efeitos tóxicos do lodo de esgoto no intestino médio da espécie *Rhinocricus padbergi*. Tal espécie foi escolhida devido a sua abundância e pelo histórico de trabalhos realizados com a espécie pela equipe proponente do projeto (CAMARGO-MATHIAS et al., 1998; 2004; FANTAZZINI et al., 1998; 2002; CAMARGO-MATHIAS; FONTANETTI, 2000; ARAB et al., 2003; FONTANETTI; CAMARGO-MATHIAS, 2004a, b; MIYOSHI et al., 2005; FONTANETTI et al., 2004; 2006).

Este projeto está vinculado junto a CETESB cuja proposta é o desenvolvimento de um meio de avaliação toxicológica e caracterização de lodos de esgoto doméstico, para sua posterior reutilização. Através destes testes toxicológicos será possível o desenvolvimento de matrizes de decisão que visam diminuir os custos e aumentar a confiabilidade dos lodos gerados pelas ETEs.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Bioindicadores e Biomonitorios

Muitas substâncias químicas potencialmente danosas, tanto naturais como de origem antropogênica, são liberadas no ambiente constantemente. Neste contexto, durante as últimas três décadas, a comunidade científica tem demonstrado crescente interesse na detecção, conhecimento e controle sobre agentes ambientais responsáveis por danos à saúde humana e à sustentabilidade dos ecossistemas.

Monitorar os tipos e as quantidades de substâncias tóxicas que estão entrando no ambiente é uma tarefa exaustiva e problemática devido, principalmente, à complexidade e ao custo decorrente da identificação das substâncias químicas envolvidas. Apesar dos inúmeros métodos analíticos disponíveis, coletar amostras suficientes em tempo hábil continua sendo um grande obstáculo na avaliação de danos ambientais (SILVA et al., 2003).

Além disso, a determinação de substâncias isoladas através de análises químicas tradicionais, além de não detectarem os efeitos nos organismos, não dão resposta sobre que tipo de agente químico está sendo responsável pela toxicidade e informações sobre as possíveis interações entre substâncias (aditivas, antagônicas ou sinérgicas), como também da biodisponibilidade das mesmas. Desta forma, os resultados das análises químicas por si só não retratam o impacto ambiental causado pelos poluentes porque não demonstram os efeitos sobre o ecossistema. Somente os sistemas biológicos (organismos ou partes deles) podem detectar os efeitos tóxicos das substâncias (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

A aplicação dos testes de toxicidade na análise ambiental é bastante abrangente e sua importância aumenta na proporção que cresce a complexidade das transformações químicas no meio ambiente. Nesse sentido, os programas de monitoramento da qualidade das águas e do solo que empregam, exclusivamente, índices físicos e químicos têm sido alvo de críticas severas por vários pesquisadores, que apontam a necessidade de se aplicar metodologias

biológicas para a obtenção de uma abordagem mais ecossistêmica (MAIA et al., 2001; SILVA et al., 2001b).

Segundo a CETESB (2005), a avaliação ambiental da integridade ou grau de degradação de ecossistemas terrestres e aquáticos, cujas variações físicas são acentuadas, exige que fatores mais estáveis sejam considerados como indicadores de avaliação, como por exemplo, fatores biológicos. Estes fatores podem indicar melhor o equilíbrio do ambiente através de índices bióticos, derivados da observação de espécies bioindicadoras.

Em contraste com a simples medição de contaminantes acumulados nos tecidos corporais, os bioindicadores podem oferecer informações biologicamente mais completas e relevantes sobre o potencial impacto de poluentes tóxicos sobre a saúde dos organismos (SHUGART et al., 1992). Uma espécie ou um grupo de espécies que reflete níveis bióticos e abióticos de contaminação de um ambiente, apresentando alterações que possibilitem gerar informações sobre a qualidade do seu ambiente, por exemplo, acumulando substâncias em concentrações maiores do que as consideradas normais ou essenciais para seu metabolismo corpóreo ou apresentando alterações no número de organismos são chamados bioindicadores (HODKINSON; JACKSON, 2005). A principal vantagem de se utilizar organismos bioindicadores para monitoramento ambiental é a informação que ele pode dar em relação à exposição cumulativa em organismos e populações sobre a resposta de letalidade e sub-letalidade. Além disso, esses organismos respondem ao estresse de ambientes poluídos modificando-se quimicamente, podendo romper processos celulares, afetando assim processos fisiológicos e mudando seu comportamento (MAIA et al., 2001).

Nos métodos de bioindicação, o comportamento do bioindicador ante um agente estressante é utilizado na avaliação da qualidade de uma dada área e do impacto da contaminação dos poluentes nesse ambiente (MAIA et al., 2001; AZEVEDO; CHASIN, 2003). Embora o número de espécies de diplópodos possa ser consideravelmente reduzido em áreas contaminadas com metais (HOPKIN et al., 1985), em quase todos os casos algumas espécies ocorrem por serem capazes de resistir a esses compostos nocivos (KÖHLER, 1995). Essas populações de diplópodos são capazes de sobreviver mesmo sendo expostas a condições de quedas nas taxas de consumo de alimentos (HOPKIN et al., 1985), na eficiência de absorção de nutrientes (KÖHLER et al., 1992) e em alguns casos nas taxas de sobrevivência de indivíduos juvenis (READ; MARTIN; 1988 apud KÖHLER et al., 1995), causadas pela contaminação por metais. Desta maneira, os diplópodos são reconhecidamente resistentes a diversas substâncias químicas e quando em contato com substâncias tóxicas, muitas vezes preferem morrer de inanição a ingerir alimentos contaminados. Devido a estas

características, a observação do comportamento e sobrevivência destes animais pode ser considerada como indicador inicial da potencialidade do ambiente em causar danos à saúde dos diferentes organismos da fauna edáfica. Por este motivo, alguns pesquisadores têm discutido a possibilidade de seu uso como bioindicadores na toxicidade do solo (TRIEBSKORN et al., 1991; KÖHLER; TRIEBSKORN, 1998).

Após a exposição à contaminantes ambientais, mecanismos compensatórios moleculares, bioquímicos e fisiológicos podem se tornar operantes nos organismos expostos. Isto pode resultar na inibição ou na facilitação de um ou mais mecanismos fisiológicos ou mudanças funcionais e estruturais. Biomarcadores são sistemas indicadores sensíveis que revelam essas mudanças, sendo representados, por exemplo, por órgãos ou tecidos de um organismo. Devido a estas características, eles indicam que o toxicante entrou no organismo (EVERAARTS, 1995) e como tal provém informações sobre a bioviabilidade do mesmo. No âmbito das medidas de efeitos tóxicos nos organismos no nível molecular ou celular, eles representam a resposta inicial às perturbações ambientais e contaminação. Por isso, eles são geralmente considerados mais sensíveis do que testes que medem esses efeitos em níveis mais elevados de hierarquia biológica, tais como individual ou da população (MCCARTHY; SHUGART, 1990).

Por meio da utilização de biomarcadores torna-se possível a detecção de muitas classes de danos em diversos tipos celulares. Contaminantes podem influenciar na ocorrência de variações fisiológicas de órgãos e tecidos, as quais se tornam evidentes ao se analisar as células que compõe essas estruturas. Assim, essas variações induzem alterações celulares distintas, dependentes de diversas variantes como o tipo de órgão ou célula e a intensidade do estressor. Para tal análise, a histologia, a ultramorfologia e a ultra-estrutura são utilizadas. Por meio destas técnicas é possível diagnosticar sintomas celulares e subcelulares resultantes da intoxicação, bem como localizar sintomas de morte celular, e revelar reações em resposta a exposições crônicas e subletais em células e tecidos (KAMMENGA et al., 2000).

Desta forma, durante as duas últimas décadas, diversos biomarcadores têm sido utilizados de forma eficaz, sobretudo como testes para toxicantes específicos, visto que biomarcadores quando combinados com biomonitores podem criar um sofisticado sistema alvo múltiplo para detectar uma variedade de perigos ambientais de forma rápida e economicamente viável, em um único organismo teste, auxiliando no estabelecimento de prioridades de ação no controle da poluição ambiental. Na maioria dos invertebrados de solo, os metais são seletivamente concentrados em apenas um ou poucos órgãos, ou em partes específicas de tecidos, sendo que tipicamente estes órgãos são parte de aparato digestivo

(DALLINGER, 1993). Por exemplo, em milípedes (KÖHLER; ALBERTI 1992), isópodos (DALLINGER; PROSI 1988) e colêmbolos (PAWERT *et al.* 1996), o epitélio do intestino médio é o principal alvo dos metais. O intestino médio dos diplópodos é composto por células epiteliais responsáveis pela absorção de nutrientes e síntese de diversos compostos (FANTAZZINI *et al.*, 2002) e está diretamente exposto a potenciais contaminantes no solo, no momento em que revolvem a terra onde se encontram. Assim, sua análise pode se tornar um bom biomarcador na análise de diferentes substratos.

2.2. Invertebrados de solo como bioindicadores

As atividades antropogênicas somadas à necessidade de controle mais rígido em relação à emissão de resíduos químicos no meio ambiente conduzem a procura e utilização de espécies adequadas em testes biológicos. Muitos autores consideram que em condições laboratoriais, as respostas de diferentes organismos a diferentes substâncias químicas podem ser utilizadas para avaliar estresse e auxiliar na elaboração de processos legislativos (VAN STRAALLEN, 2003).

Neste contexto, alguns grupos taxonômicos de invertebrados pertencentes a meso e macrofauna de solo têm sido propostos como organismos bioindicadores, os quais apresentam diferentes vantagens e desvantagens (KÖHLER, 1996).

Artrópodes terrestres da fauna saprófaga como, por exemplo, Isopoda, Collembola e Diplopoda estão entre os organismos mais apropriados para se avaliar os efeitos do acúmulo de substâncias tóxicas presentes no solo, devido ao seu contato direto com contaminantes presentes no mesmo (HOPKIN *et al.*, 1989, GRÄFF *et al.*, 1997). Vários estudos mostraram que a estrutura populacional pode degenerar-se sob essas influências resultando, por exemplo, em baixas taxas de decomposição de matéria orgânica, e conseqüentes transtornos na ciclagem de nutrientes no solo (WALLWORK, 1988).

Metais oriundos de fontes antropogênicas, como esgoto e gases, e distribuídos pela atividade humana, podem exceder os níveis de tolerância fisiológica no ambiente, alimento e órgãos destes animais. Devido a sua constante exposição, tais invertebrados de solo necessitam desenvolver mecanismos que lhes permitam conciliar a absorção dos metais essenciais e nocivos, os quais possuem propriedades fisicoquímicas semelhantes.

Mesmo diante do fato desses invertebrados saprófagos serem organismos adequados para estudos citológicos e bioquímicos no metabolismo de metais, a maioria dos trabalhos acerca dos efeitos dos metais nesses grupos se focam, principalmente, no acúmulo destas

substâncias potencialmente tóxicas em relação à sobrevivência e reprodução dos animais (KÖHLER, 2002).

Diferentes invertebrados da fauna saprófaga colonizam as camadas superiores do solo, estando regularmente expostos a metais. Assim, testes toxicológicos padronizados utilizando-se principalmente os grupos Isopoda, Collembola e Diplopoda vêm sendo sugeridos (LOKKE; VAN GESTEL, 1998).

Collembola estão entre os mais importantes membros da mesofauna de solo envolvida no processo de decomposição, sendo vulneráveis aos efeitos da contaminação do solo. A abundância e a diversidade de Collembola vêm sendo amplamente utilizadas na avaliação de impactos ambientais envolvendo uma gama de poluentes nos solos, visto que em solos contaminados com metais, a ocorrência da diminuição na densidade e, por vezes, a diversidade de Collembola é conhecida, concomitante com a diminuição da taxa de decomposição da camada de serapilheira (BENGTSSON; RUNDGREN, 1984). A exposição dos colêmbolos a contaminantes é feita por meio do solo ou alimento numa bateria de testes que utiliza diversos parâmetros para análise como bioacumulação e efeitos no comportamento. Tais testes avaliam a toxicidade de uma ampla faixa de poluentes orgânicos e inorgânicos, sendo utilizados como bioensaios no monitoramento do resultado da remediação de solos contaminados (CROUAU et al., 2002; DIEZ et al., 2001; FAVA; BERTIN, 1999; VAN GESTEL et al., 2001).

Isopoda é uma das maiores ordens de crustáceos, contando com aproximadamente 10.000 mil espécies descritas, sendo a maioria marinha (SCHULTZ, 1982). Existem espécies saprófagas, onívoras e fitófagas. Alguns indivíduos terrestres exibem a capacidade de se enrolarem como uma bola (capacidade volvocional), o que oferece proteção e auxilia na redução da perda de água por evaporação. Estes animais são conhecidos popularmente como “tatuzinhos”, “tatuzinhos de jardim” ou “tatus-bolas”, sendo encontrados facilmente junto a plantas de hortas, jardins e sementeiras (COSTA, 1958). Alguns trabalhos envolvendo os mecanismos de detoxicação e os efeitos citotóxicos de metais em Isopoda já foram conduzidos (HOPKIN, 1990; KÖHLER; TRIEBSKORN, 1998), sendo o isópodo terrestre *Porcellio scaber*, o mais estudado.

Segundo Kale (1988), os Oligochaeta são os representantes de maior importância na macrofauna edáfica. Existem no globo terrestre aproximadamente 3.000 espécies de minhocas, as quais ocorrem nos mais variados habitats, desde regiões quentes até regiões geladas (JAMIESON, 1978). As minhocas são os maiores decompositores secundários do sistema edáfico, alimentando-se de material vegetal já degradado parcialmente por

microorganismos. A atividade de escavação do solo realizada por minhocas determinam, em grande parte, a estrutura, densidade e capacidade de retenção de água no solo (STORK; EGGLETON, 1992). Devido aos seus hábitos, as minhocas têm sido utilizadas como indicadores dos efeitos acumulativos dos metais na cadeia trófica (SPURGEON et al., 1994). Alguns estudos revelaram que a contaminação de solos por cobre reduz a biomassa e densidade populacional de minhocas tanto em bioensaios laboratoriais quanto em condições de campo (BENGTSSON et al., 1983; ABDUL RIDA; BOUCHÉ, 1995).

A importância dos diplópodos na reciclagem de nutrientes, aeração e fertilização do solo é freqüentemente mencionada na literatura (BANO; KRISHNAMOORTHY, 1981; DANGERFIELD; TELFORD, 1989). Devido aos hábitos dos diplópodos, colonizadores de várias camadas do solo, estes animais podem ser muito influenciados pela deposição de metais no solo.

A maioria dos trabalhos presentes na literatura envolvendo diplópodos como bioindicadores de solo diz respeito a metais. Neste contexto, o primeiro trabalho realizado com diplópodos, como possíveis bioindicadores, foi o de Hopkin et al. (1985), envolvendo a assimilação de metais pela espécie *Glomeris marginata*. Neste estudo, foi constatada uma maior assimilação de cobre, zinco e cádmio por animais coletados em solos contaminados quando comparados com aqueles animais coletados em ambientes não contaminados. Os autores comentaram que seriam necessários estudos ultra-estruturais de diferentes órgãos para se conhecer o “caminho dos metais”, particularmente no intestino destes invertebrados.

Posteriormente, Triebkorn et al. (1991) expuseram vários invertebrados como ácaros, insetos e diplópodos a diferentes substâncias tóxicas, e utilizaram a análise ultra-estrutural a fim de demonstrar a aplicabilidade do uso de tais animais no biomonitoramento. No caso do diplópodo, foi escolhida a espécie *Cylindroiulus punctatus* como representante da macrofauna do solo e o tecido analisado foi o intestino médio, local onde ocorre a digestão propriamente dita. Tais animais foram tratados por 30 dias com ágar e partículas de folhas contaminadas com chumbo, em concentração subletal.

No estudo realizado por Köhler et al. (1992), foi analisado o impacto do chumbo sobre a eficiência de assimilação em diplópodos, submetidos a diferentes condições ambientais. Os pesquisadores utilizaram diferentes espécies de diplópodos e constataram que apenas *Glomeris conspersa* aumentou a ingestão de alimento contendo chumbo, quando comparada com a dieta não contaminada.

Na maioria dos invertebrados do solo, os metais são seletivamente concentrados em um ou poucos órgãos, ou então em partes específicas de um tecido; tipicamente, estes órgãos

são partes do aparato digestivo (GRÄFF et al., 1997). O epitélio do tubo digestivo de invertebrados terrestres é usualmente constituído por uma camada de células que atua como barreira entre o corpo do animal e o alimento no lúmen. Assim sendo, o epitélio do trato digestivo representa a primeira barreira contra o envenenamento de todo o organismo (WALKER, 1976). Em diplópodos, alguns estudos com este enfoque foram realizados utilizando o tubo digestivo e o corpo gorduroso (HOPKIN et al., 1985; TRIEBSKORN et al., 1991; KÖHLER e TRIEBSKORN, 1998).

2.3. A espécie *Rhinocricus padbergi*

A espécie *R. padbergi* apresenta ampla distribuição no estado de São Paulo, sendo registrada também para o Rio de Janeiro; pertence à ordem Spirobolida e é considerada atualmente uma espécie sinantrópica. Os diplópodos com caráter sinantrópico são os que vivem na dependência direta do homem, vivendo em hortas, quintais, estufas, pomares, e até mesmo nas próprias casas, alimentando-se de detritos do lixo doméstico.

Devido a grande escassez de informações sobre a anatomia de Diplopoda, especialmente em relação às espécies tropicais, Fantazzini et al. (1998) realizaram um estudo inicial com a espécie *R. padbergi* quanto à anatomia do tubo digestivo, histologia e histoquímica do intestino anterior e glândulas salivares. Basicamente, o tubo digestivo dos diplópodos consiste de um tubo longo e reto que se estende por todo o comprimento do corpo, partindo da boca até o ânus. Três principais regiões podem ser diferenciadas: intestino anterior, médio e posterior. O intestino anterior representa a menor porção do trato digestivo da espécie e se estende da boca à válvula esofágica, a qual pode ser definida como um estreitamento do tubo digestivo que marca o fim do intestino anterior e o começo do intestino médio. Em associação com a região anterior encontra-se um par de glândulas salivares, responsáveis pela produção de secreção rica em enzimas digestivas, auxiliando tanto na lubrificação do alimento quanto na sua digestão. A transição do intestino anterior para o intestino médio é marcada pelo gradual desaparecimento da íntima cuticular, a qual é totalmente ausente no intestino médio, sendo as células epiteliais da porção mediana do trato digestivo responsáveis pela absorção de nutrientes. O intestino médio compreende desde a válvula esofágica até o início do intestino posterior, marcado pelo piloro, representando aproximadamente 39% do comprimento total do trato digestivo da espécie. O intestino posterior é caracterizado pela inserção dos túbulos de Malpighi, sendo a porção mais extensa do canal alimentar em *R. padbergi*.

Em estudos posteriores, Fantazzini et al. (2002) analisaram a histologia e histoquímica do intestino médio de *R. padbergi*, local onde ocorre a maior parte da digestão. Em termos histológicos, o intestino médio de *R. padbergi* consiste em epitélio pseudoestratificado, o qual apresenta células principais, células regenerativas e células secretoras, além de uma membrana basal, uma camada muscular, seguido por uma camada de corpo gorduroso. Logo abaixo da camada muscular estão presentes células hepáticas cujo citoplasma é mais homogêneo quando comparado com o das células do corpo gorduroso, além disso, estas células se caracterizam por não formar uma camada contínua. As células principais do epitélio possuem bordo em escova desenvolvido no domínio apical, núcleos localizados na metade superior com formato que varia do arredondado ao oval. As células regenerativas são menores que as células principais, possuem núcleos esféricos e estão localizadas no domínio basal do epitélio.

Em relação aos testes histoquímicos realizados por Fantazzini et al. (2002), os lipídios aparecem nas células principais e no corpo gorduroso. Uma forte reação revelou a presença de polissacarídeos neutros nas células secretoras. Foi constatada a presença de proteínas nas células principais e microvilos do epitélio, ocorrendo em menor quantidade nas células secretoras. A reação também foi positiva para o corpo gorduroso, fibras musculares, células hepáticas e parte das vesículas de secreção. Possivelmente, essa secreção está envolvida na liberação de enzimas digestivas no lúmen. O cálcio foi encontrado na porção apical das células principais do epitélio, nos microvilos e no corpo gorduroso. Os dados demonstraram que o epitélio do intestino médio de *Rhinocricus padbergi* deve participar diretamente da digestão e/ou síntese de lipídios, proteínas e polissacarídeos neutros, além de estar envolvido no transporte de cálcio.

Estudos das características ultra-estruturais do intestino médio da espécie *R. padbergi* também foram realizados (CAMARGO-MATHIAS et al., 2004). Neste trabalho, constatou-se que a organização estrutural do domínio basal das células principais no intestino médio de *R. padbergi* sustenta a idéia que, em adição à absorção de compostos por meio do alimento, essas células possam estar envolvidas com o transporte de elementos da hemolinfa. Esta morfologia é similar à encontrada nas células dos túbulos renais de vertebrados, as quais são importantes no transporte de íons.

2.4. Lodo de esgoto

Atualmente, a maior parte dos esgotos é lançada *in natura* nos cursos d'água, o que compromete a quantidade e a qualidade dos recursos hídricos das regiões densamente habitadas. Visto que os esgotos urbanos são os principais poluidores dos corpos d'água, fica clara a necessidade de tratá-los na tentativa de minimizar seu potencial poluidor, cujos efeitos ambientais são negativos. Entretanto, o problema não se restringe ao tratamento dos esgotos, uma vez que nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) é gerado um resíduo, denominado lodo de esgoto.

A geração de resíduos é decorrente da adoção de uma tecnologia não sustentável, sendo a disposição final destes resíduos um fator dramático, principalmente quando dispostos em locais de grandes concentrações demográficas, com desenvolvimento industrial e progresso econômico aumentados (SILVA, 1995).

Nas últimas décadas, a disposição final de resíduos gerados no processo de tratamento de esgotos tem se tornado uma crescente problemática, visto que à medida que são ampliadas as capacidades dos sistemas de coleta e tratamento de esgotos instalados, mais subprodutos do tratamento como o lodo de esgoto (fase sólida) e o efluente de esgoto tratado são produzidos. O aumento da geração de resíduos, como o lodo de esgoto, eleva consideravelmente os custos operacionais de uma estação de tratamento (BETTIOL et al., 1983).

O tratamento das águas residuárias domiciliares ou industriais nas ETEs consiste na separação da fração sólida da líquida, a qual é efetuada pela combinação de processos físicos, químicos e biológicos (SABESP, 1979). O lodo gerado a partir deste tratamento apresenta uma composição muito variável, visto que existem muitos fatores que influenciam na composição desse resíduo como o grau de industrialização da região onde são gerados os esgotos, do método de tratamento e da variabilidade sazonal (SOMMERS et al., 1996). Por exemplo, o lodo de esgoto estritamente doméstico possui normalmente quantidade baixa de metais potencialmente tóxicos, mas quando esgotos industriais e águas da chuva entram no sistema de captação do esgoto urbano, este pode ter sua concentração de metais aumentada significativamente (USEPA, 1986). De um modo geral, o lodo de esgoto apresenta em torno de 40% a 60% de matéria orgânica, 4% de nitrogênio, 2% de fósforo e demais macro e micronutrientes, além dos elementos potencialmente tóxicos (BETTIOL; CAMARGO, 2001).

Segundo Tsutiya (2001), as possíveis alternativas para o destino final ou aproveitamento do lodo de esgoto são: disposição em aterro sanitário, o que é bastante aceitável tecnicamente, porém, com custos e manutenção proibitivos; despejo em oceanos, rios e lagos, causando um grande impacto ambiental nestes ambientes; incinerações, o que

representa limitações de execução por lançar gases poluentes na atmosfera e por não serem economicamente viáveis; reutilização na indústria na produção de agregado leve e na fabricação de tijolos, cerâmica e cimento; conversão em óleo combustível; recuperação de solos degradados, em áreas degradadas e de mineração; e uso agrícola e florestal por meio de sua aplicação no solo como fertilizante.

O uso do lodo de esgoto na agricultura constitui uma alternativa que apresenta vantagens ambientais, quando comparado com outras práticas de destinação final, uma vez que se enquadra nos princípios de reutilização de resíduos de uma forma ambientalmente adequada (MMA, 2006). Segundo Boeira et al. (2002), o lodo de esgoto utilizado para fins agrícolas pode atuar como condicionador de solo, por sua elevada carga de matéria orgânica, além de promover a reciclagem de nutrientes. Ele também apresenta um grande potencial como fertilizante orgânico, contendo alguns elementos essenciais às plantas (MELO et al., 1994). Estudos em diferentes culturas como o milho e a cana de açúcar mostram outros benefícios agrônômicos que podem ser alcançados por meio do uso do lodo de esgoto, dentre os quais é possível destacar a elevação do pH do solo (SILVA et al., 2001a), redução da acidez potencial (BERTON et al., 1989) e aumento na disponibilidade de macronutrientes (DA ROS et al., 1993; BERTON et al., 1997).

O lodo de esgoto também pode atuar de maneira positiva nas características físicas do solo, por meio da formação de agregados de partículas, possibilitando uma considerável melhora na infiltração, retenção da água e aeração, reduzindo a erosão e melhorando a qualidade dos recursos hídricos (FIEST et al., 1998).

Do ponto de vista econômico, o uso do lodo como fertilizante orgânico representa o reaproveitamento integral de seus nutrientes e a substituição de adubação química sobre as culturas, levando a geração de rendimentos equivalentes ou até maiores com fertilizantes comerciais (VIEIRA; SILVA, 2004). Porém, isso deve ser tratado com cautela, pois em relação ao teor de nutrientes, tais como nitrogênio, fósforo e potássio, o lodo de esgoto é menos rico quando comparado ao fertilizante comercial (KITAMURA, 2006).

Vários países usam rotineiramente lodo de esgoto na agricultura como, por exemplo, os Estados Unidos onde quase a metade do lodo produzido é aplicada aos solos. Na Comunidade Européia, cerca de 30% do lodo de esgoto gerado é utilizado como fertilizante na agricultura (SILVEIRA et al., 2003). No Brasil, esse uso ainda é pouco difundido, provavelmente devido ao reduzido número de cidades dotadas de estações de tratamento de esgotos. Entretanto, nos últimos anos tem-se observado o aumento do percentual de esgoto

tratado uma vez que novas ETEs estão surgindo, e as já existentes têm procurado expandir sua capacidade.

Embora a aplicação do lodo de esgoto proporcione inúmeros benefícios aos solos agrícolas, a adoção desta prática por anos sucessivos traz grandes preocupações com relação à baixa degradabilidade desse resíduo e efeitos nas características físicas e químicas do solo, além da possibilidade de poluição do solo e da água com patógenos e metais, que dependendo da região em que o lodo de esgoto é gerado ocorrem a níveis alarmantes (OLIVEIRA, 2000).

O acúmulo de metais em solos agrícolas devido a aplicações sucessivas de lodo de esgoto é o fator que causa maior preocupação com relação à segurança ambiental necessária para a viabilização desta prática (OLIVEIRA; MATTIAZZO, 2001). Segundo Sharpley e Menzel (1987), de um modo geral, os produtos mais estudados e discutidos do ponto de vista de adição de metais tóxicos ao solo têm sido o lodo de esgoto e os adubos fosfatados. No Brasil, são poucos os estudos sobre a contaminação de solos agrícolas por metais, e também, os teores de metais nos insumos utilizados na agricultura.

De acordo com Chang et al. (1987), os metais podem expressar seu potencial poluente diretamente nos organismos do solo, através da disponibilidade às plantas em níveis fitotóxicos, além da possibilidade de se inserirem na cadeia alimentar por meio das próprias plantas ou pela contaminação das águas de superfície e subsuperfície.

Elementos traço, tais como arsênio, cádmio, cobre, cromo, mercúrio, níquel, molibdênio, chumbo, selênio, zinco e cobalto podem estar presentes no lodo e têm a sua disponibilidade influenciada por reações como adsorção, complexação, precipitação, oxidação e redução. Os níveis toleráveis variam, portanto, com o conteúdo de metais presentes no lodo e com diversas características do solo, tais como pH, capacidade de troca catiônica (CTC), teor de matéria orgânica e granulometria (SOUZA et al, 1996).

O cádmio é considerado o metal mais perigoso devido suas implicações com a saúde humana, sendo que, a maioria das normas internacionais limitam severamente a concentração de cádmio no solo. As concentrações de molibdênio, cobalto, arsênio, selênio, mercúrio e boro no lodo de esgoto são geralmente pequenas e raramente limitam as aplicações do mesmo nos solos agrícolas. Por outro lado, o zinco, cobre, níquel, chumbo e cromo, são metais que oferecem menor risco, sendo aceitável a sua disposição em solos agrícolas em quantidades maiores (SOUZA et al, 1996).

Em todos os países onde o lodo de esgoto é aplicado na agricultura existem normas estabelecendo, entre outras coisas, as concentrações máximas permitidas de metais no lodo e o teor máximo acumulado no solo. Desta forma, as concentrações máximas permissíveis de

metais nos biossólidos, para uso agrícola, foram estabelecidas em 17 países: Comunidade Européia, Bélgica, Dinamarca, Inglaterra, Alemanha, França, Grécia, Itália, Holanda, Finlândia, Noruega, Suécia, Escócia, Suíça, Áustria, Canadá e Estados Unidos. Os países como a Holanda e a Suécia tendem a restringir os valores máximos de metais, por outro lado, os Estados Unidos, recomendam os maiores níveis permitidos para todos os elementos, com exceção do chumbo.

Neste contexto, nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental (EPA), responsável pelo controle de impactos ambientais, estabeleceu exigências e critérios para seu uso e disposição. Essa legislação federal, adotada em 1993, encoraja o uso racional do lodo de esgoto, não aplicando a este as normas mais rígidas relativas a resíduos perigosos, mas determina a proteção à saúde humana e ao ambiente (CAMARGO et al., 2008).

No Brasil, o uso agrícola de lodo de esgoto é regulamentado pelos ministérios do Meio Ambiente e da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sendo que o primeiro tomou como base a legislação norte americana. Assim, esse resíduo só pode ser utilizado na agricultura se forem submetidos a um processo de redução de patógenos e de atratividade de vetores, de acordo com o Anexo I da Resolução nº 375 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. A concentração máxima de substâncias inorgânicas e patógenos permitida no lodo de esgoto, ou produto derivado, também deverá seguir as determinações do Artigo 11 desta mesma Resolução nº 375 de 29 de agosto de 2006 (MMA, 2006).

Para o estado de São Paulo, a CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, do Estado de São Paulo) propõe os mesmos valores máximos permissíveis de metais nos biossólidos, para uso agrícola adotados nos Estados Unidos, enquanto que, para o estado do Paraná é utilizado os valores recomendados pela norma espanhola (TSUTIYA, 1999).

Desta forma, sem uma caracterização adequada, quanto às substâncias inorgânicas e orgânicas potencialmente tóxicas, à presença de agentes patogênicos, além de estudos sobre a sua estabilidade no ambiente, o lodo de esgoto corresponde a uma fonte potencial de riscos à saúde pública e ao ambiente.

Neste contexto, a incorporação do lodo de esgoto ao solo para fins agrícolas deve ser cuidadosamente planejada e monitorada (BETTIOL; DE CAMARGO, 2006), sendo importante a realização de estudos que forneçam informações acerca da concentração de possíveis componentes tóxicos, bem como dos efeitos da aplicação em longo prazo.

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste projeto foram:

1. Expor exemplares de *Rhinocricus padbergi* a substratos contendo lodo de esgoto em diferentes concentrações, por períodos determinados de exposição para a observação do comportamento e a sobrevivência dos indivíduos expostos;
2. Analisar histologicamente, após cada período de exposição, o intestino médio desses animais a fim de se verificar possíveis alterações morfológicas;
3. Realizar testes histoquímicos para a detecção de proteínas, lipídios, cálcio e carboidratos com o intuito de observar possíveis alterações na síntese de algum elemento, que posteriormente, poderão indicar determinadas alterações fisiológicas.
4. Verificar a eficiência do uso destes animais em ensaios de biomonitoramento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

Espécimens de *R. padbergi* foram coletados manualmente no campus da Universidade Estadual Paulista (UNESP) na cidade de Rio Claro, SP e trazidos ao laboratório onde foram aclimatados a aproximadamente 21° C, durante um período de 15 dias; os animais foram mantidos em terra oriunda do local de coleta.

Após 15 dias, foram montados quatro bioensaios contendo terra proveniente do local de coleta dos animais (grupo controle) e o lodo de esgoto da ETE AT-1 em diferentes concentrações (1%, 10% e 50%) misturado na mesma terra do controle. Em cada bioensaio preparado foram expostos 12 animais, os quais passaram a ser monitorados diariamente.

Os animais foram expostos por períodos de 7, 15 e 90 dias, com a finalidade de analisar respostas aguda e subcrônica.

A ETE AT-1 localiza-se na região hidrográfica da Bacia do Alto Tietê e de acordo com o Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo (DAEE) (2004 - 2007), é uma das cinco grandes ETES que recebem quase a totalidade dos esgotos coletados da Região Metropolitana de São Paulo, densamente povoada, abrangendo indústrias de médio e grande porte. Desta forma, o lodo gerado na ETE AT-1 contém componentes domésticos e industriais. A amostra do lodo de esgoto utilizada neste experimento foi cedida pela CETESB.

4.2. Métodos

Após cada período de exposição, três animais de cada bioensaio foram anestesiados e dissecados a fim de se retirar o intestino médio o qual foi fixado em diferentes soluções, para que distintas técnicas pudessem ser aplicadas. Após a fixação, o material foi colocado em solução tampão fosfato de sódio pH=7, durante 24 horas e mantido na geladeira.

Os resultados obtidos dos espécimens mantidos no lodo foram comparados àqueles do grupo controle e às informações da literatura, com o intuito de detectar possíveis alterações nos animais expostos.

4.2.1. Histologia

O material foi desidratado em soluções de etanol 70, 80, 90 e 95%, durante 30 minutos cada banho. Posteriormente, foi transferido para uma solução de resina (JB-4- Polaron Instruments/ BIO RAD) e deixado na geladeira por 24 horas.

O material foi então colocado em moldes previamente preenchidos com resina contendo catalisador. Depois de polimerizados, os blocos foram cortados com o auxílio de micrótomo Sorvall JB-4 BIO RAD; os cortes foram hidratados e recolhidos em lâminas. Após secagem, as lâminas foram coradas com Hematoxilina/Eosina, conforme rotina histológica, para posterior análise, observação e documentação fotográfica.

4.2.2. Histoquímica

Os testes histoquímicos foram utilizados para detectar os seguintes elementos:

A. Proteínas totais

- Técnica do Azul de Bromofenol (segundo PEARSE, 1985).

Fixação do material em paraformaldeído 4% por aproximadamente 24 horas; coloração pela solução de azul de bromofenol à temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas; lavagem dos cortes em água e banho em ácido acético por 5 minutos.

B. Polissacarídeos Neutros

-Técnica do PAS (segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Fixação em Carnoy; 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. Cálcio

- Método de von Kossa (segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Fixação em paraformaldeído 4% por aproximadamente 24 horas; imersão dos cortes em nitrato de prata por 20 minutos; lavagem em água e transferência dos cortes para

hidroquinona ou revelador; imersão em tiosulfato de sódio ou fixador F-5 por 5 minutos; contracoloração dos núcleos com Hematoxilina.

D. Lipídios

- Método de Sudan Black (segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Fixação do material em formol cálcio; coloração em Sudan Black B por 30 minutos; lavagem em água e coloração de fundo utilizando-se vermelho neutro por 4 minutos. Posterior montagem das lâminas em glicerina gélida.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Biomonitoramento

A análise comportamental demonstrou não rejeição do solo pelos animais, uma vez que, estes foram encontrados enterrados e resolvendo a terra.

Durante o período total de exposição de 90 dias nenhuma morte foi constatada no bioensaio controle. No bioensaio contendo lodo a 1%, somente a partir da 7ª semana de exposição as primeiras mortes ocorreram; na 11ª semana, após um período de estabilidade no número de indivíduos, novas mortes voltaram a ocorrer. No bioensaio contendo lodo a 10%, o início das mortes se deu a partir da 2ª semana, até a exclusão total dos espécimens na 7ª semana. No bioensaio de lodo a 50%, as primeiras mortes foram constatadas na 3ª semana, a partir da qual se desencadearam progressivas mortes, sendo que na 5ª semana não havia mais indivíduos sobreviventes (Fig. 1).

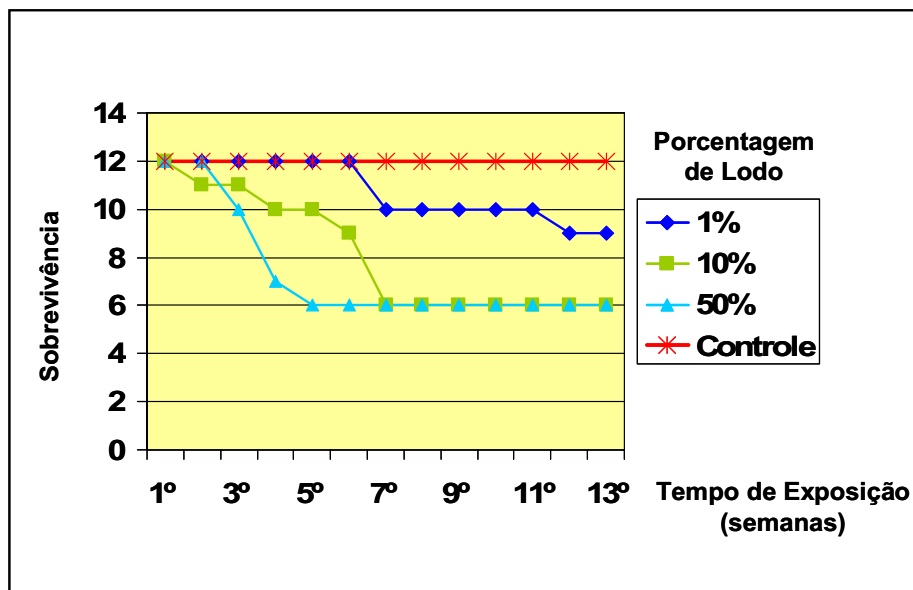


Fig.1. Sobrevivência dos diplópodos expostos a diferentes concentrações de lodo de esgoto.

O lodo de esgoto, em razão da procedência dos resíduos, pode ser classificado em doméstico ou industrial. O lodo de esgoto estritamente doméstico possui normalmente quantidade baixa de metais potencialmente tóxicos, mas quando esgotos industriais e águas da chuva entram no sistema de captação do esgoto urbano, este pode ter sua concentração de metais aumentada significativamente (USEPA, 1986). Os esgotos domésticos contêm aproximadamente 99,9 % de água. A fração restante, 0,1%, inclui sólidos orgânicos e inorgânicos, em suspensão e dissolvidos, bem como microrganismos, e constitui a causa da necessidade de tratamento de esgoto (SANTOS, 2003). Os principais parâmetros indiretos que refletem o potencial poluidor de esgotos predominantemente domésticos são: sólidos, indicadores de matéria orgânica, nitrogênio, fósforo e indicadores de contaminação fecal (VON SPERLING, 1996).

Para grandes centros urbanos, que além de densamente povoados, ainda contenham grandes áreas industriais, as quantidades e as características das substâncias removidas dos esgotos sanitários inviabilizam o seu aproveitamento no solo como solução constante de disposição final. A Região Metropolitana de São Paulo se enquadra nessa situação, visto que engloba cerca de 17 milhões de habitantes e cerca de 3,6 mil indústrias de médio de grande porte cadastradas (FIESP, 2002).

A amostra de lodo utilizada no presente projeto é proveniente de uma das cinco Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) que compõem o sistema principal de esgotamento sanitário da Região Metropolitana de São Paulo. Desta forma, tendo em vista a procedência dos seus resíduos, o lodo de esgoto utilizado é classificado como industrial apresentando maiores concentrações de substâncias potencialmente tóxicas como metais pesados quando comparado com os de origem doméstica.

A presença de metais no esgoto está associada, principalmente, ao lançamento de despejos nas redes de coletas públicas por parte de indústrias de galvanoplastia, formação de compostos orgânicos e inorgânicos, curtumes, farmacêutica, fundição, lavanderias, petróleo e formulação de corantes e pigmentos (SANTOS, 2003). Apesar da existência de um procedimento técnico e formal aplicado ao recebimento de despejos industriais, o problema é extremamente agravado pelos lançamentos clandestinos (CESÁRIO SILVA et al., 2001).

Sabendo-se que grande parte dos metais presentes no esgoto após o tratamento concentra-se no lodo, o controle sobre a qualidade dos diferentes tipos de efluentes lançados na rede coletora torna-se fundamental, quando o objetivo é destinar o lodo para aplicações benéficas no solo. Dependendo do processo industrial adotado pelas empresas, o lançamento de seus efluentes na rede coletora deve ser precedido de um pré-tratamento, para a remoção

de contaminantes que possam impossibilitar a reciclagem do lodo de esgoto (SANTOS, 2003).

Marques et al. (2007) realizou um estudo que buscou avaliar os efeitos da incorporação do lodo de esgoto, em solo cultivado com cana-de-açúcar, sobre os teores de Cr, Ni, Pb e Zn, utilizando amostras de lodo fornecidas por uma das cinco ETEs pertencentes ao sistema principal de esgotamento sanitário da Região Metropolitana de São Paulo. Os resultados mostraram que a aplicação de doses de lodo de esgoto aumentou as concentrações de Cr, Ni Pb e Zn no solo sob cultivo de cana-de-açúcar, sendo, a dose de 40 t ha⁻¹ de lodo foi a que promoveu as maiores concentrações de metais no solo.

Quando absorvidos pelos vegetais, os metais podem afetar ou impedir totalmente seu desenvolvimento. Assim, concentrações elevadas de alguns metais em lodos de esgoto resultam em ações mais restritivas quanto ao uso agrícola desses materiais em diversos países, incluindo o Brasil (EUROPEAN COMMISSION, 2002; CONAMA, 2005). Assim, é muito importante que se conheça a composição exata do lodo de diferentes localidades, para que possam ser calculadas as quantidades adequadas de lodo a serem incorporadas no solo, sem poluir o ambiente ou trazer danos aos organismos (CETESB, 1999).

Desta forma, além dos teores de nutrientes presentes no lodo de esgoto, uma avaliação preliminar dos teores de metais potencialmente tóxicos é essencial para indicar a possibilidade ou não de seu uso agrícola.

Apesar do diplópodo *Rhinocricus padbergi*, utilizado no presente trabalho como organismo-teste, ser reconhecidamente resistente a vários compostos químicos (FONTANETTI; BOCCARDO, comunicação pessoal), os resultados mostram uma alta taxa de mortalidade dos animais expostos ao substrato contendo lodo nas concentrações de 10% e 50%; isto é um indicativo da necessidade de cautela no uso deste resíduo, seja na agricultura ou na recuperação de solos degradados.

Segundo Hopkin e Read (1992), algumas espécies de milípedes preferem morrer de inanição a ingerir alimentos contaminados com níveis tóxicos de poluentes. Entretanto, foi observado que todos os espécimes, expostos em diferentes concentrações de lodo, conseguiram revolver o substrato em que se encontravam. Desta forma, durante o revolvimento do solo, estes animais se alimentaram da matéria contida no lodo de esgoto utilizado.

Em vista do exposto, acreditamos que o protocolo desenvolvido foi eficiente na análise da toxicidade do lodo de esgoto.

5.2. Análise histológica e histoquímica do intestino médio

Os resultados obtidos foram apresentados na forma de artigo, o qual foi encaminhado para publicação na revista Micron (Oxford).

ARTIGO

EXPOSIÇÃO AGUDA E SUBCRÔNICA DE DIPLÓPODOS A SUBSTRATO CONTENDO LODO DE ESGOTO: RESPOSTAS TISSULARES DO INTESTINO MÉDIO

Larissa Rosa Nogarol, Carmem Silvia Fontanetti

EXPOSIÇÃO AGUDA E SUBCRÔNICA DE DIPLÓPODOS A SUBSTRATO CONTENDO LODO DE ESGOTO: RESPOSTAS TISSULARES DO INTESTINO MÉDIO.

Larissa Rosa Nogarol^a, Carmem Silvia Fontanetti^{a,*}

^a Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Av. 24A, nº1515, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil

* fontanet@rc.unesp.br (autor correspondente)

Resumo

Várias discussões a respeito do uso agrícola do lodo de esgoto têm acontecido, porém seu uso tem sido questionado devido aos riscos de contaminação do solo principalmente por metais. Os diplópodos são invertebrados saprófagos, ágeis em colonizar diversas camadas do solo. Devido ao hábito do grupo, muitos pesquisadores têm proposto sua utilização em análises ecotoxicológicas. Este trabalho objetivou expor esses invertebrados a substrato contendo lodo de esgoto de uma dada ETE (Estação de Tratamento de Esgoto) do estado de São Paulo, Brasil e analisar seu potencial tóxico por meio da análise morfológica do intestino médio do diplópodo *Rhinocricus padbergi*, região do tubo digestório onde ocorre a digestão. Os animais foram expostos por períodos de 7, 15 e 90 dias em concentrações de lodo a 1%, 10% e 50% misturados a terra oriunda do local de coleta. Os animais do grupo controle não apresentaram alterações em todos os tempos de exposição. Como resposta aguda a exposição dos animais (7 dias), observou-se nos animais expostos a 1% e a 10% de lodo um aumento na renovação do epitélio e na liberação de vesículas de secreção de conteúdo glicoproteico. Nos animais expostos a 50% de lodo, a principal alteração observada foi o aumento no número de grânulos citoplasmáticos nas células da camada de corpo gorduroso; o epitélio pareceu estar em processo de reorganização em todos os indivíduos observados, sugerindo uma intensa renovação epitelial. No período intermediário de exposição (15 dias), nos animais expostos a lodo 1% foi observado aumento no número de hemócitos entre as células da camada de corpo gorduroso, tanto distribuídos isoladamente quanto agrupados; os animais expostos a lodo 10% apresentaram a mesma evidência de renovação epitelial observada nos animais expostos por 7 dias na concentração de 50% de lodo; foi observado também o aumento no número de hemócitos, os quais reagiram fortemente à técnica de PAS. Grânulos citoplasmáticos nas células hepáticas, células da camada de corpo gorduroso e hemócitos também foram

observados em grande número, sendo que grande parte apresentou cálcio na sua constituição. Nos animais expostos ao lodo 50% a alteração observada foi a presença de numerosas vesículas de secreção de liberação do tipo apócrina por todo o epitélio de aspecto vacuolizado; células hepáticas com grânulos citoplasmáticos também foram observadas. Como resposta subcrônica (90 dias), observou-se todas as células da camada de corpo gorduroso completamente tomadas por grânulos citoplasmáticos, nas quais foi detectada a presença de cálcio; tais grânulos também foram constatados no domínio apical das células epiteliais principais. Esses resultados sugerem a existência de agentes tóxicos na amostra de lodo analisada cujas diferentes concentrações, desencadeiam respostas que ocorrem de diferentes maneiras, intensidades e velocidades as quais evitam a entrada e a ação dos agentes tóxicos no organismo do invertebrado estudado.

Palavras-chave: milípede; toxicidade de solo; histopatologia; histoquímica; histologia; ETE.

1. Introdução

As alterações morfológicas podem ser empregadas nas investigações da toxicidade de compostos químicos específicos e no monitoramento dos efeitos agudo e crônico, em ambientes impactados. Tais alterações morfológicas podem proporcionar indícios qualitativos de uma adaptação funcional ao ambiente externo (Meyers e Hendricks, 1985). A avaliação qualitativa dessas mudanças antes da morte do organismo fornece indicações antecipadas de toxicidade. Neste contexto, a histologia passou a ser amplamente utilizada em estudos com invertebrados, visando a identificação de diferentes danos causados por substâncias nocivas aos organismos (Triebkorn et al., 1999).

Paoletti et al. (1991) enfatizam que, de maneira geral, os invertebrados do solo indicam eficientemente determinadas alterações nos ecossistemas terrestres, uma vez que são sensíveis a mudanças ambientais. Desta forma, variações fisiológicas de órgãos e tecidos podem ocorrer, sendo prontamente detectadas na análise de células (Köhler e Triebkorn, 1998). Dependendo da intensidade do fator estressante e do tipo de órgão afetado, as alterações celulares podem ser diversas.

Os diplópodos são invertebrados saprófagos, ágeis em colonizar diversas camadas de solo, vivendo em lugares úmidos que lhes ofereçam nutrientes para o seu desenvolvimento (Hopkin e Read, 1992). A colonização dos diplópodos no solo fornece maior aeração e condições favoráveis ao trabalho de decomposição de fungos e bactérias, promovendo a mineralização e a dinâmica de nutrientes. Além disso, os produtos de excreção dos diplópodos

(amônia e ácido úrico), quando degradados, enriquecem o solo com nitratos (Boccardo e Pentead, 1997).

Devido ao hábito dos diplópodos, eles têm sido considerados bons indicadores ambientais, sendo utilizados como organismos-testes em algumas análises de solo (Hopkin et al., 1985; Triebkorn et al., 1991; Köhler e Triebkorn, 1998).

A crescente população dos centros urbanos é importante produtora de diversos resíduos, dentre os quais se pode destacar o lodo de esgoto que apresenta potencialidades para utilização agrícola e na recuperação de solos degradados, visto que contém considerável percentual de matéria orgânica e de elementos essenciais para as plantas, podendo substituir, ainda que parcialmente, os fertilizantes minerais. Entretanto, o lodo de esgoto também pode conter diferentes concentrações de elementos, potencialmente tóxicos, como contaminantes orgânicos e inorgânicos, além de patógenos, os quais ficam retidos nos nutrientes do esgoto. Assim, para viabilizar a aplicação do lodo de esgoto na agricultura e na recuperação de solos degradados, é necessário que este passe por uma caracterização quanto ao seu potencial agrônomo, às substâncias inorgânicas e orgânicas potencialmente tóxicas, à presença de agentes patogênicos, além de estudos sobre a sua estabilidade no ambiente (MMA, 2006).

Neste sentido, considerando os hábitos dos diplópodos e o número reduzido de trabalhos utilizando-os como ferramentas de avaliação de potenciais contaminantes ambientais, este estudo utilizou tais invertebrados como bioindicadores de solo, por meio da análise dos efeitos tóxicos do lodo de esgoto de uma dada ETE (Estação de Tratamento de Esgoto) do estado de São Paulo no intestino médio do diplópodo *Rhinocricus padbergi*, região do tubo digestório onde ocorre a digestão. Essa espécie foi escolhida devido à sua abundância e fácil coleta na região onde o estudo foi desenvolvido, além de já ter sido estudada sob diferentes ópticas (Camargo-Mathias et al., 1998; 2004; Fantazzini et al., 1998; 2002; Camargo-Mathias e Fontanetti, 2000; Fontanetti e Camargo-Mathias, 2004a, b; Fontanetti et al., 2004; 2006).

2. Materiais e Métodos

2.1. Bioensaios

Espécimens adultos de *R. padbergi* foram coletados manualmente no campus da Universidade Estadual Paulista (UNESP) em Rio Claro (22°24'36''S; 47°33'36''W), SP, Brasil, em fevereiro de 2008, e trazidos ao laboratório onde foram mantidos em terra oriunda do local de coleta. Em seguida, foram aclimatados por um período de 15 dias à temperatura de

21±2°C, respeitando as condições ambientais do local de coleta como fotoperíodo, umidade relativa do ar e temperatura.

Após este período, os diplópodos foram expostos a substratos contendo lodo de esgoto oriundo da ETE AT-1, localizada na região hidrográfica da Bacia do Alto Tietê. De acordo com o Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo (DAEE) (2004 - 2007), a ETE AT-1 é uma das cinco grandes ETEs que recebem quase a totalidade dos esgotos coletados da Região Metropolitana de São Paulo, densamente povoada, abrangendo indústrias de médio e grande porte. Desta forma, o lodo gerado na ETE AT-1 contém componentes domésticos e industriais.

Foram montados quatro bioensaios contendo terra proveniente do local de coleta dos animais (grupo controle) e o lodo de esgoto em diferentes concentrações (1%, 10% e 50%) misturada na mesma terra do controle. Em cada bioensaio preparado foram expostos 12 animais, por períodos de 7, 15 e 90 dias, com a finalidade de analisar respostas aguda e subcrônica.

2.2. Histologia e Testes Histoquímicos

Espécimes de *R. padbergi* foram anestesiados com éter sulfúrico e dissecados em solução fisiológica; o material foi fixado em duas soluções formol cálcio 4% e Carnoy (6 álcool: 3 clorofórmio: 1 ácido acético). Posteriormente o material foi desidratado em séries graduais de etanol 70-95%, e embebido em resina JB-4 a 4°C por 24 h. O material foi inicialmente embebido a 4°C a fim de evitar a polimerização prematura, depois da qual a embebição foi completada em temperatura ambiente. Secções de 5 µm de espessura foram obtidas com o auxílio de um micrótomo e navalhas de vidro e depois coradas com hematoxilina e eosina (HE) ou submetidas a testes histoquímicos.

Testes histoquímicos para a detecção de proteínas (Azul de Bromophenol de acordo com Pearse, 1985), lipídeos (Sudan Black segundo Junqueira e Junqueira, 1983), polissacarídeos neutros (método PAS, segundo Junqueira e Junqueira, 1983) e cálcio (Método von Kossa segundo Junqueira e Junqueira, 1983) foram aplicados.

3. Resultados

Grupo Controle

Os grupos controle dos períodos de 7, 15 e 90 dias apresentaram o intestino médio conforme o padrão histológico descrito para a espécie (Fantazzini et al., 2002), sendo, portanto, constituído por um epitélio pseudoestratificado com bordo em escova, seguido de

camada muscular, uma camada de corpo gorduroso, revestido por uma membrana externa (Fig. 1A). As células da camada de corpo gorduroso possuem morfologia irregular e inúmeros grânulos em seu citoplasma, de aparência variada (setas nas Figs. 1B, C); por entre as células do corpo gorduroso podem ser observados raros hemócitos isolados (Fig. 1B) ou agrupados. Logo abaixo da camada muscular estão presentes células hepáticas, que se distribuem sem formar uma camada contínua, ou seja, aparecem dispersas (Fig. 1C). Foram observadas poucas vesículas de secreção do tipo apócrina sendo liberadas em direção ao lúmen.

As análises histoquímicas para polissacarídeos neutros, proteínas totais, lipídios e cálcio também apresentaram o padrão descrito para a espécie. Quanto à detecção de proteínas, as células principais, o corpo gorduroso e a camada muscular reagiram positivamente (Fig. 2A). Os polissacarídeos neutros foram detectados na membrana basal, em algumas células do corpo gorduroso e no bordo em escova (Fig. 2B). Os lipídios foram detectados na região médio-apical do citoplasma das células principais do epitélio e nas células do corpo gorduroso (Fig. 2C). O material submetido à técnica de von Kossa demonstrou a distribuição de cálcio pelas células principais do epitélio como uma fina granulação; grande parte dos grânulos citoplasmáticos observados nas células do corpo gorduroso também reagiu positivamente à detecção de cálcio (Fig. 2D).

Exposição Aguda

Nos animais expostos por sete dias nas concentrações de 1% e 10%, observaram-se freqüentes pontos de renovação epitelial, verificada pela liberação de células com núcleos claros, aparentemente vacuolizados, para o lúmen intestinal (setas nas Figs. 3A, C). Além disso, também foi evidenciado o aumento na liberação de secreção pelas células epiteliais quando comparado com o grupo controle (Fig. 3A-D). Por meio da aplicação das técnicas de azul de bromofenol (Fig. 3B) e PAS (Fig. 3C), demonstrou-se a natureza glicoproteica das vesículas de secreção com predominância das proteínas. Tais vesículas reagiram moderadamente à técnica de detecção de cálcio (Fig. 3D).

Nos espécimes expostos a lodo 50%, foram observadas, em diversos pontos do epitélio, células mais baixas que o normal, evidenciando pontos de renovação epitelial (* na Fig. 3E). Observou-se também um aumento no número de grânulos citoplasmáticos nas células do corpo gorduroso (setas na Fig. 3E). Por meio da aplicação da técnica de von Kossa, foi constatado que a maioria das grânulos citoplasmáticas apresenta cálcio em sua constituição (setas na Fig. 3F). Não foram observadas alterações na detecção de lipídeos.

Período Intermediário de Exposição

A análise histológica referente aos animais expostos por 15 dias na concentração de 1% revelou um aumento considerável no número de hemócitos por entre as células do corpo gorduroso, sendo que os mesmos apareceram tanto isolados quanto formando aglomerações (Fig. 4A). Não foram observadas alterações na análise histoquímica deste grupo.

Em relação aos espécimes expostos a lodo 10%, foi observado a mesma evidência de renovação epitelial observada nos animais expostos agudamente a lodo 50%, descrita acima (* na Fig. 4B). Foi observado também um aumento no número de hemócitos presentes por entre as células do corpo gorduroso; tais células reagiram fortemente à reação de PAS (Fig. 4C). Além disso, foi constatado um aumento de grânulos citoplasmáticos nas células hepáticas (setas na Fig. 4B) e nas células do corpo gorduroso. O material submetido à técnica de von Kossa demonstrou que a maioria destes grânulos citoplasmáticos apresenta cálcio em sua constituição.

Nos animais expostos ao lodo 50%, foi observada a liberação de numerosas vesículas de secreção do tipo apócrina por a toda a extensão do epitélio em direção ao lúmen intestinal. O aspecto das vesículas encontradas nestes animais divergiu do típico aspecto homogêneo das vesículas secretadas em menores quantidades nos animais controle; as observadas neste grupo apresentavam aspecto vacuolizado (Fig. 4D). Tais vesículas de secreção apresentaram também conteúdo glicoproteico, com predominância de proteínas. Observou-se a presença de células hepáticas com vários grânulos citoplasmáticos (setas na Fig. 4D). Não foram observadas alterações referentes ao conteúdo lipídico.

Exposição Subcrônica

Os animais expostos ao lodo de esgoto nas concentrações 10% e 50% morreram antes dos 90 dias de exposição, tempo previsto inicialmente para se obter uma resposta subcrônica. Desta forma, a obtenção do material para as análises histológica e histoquímica dos animais expostos a tais concentrações só foi possível para 7 e 15 dias.

A análise histológica referente aos animais sobreviventes aos 90 dias de exposição nas concentrações de 1% revelou as células do corpo gorduroso repletas de grânulos citoplasmáticos (setas na Fig 4E); estes apresentavam alto conteúdo de cálcio, constatado por meio da técnica de von Kossa (Fig 4F). Estes grânulos foram observados também no domínio apical das células epiteliais principais (setas na Fig 4F). Não foram observadas alterações relacionadas a integridade das células epiteliais principais e nas análises histoquímicas referentes ao conteúdo lipídico, protéico e de polissacarídeos neutros quando comparados ao grupo controle.

4. Discussão

Atualmente, as principais limitações da disposição benéfica do lodo de esgoto no solo referem-se principalmente aos riscos de contaminação com metais, microrganismos patogênicos, poluentes orgânicos, além da lixiviação de nitrogênio e fósforo, contaminando o lençol freático e as águas superficiais (Santos, 2003).

Dentre os fatores determinantes da composição química do lodo de esgoto estão o método de tratamento, a variabilidade sazonal e o tipo e grau de industrialização da região onde são gerados os esgotos (Sommers et al., 1996). Desta forma, a concentração de metais potencialmente tóxicos no solo está intimamente relacionada com a atividade e o desenvolvimento urbano e industrial da área que abastece a estação de tratamento.

A amostra de lodo utilizada no presente estudo é proveniente de uma das cinco ETEs que compõem o sistema principal de esgotamento sanitário da Região Metropolitana de São Paulo, densamente povoada abrigando milhares de indústrias de grande e médio porte. Desta forma, tendo em vista a procedência dos seus resíduos, o lodo de esgoto utilizado é classificado como industrial apresentando maiores concentrações de substâncias potencialmente tóxicas como metais quando comparado com os de origem doméstica (Tsutiya, 1999).

Sabendo-se que grande parte dos metais presentes no esgoto após o tratamento concentra-se no lodo, o controle sobre a qualidade dos diferentes tipos de efluentes lançados na rede coletora torna-se fundamental quando o objetivo é destinar o lodo para aplicações benéficas no solo (Santos, 2003). Além disso, o solo possui grande capacidade de retenção de metais, porém, se essa capacidade for ultrapassada, os metais podem entrar na cadeia alimentar dos organismos vivos (Elliot, 1986).

Segundo Hopkin e Read (1992), algumas espécies de milípedes preferem morrer de inanição a ingerir alimentos contaminados com níveis tóxicos de poluentes. Entretanto, foi observado que todos os espécimes deste experimento, expostos em diferentes concentrações de lodo, conseguiram revolver o substrato em que se encontravam. Desta forma, durante o revolvimento do solo, estes animais se alimentaram da matéria contida no lodo de esgoto utilizado.

O epitélio do sistema digestório de invertebrados terrestres é geralmente, composto por apenas uma camada de células que atuam como uma barreira entre o ambiente interno do animal e o alimento no lúmem. Em algumas espécies de diplópodos, o epitélio intestinal pode não funcionar eficientemente como uma barreira à passagem de determinadas substâncias do lúmem para outros tecidos do corpo, como os metais (Hopkin et al., 1985).

Devido a essa possível deficiência, de uma forma geral, as análises histológica e histoquímica revelaram alterações tanto no epitélio quanto no corpo gorduroso constituintes do intestino médio dos animais expostos em diferentes concentrações de lodo, visto que, o impacto de poluentes em um organismo é percebido através de perturbações em diferentes níveis de complexidade funcional. Segundo Köhler et al. (1995), diplópodos podem metabolizar e/ou acumular vários tipos de íons de metais, principalmente no intestino médio e no corpo gorduroso.

No presente estudo, foram observadas as seguintes respostas tissulares agudas: o aumento da renovação epitelial, da liberação de vesículas de secreção e do número de grânulos citoplasmáticos.

As células do epitélio, expostas diretamente aos poluentes, estão sujeitas a alterações que podem resultar na morte ou renovação das mesmas. A renovação deve ser feita pelas células regenerativas localizadas na base das células epiteliais principais, e as células mortas devem ser esfoliadas ou fagocitadas. Desta forma, a morte celular atua como uma resposta fisiológica, permitindo a remoção de células ou tecidos alterados, exercendo um importante papel na manutenção da estrutura do órgão e/ou tecidos e impedindo que suas funções sejam alteradas por fatores externos (Mello e Castilho, 2007).

Em relação às vesículas de secreção observadas, as mesmas, possivelmente, desempenham a função de proteger o tecido contra a entrada de substâncias potencialmente tóxicas contidas no lodo de esgoto, além de eliminar os agentes tóxicos previamente absorvidos.

O aumento na produção de muco, como uma resposta à presença de poluentes no ambiente, é bem conhecido em diferentes grupos. Em 1991, Triebkorn et al. expuseram vários invertebrados como camarões, planárias, ácaros, insetos e diplópodos, a diferentes agentes tóxicos a fim de demonstrar, por meio da análise ultraestrutural, a conveniência do uso de invertebrados no biomonitoramento. Os pesquisadores concluíram que cada animal apresentou uma estratégia de defesa e que o tipo de dano depende do tecido, da espécie considerada assim como da substância tóxica. Planárias e lesmas, por exemplo, aumentam a produção de muco.

Segundo Pakarinen (1994), o aumento da liberação de muco acompanhada da intensa produção do mesmo é uma resposta proeminente de lesmas a diversos estressores, como dessecação e irritação por substâncias químicas. Em ambientes aquáticos, essas respostas foram observadas em moluscos bivalves (David e Fontanetti, 2005; 2009) e em peixes (Biagini et al., 2009).

Sze e Lee (1995), por meio de estudos com moluscos bivalves expostos a metais, levantaram hipóteses a fim de explicar o aumento de produção de muco: o muco é produzido a fim de seqüestrar metais e então ser excretado; ou os metais absorvidos por todo o corpo são concentrados no muco e então lançados para o ambiente.

Os animais expostos a lodo 50% por sete dias apresentaram a mesma resposta aguda em relação ao epitélio quando comparados com os animais expostos a menores concentrações. Entretanto, essa resposta se deu de forma mais rápida e intensa no grupo exposto a maiores concentrações do lodo, visto que uma mudança na organização do epitélio foi constatada.

A alteração verificada na camada de corpo gorduroso foi o aumento na quantidade de grânulos citoplasmáticos no interior de suas células, contendo principalmente cálcio em sua constituição. Um dos mecanismos de detoxicação descrito para invertebrados é a precipitação de metais como grânulos intracelulares de diferentes tipos (Hopkin, 1989). Depois da estocagem em vacúolos digestivos, os metais podem ser excretados por liberação direta de vesículas secretoras para o lúmen intestinal ou por substituição do epitélio intestinal (Hubert, 1979). Portanto, os grânulos vindos do lúmen intestinal através das células epiteliais são estocados nas células da camada de corpo gorduroso para posterior liberação. Possivelmente, este é um mecanismo de detoxicação no diplópodo estudado.

Simkiss e Mason (1984), em estudo das respostas celulares de tecidos de moluscos a metais, dizem que tais contaminantes podem se ligar a matriz orgânica do grânulo. Diante do exposto, espera-se que tal ligação entre grânulo e metal seja uma forma de detoxicação, uma vez que são mais fáceis de serem excretados por meio dos vacúolos no lúmen no intestino médio tornando-se inofensivo.

Segundo Brown (1982), os órgãos cujas funções incluem a digestão, armazenamento ou excreção são os principais locais onde se encontram os grânulos. Isto é constatado em diplópodos, isópodos e colêmbolos, assim como em outros invertebrados terrestres cujo epitélio, por exemplo, do trato digestivo, é composto usualmente de uma fina camada de células (Hopkin, 1990).

Em relação às respostas observadas no período intermediário de exposição, ou seja, entre a exposição aguda e subcrônica, foram evidenciadas algumas alterações tissulares semelhantes àquelas constatadas em sete dias de exposição como reorganização epitelial, aumento de grânulos citoplasmáticas e aumento na liberação de vesículas de secreção. Além disso, o aumento no número de hemócitos encontrados isolados e/ou agrupados também foi observado.

Entretanto, as vesículas de secreção observadas apresentaram aspecto divergente daquele encontrado em secreções homogêneas típicas dos animais do grupo controle e nos animais expostos por sete dias a lodo 1% e 10%, visto que as mesmas apresentaram aspecto vacuolizado. Tais vesículas de secreção são do tipo apócrina, ou seja, ao liberarem seu conteúdo carregam parte do citoplasma consigo. A exposição ao lodo de esgoto provocou danos às células epiteliais principais, como a perda da integridade de algumas; tais danos teriam atingido o citoplasma, dando início a um processo de vacuolização, observado nas vesículas de secreção.

De acordo com Edinger e Thompson (2004), a necrose caracteriza-se morfológicamente pela vacuolização do citoplasma. A necrose é induzida por injúria severa, a exemplo do que pode acontecer sob a ação de altas concentrações de substâncias tóxicas que geram uma falha no metabolismo (Sanchez-Torres e Vargas, 2003). Desta forma, segundo Rabito et al. (2005), a presença de necrose é um dos danos mais visíveis nos tecidos afetados por um poluente.

No presente estudo, o aumento no número de hemócitos tanto isolados quanto agrupados por entre as células do corpo gorduroso, pode ser um indicativo da ocorrência de lesão tecidual com provável processo inflamatório.

O processo inflamatório, sob determinado ponto de vista, pode ser considerado como um mecanismo de defesa do organismo e, como tal, atua destruindo, diluindo e isolando ou seqüestrando o agente agressor, além de abrir caminho para os processos reparativos, como a regeneração do tecido afetado (Zweifach et al., 1974).

Em estudo histopatológico realizado com as brânquias do bivalve marinho *Mytella falcata* (David et al., 2008) exposto cronicamente a poluição, também foi constatado o aumento do número de hemócitos no vaso da hemolinfa, resultando na deformação do filamento branquial. Os autores o consideram como sinal de mecanismo de defesa que pode ser revertido caso a exposição cesse.

Desta forma, apesar de ser um importante mecanismo de defesa do organismo, é necessário que o processo de inflamação seja regulado de forma eficiente, uma vez que uma resposta inflamatória exagerada ou descontrolada pode ocasionar o desenvolvimento de histopatologias e, conseqüentemente, a perda da função do órgão ou tecido afetado.

No presente estudo, os diplópodos apresentaram diferentes respostas tissulares visando inativar, estocar e/ou excretar os conteúdos tóxicos do lodo de esgoto. A análise comparativa das alterações observadas parece indicar que a exposição a maiores concentrações da amostra de lodo pode acelerar algumas respostas tissulares. Por exemplo, o aumento de grânulos

citoplasmáticos ocorreu como resposta aguda aos animais expostos a lodo 50% e como resposta subcrônica aos animais expostos a lodo 1%.

Além disso, os animais expostos a maiores concentrações do lodo parecem armazenar e estocar toxicantes em grânulos citoplasmáticos nas células do corpo gorduroso no início da exposição, sendo que com a continuidade do contato com o lodo faz com que esse mecanismo de defesa chega ao seu máximo. Desta forma, a fim de expulsar estas substâncias tóxicas do epitélio, antes que cheguem a hemolinfa e ao restante do organismo, o animal aumenta consideravelmente a liberação de vesículas de secreção. Por outro lado, os animais expostos a lodo 1% somente apresentaram tais respostas após um longo período de exposição.

Os animais expostos a lodo 10% apresentaram uma intensa renovação celular como resposta aguda, além do aumento da liberação de vesículas de secreção. Posteriormente, foi possível observar alterações na morfologia das células epiteliais, como indício de reorganização epitelial possivelmente devido a aceleração no processo de renovação celular.

Godoy e Fontanetti (2006) expuseram diplópodos a lodo de esgoto puro proveniente da ETE AT-1, a mesma utilizada no presente trabalho, por períodos de uma e duas semanas. Os indivíduos do grupo controle apresentaram os padrões histológico e histoquímico descrito para a espécie. No grupo exposto por uma semana ao lodo de esgoto não foi observada nenhuma alteração morfológica no intestino médio, mas observou-se uma grande quantidade de glóbulos nas células do corpo gorduroso, constituídos por substâncias glicoprotéicas, evidenciadas na análise histoquímica. Não houve diferenças nesse grupo na quantidade de lipídios e cálcio quando comparado com o grupo controle.

Por outro lado, o grupo exposto por duas semanas ao lodo de esgoto apresentou uma intensa renovação epitelial. Foi observado neste grupo um maior número de hemócitos, agrupados ou isolados, em algumas regiões do corpo gorduroso, indicando lesão celular com provável processo inflamatório. Possivelmente as diferenças nas respostas tissulares dos espécimes utilizados pelas autoras, quando comparadas com o presente estudo, estejam relacionadas às diferentes concentrações de exposição do lodo e, em especial, ao fato de que a composição e a qualidade de efluentes líquidos, principalmente de estações de tratamento que recebem despejos domésticos e industriais, pode variar muito ao longo do tempo devido a alterações na quantidade e qualidade dos efluentes, e também devido a variações na eficiência do sistema de tratamento. Desta forma, essas variações se refletem na toxicidade do despejo como um todo (USEPA, 1985 apud Zagatto et al., 1992).

As respostas tissulares agudas encontradas no grupo exposto a lodo 1% foram similares às encontradas nos animais expostos a lodo 10%, entretanto as respostas de período

intermediário de exposição foram distintas visto que mantiveram o epitélio íntegro durante todo o período de exposição. Provavelmente, ao contrário do rápido e desordenado processo de renovação celular encontrado nos animais expostos a lodo 10%, o epitélio destes animais expostos à pequena concentração do lodo pode se renovar de forma adequada. Segundo Tribeskorn et al. (1991), a detoxicação torna-se possível apenas se as concentrações do agente tóxico não excederem um determinado valor. Caso isto ocorra, a toxicidade resulta em danos celulares ou inibição do desenvolvimento celular. Possivelmente, devido a isso os animais expostos a lodo 1% foram os únicos que sobreviveram ao período de exposição subcrônica de 90 dias.

Desta forma, os baixos níveis de toxicantes presentes no lodo de esgoto puderam ser estocados lentamente gerando respostas subcrônicas relacionadas ao aumento no número de hemócitos e posterior aumento dos grânulos citoplasmáticos nas células do corpo gorduroso e liberação de numerosas vesículas de secreção.

Com base no exposto, dependendo das concentrações dos agentes tóxicos, as respostas obtidas podem se dar de diferentes maneiras, intensidades e velocidades, sendo constatadas, principalmente, pela renovação epitelial, aumento de secreção, do número de hemócitos e de grânulos citoplasmáticos nas células do corpo gorduroso do diplópodo aqui estudado.

Este trabalho contribui com informações, alertando para a necessidade de cuidados no uso de lodo de esgoto para a recuperação de solos impactados, uma vez que pouco se sabe sobre seus efeitos na fauna edáfica.

Agradecimentos

As autoras agradecem FAPESP, CNPq e FUNDUNESP pelo suporte financeiro, Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro, Engenheira Samira Issa e Marcus da Matta por cederem amostras do lodo de esgoto, Cristiane M. Miléo pelas ilustrações, Gerson Mello Souza pelo apoio técnico, Raphael Bastão de Souza, Vlamir Bozzatto de Oliveira e Danielli Giuliano Perez pela ajuda durante os experimentos.

Referências Bibliográficas

Biagini, F.R., David, J.A.O., Fontanetti, C.S., 2009. The use of histological, histochemical and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted waters. *Micron (Oxford)* 40, 839-844.

Boccardo, L., Penteado, C.H.S., 1997. Nossos amigos, os piolhos-de-cobra. *Jornal Verde* 69, 8.

Brown, B.E., 1982. The form and function of metal-containing 'granules' in invertebrate tissues. *Biol. Rev.* 57, 621-667.

Camargo-Mathias, M.I., Fontanetti, C.S., Micó-Balaguer, E., 1998. Histochemical studies of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff ovaries (Diplopoda, Spirobolida, Rhinocricidae). *Cytobios* 94, 169-184.

Camargo-Mathias, M.I., Fontanetti, C.S., 2000. Ultrastructural features of the fat body and oenocytes of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Diplopoda, Spirobolida). *Biocell Mendoza* 24, 1, 1-12.

Camargo-Mathias, M.I., Fantazzini, E.R., Fontanetti, C.S., 2004. Ultrastructural features of the midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda: Spirobolida). *Braz. J. morphol. Sci.* 21, 2, 65-71.

DAEE - Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo. Conselho Estadual de Recursos Hídricos. Plano Estadual de Recursos Hídricos: 2004 / 2007 Resumo. São Paulo, DAEE, 2006. 92p.

David, J.A.O., Fontanetti, C.S., 2005. Surface morphology of *Mytella falcata* gill filaments from three regions of Santos estuary. *Brazilian Journal of Morphological Sciences* 22, 4, 203-210.

David, J.A.O., Salaroli, R.B., Fontanetti, C.S., 2008. The significance of changes in *Mytella falcata* (Orbigny, 1842) gill filaments chronically exposed to polluted environments. *Micron (Oxford)* 39, 1293-1299.

David, J.A.O., Fontanetti, C.S., 2009. The role of mucus in *Mytella falcata* (Orbigny, 1842) gills from polluted environments. *Water, Air, and Soil Pollution* 200, 1-6.

Edinger, A.L., Thompson, C.B., 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology* 16, 663-669.

Elliot, H.A., 1986. Land application of municipal sewage sludge. *J. Soil Water Conserv.* 41, 5-10.

Fantazzini, E.R., Fontanetti, C.S., Camargo-Mathias, M.I., 1998. Anatomy of the digestive tube, histology and histochemistry of the foregut and salivary glands of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda, Rhinocricidae). *Arthropoda Selecta* 7, 256-264.

Fantazzini, E.R., Fontanetti, C.S., Camargo-Mahtias, M.I., 2002. Midgut of the millipede "*Rhinocricus padbergi*" Verhoeff, 1938 (Diplopoda: Spirobolida): histology and histochemistry. *Arthropoda Selecta* 11, 135-142.

Fontanetti, C.S., Camargo-Mathias, M.I., 2004a. External morphology of the antennae of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 (Diplopoda: Spirobolida). *Braz. J. morphol. Sci.* 21, 2, 73-79.

Fontanetti, C.S., Camargo-Mathias, M.I., 2004b. Presence of calcium in oocytes of the diplopod *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Spirobolida, Rhinocricidae). *Acta Histochemica et Cytochemica* 37, 5, 301-306.

Fontanetti, C.S., Camargo-Mathias, M.I., Tiritan, B. M. S., 2004. The fat body in *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda, Spirobolida). *Iheringia.* 94, 4, 351-355.

Fontanetti, C.S., Tiritan, B., Camargo-Mathias, M.I., 2006. Mineralized bodies in the fat body of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). *Braz. J. morphol. Sci.* 23, 3-4, 487-493.

Godoy, J.A.P., Fontanetti, C.S., 2006. Physiological disturbance in the digestive tract of the millipede *Rhinocricus padbergi* exposed to sewage sludge. In: XIII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular (IV International Symposium on Extracellular Matrix), 2006, Búzios. *Anais SBBC/SIMEC* 126-126.

Hopkin, S.P., 1989. *Ecophysiology of Metals in Terrestrial Invertebrates*. Elsevier Applied Science, Barking, UK.

Hopkin, S.P., 1990. Critical concentrations, pathways of detoxification and cellular ecotoxicology of metals in terrestrial arthropods. *Funct. Ecol.* 4, 321-327.

Hopkin, S.P., Read, H.J., 1992. *The biology of millipedes*. Oxford University Press, New York.

Hopkin, S.P., Watson, K., Martin, M. H., Mould, M. L., 1985. The assimilation of heavy metals by *Lithobius variegatus* and *Glomeris marginata* (Chilopoda; Diplopoda). *Bijdr. Dierk.* 55, 1, 88-94.

Hubert, W., 1979. The midgut of *Tomocerus minor* Lubbock (Insecta: Collembola): ultrastructure, cytochemistry, ageing and renewal during a moulting cycle. *Cell Tissue Res.* 196, 39-57.

Junqueira, L.C.U., Junqueira, M.M.S., 1983. *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia*. Livraria Editora Santos, São Paulo.

Köhler, H.R., Triebskorn, R., 1998. Assessment of the cytotoxic impact of heavy metals on soil invertebrates using a protocol integrating qualitative and quantitative components. *Biomarkers* 3, 2, 109-127.

Köhler, H.R., Körtje, K.H., Alberti, G., 1995. Content, absorption quantities and intracellular storage sites of heavy metals in Diplopoda (Arthropoda). *BioMetals* 8, 37-46.

Mello, M.L.S., Castilho, R.F., 2007. Morte celular, in: Carvalho, H.E., Recco-Pimentel, S.M. (Eds.), *A célula*. Manole Ltda, Barueri (SP), pp. 364-373.

Meyers, T.R., Hendricks, J.D., 1985. Histopathology, in: Rand, G.M., Petrocelli, S.R. (Eds.), *Fundamental of aquatic toxicology: methods and applications*. Hemisphere Pub., Washington, pp. 283-331.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Brasil, 2006. Resolução nº 375, de 29 de agosto de 2006. Brasília.

Pakarinen, E., 1994. The importance of mucus as a defense against carabid beetles by the slugs *Arion fasciatus* and *Deroceras reticulatum*. *Journal of Molluscan Studies*, 60, 149-155.

Paoletti, M.G., Favretto, M.R., Stinner, B.R., Purrrigton, F.F., Bater, J.E., 1991. Invertebrates as bioindicators of soil use. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 34, 1, 341-362.

Pearse, A.G.E., 1985. *Histochemistry: Theoretical and Applied*. Churchill.

Rabitto, I.S., Costa, J.R.M.A., Silva de Assis, H.C., Randi, M.A.F., Akaishi, F.M., Pelletier, E., Oliveira Ribeiro, C.A., 2005. Dietary Pb(II) and TBT (tributyltin) exposures to neotropical fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 147–156.

Sanches-Torres, L.E., Vargas, F.D., 2003. Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Anales de la Sociedad Mexicana de Historia de la Ciencia y de la Tecnología* 41, 1, 49-62.

Santos, A.D., 2003. Estudo das possibilidades de reciclagem dos resíduos de tratamento de esgoto da Região Metropolitana de São Paulo. Dissertação (Mestrado em Engenharia), Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo/ SP. 282p.

Simkiss, K., Mason, A.Z., 1984. Cellular responses of molluscan tissue to environmental metals. *Mar. Environ. Res.* 14, 103-118.

Sommers, L.E., Nelson, D.W., Yost, K.J., 1976. Variable nature of chemical composition of sewage sludges. *Journal of Environmental Quality* 5, 303-306.

Sze, P.W.C., Lee, S.Y., 1995. The potential role of mucus in the depuration of copper from the mussels *Perna viridis* (L.) and *Septifer virgatus* (Wiegmann). *Marine Pollution Bulletin* 31, 390-393.

Triebskorn, R., Henderson, I.F., Martin, A.P., 1999. Detection of iron in tissues from slugs (*Deroceras reticulatum* Müller) after ingestion of iron chelates by means of energy-filtering transmission electron microscopy (EFTEM). *Pestic. Sci.* 55, 55-61.

Triebskorn, R., Köhler, H.R., Zanh, T., Vogt, G., Ludwing, M., Rumpf, S., Kratzmann, M., Alberti, G., Storch, V., 1991. Invertebrate cells as targets for Hazardous substances ziet. *Fur angewandte Zool.* 78, 277-287.

Tsutiya, M.T., 1999. Metais pesados: o principal fator limitante para o uso agrícola de biossólidos das estações de tratamento de esgoto. In: 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Anais do 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Rio de Janeiro: ABES, 1999.

Zagatto, P.A. et al., 1992. Avaliação de toxicidade em sistema de tratamento biológico de afluentes líquidos. *Revista SABESP* 166, 1-6.

Zweifach, B.W., Grant, L., McCluskey, R.T., 1974. *The Inflammatory Process*. Academic Press, New York.

LEGENDAS

Figuras 1A – C: Intestino médio de *R. padbergi* corado com hematoxilina e eosina. Grupo controle.

cg= corpo gorduroso; e= epitélio; h = hemócito; cm= camada muscular; ch= célula hepática; cabeça de seta = bordo em escova; setas em B e C = grânulos citoplasmáticos. Escala = 20 μ m.

Figuras 2A – D: Intestino médio de *R. padbergi* submetido a técnica de Azul de Bromofenol (A), PAS (B), Sudan Black B (C) e von Kossa (D). Grupo controle.

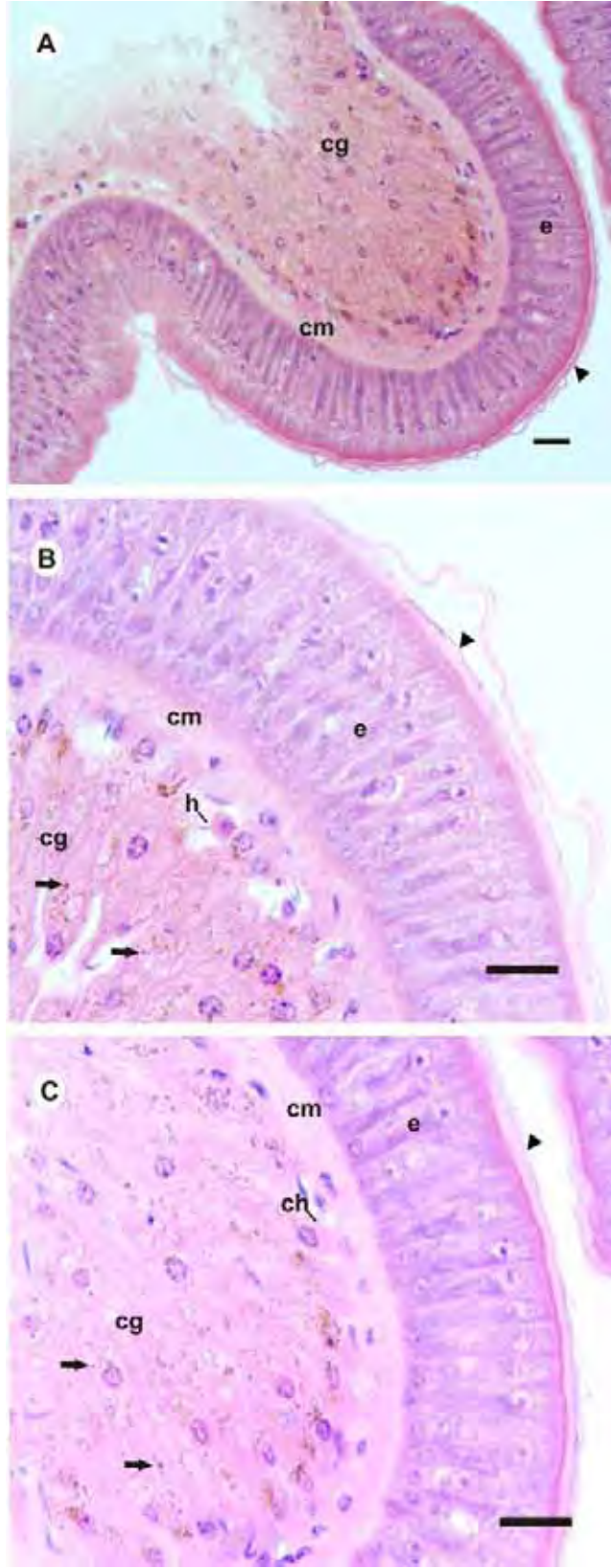
cg = corpo gorduroso; e = epitélio; h = hemócito; cm = camada muscular; vs= vesícula de secreção; mb= membrana basal; ch= célula hepática; mu= musculatura; setas em C= gotas de lipídeos. Escala= 20 μ m.

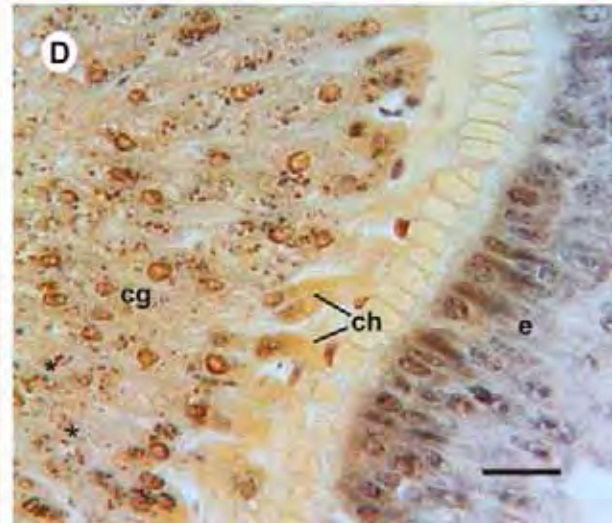
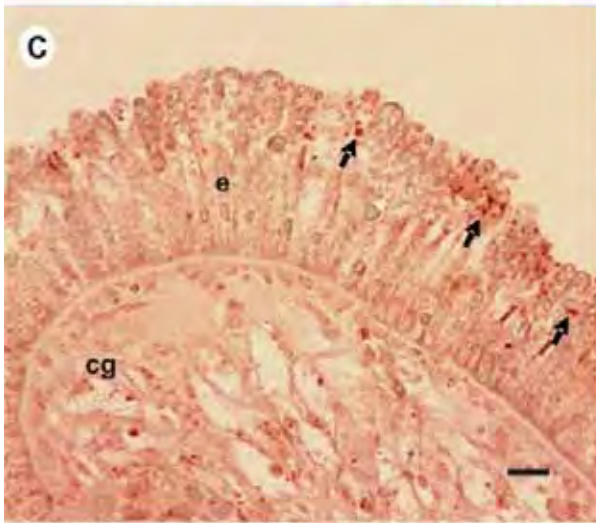
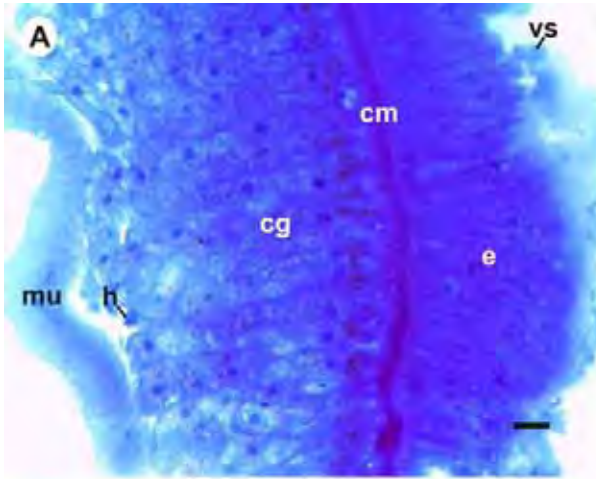
Figuras 3A – F: Intestino médio de *R. padbergi* corado com hematoxilina e eosina (A, E) submetido a técnica de Azul de Bromofenol (B), PAS (C) e von Kossa (D, F). Grupo lodo de esgoto 1% e 10% (A-D) e grupo lodo 50% (E-F) expostos por 7 dias.

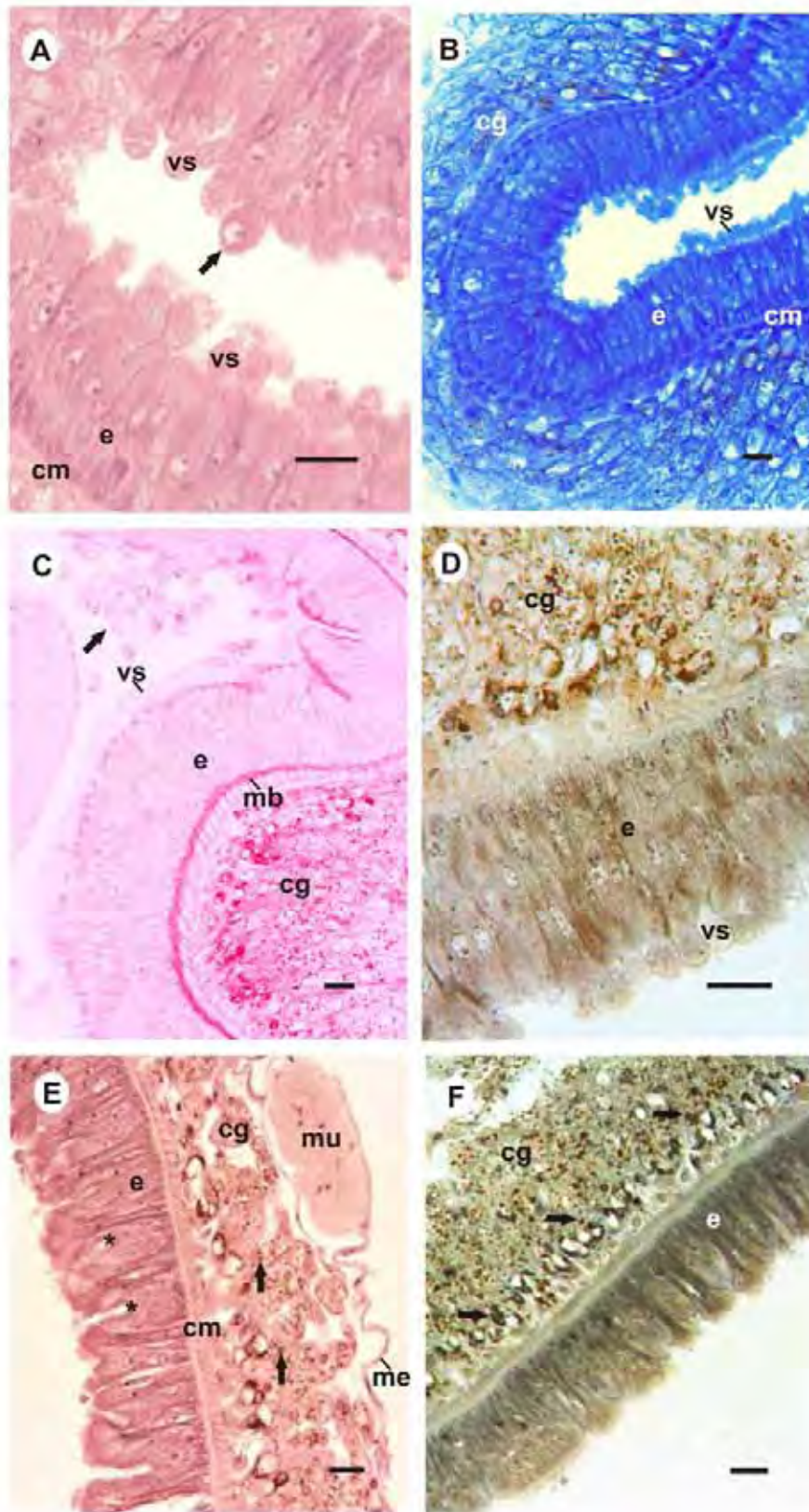
cg = corpo gorduroso; e = epitélio; cm = camada muscular; vs= vesícula de secreção; mb=membrana basal; mu=musculatura; me=membrana externa; setas em A e C= células liberadas para o lúmen; setas em E e F= grânulos citoplasmáticos; (*)= células mais baixas no epitélio, indicando pontos de renovação epitelial. Escala= 20 μ m.

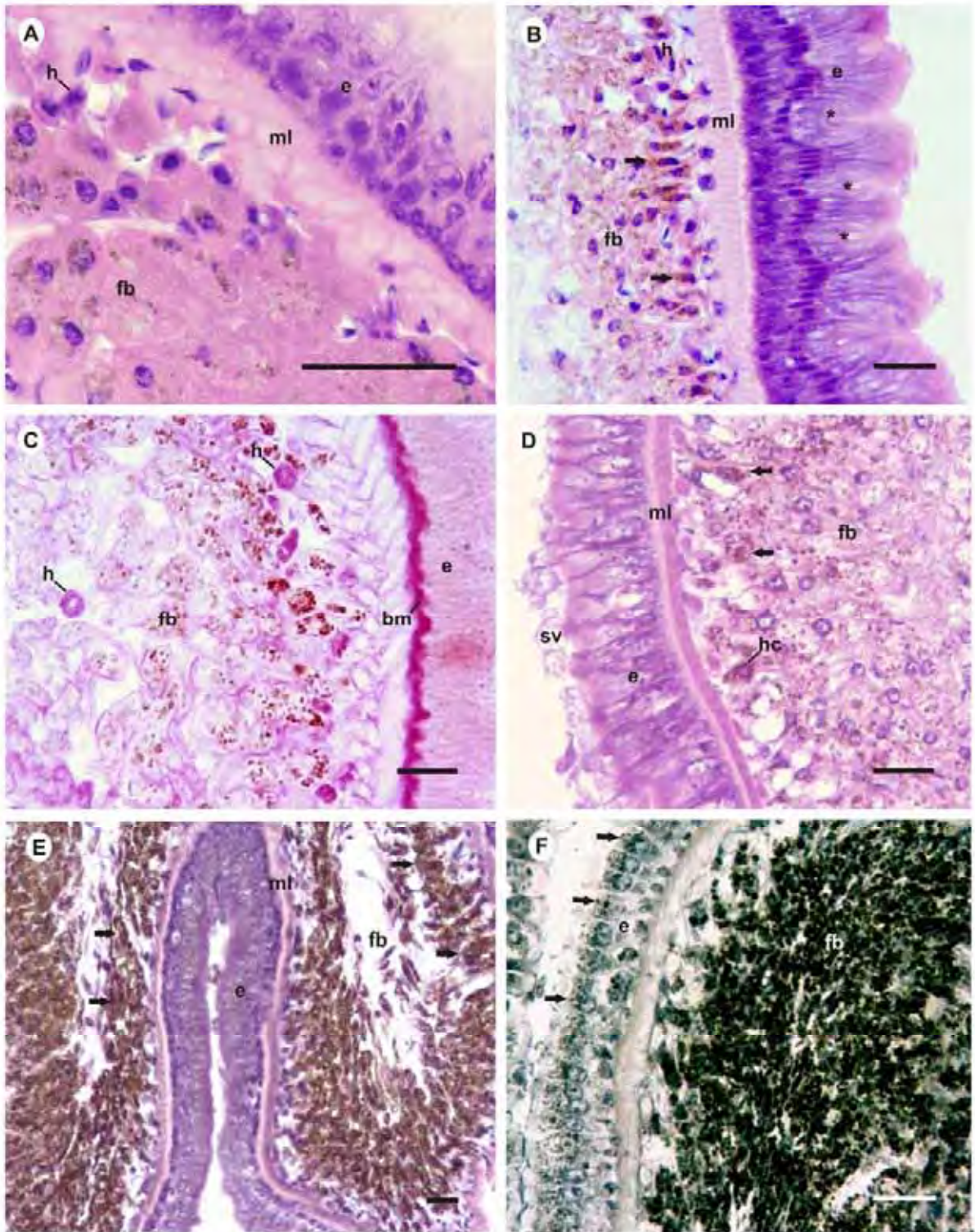
Figuras 4A – F: Intestino médio de *R. padbergi* corado com hematoxilina e eosina (A, B, D, E) submetido a técnica de PAS (C) e von Kossa (F). Grupo lodo 1% (A), 10% (B, C) e 50% (D) expostos por 15 dias; Grupo lodo 1% exposto por 90 dias (E, F).

cg = corpo gorduroso; e = epitélio; cm = camada muscular; h = hemócito; ch= célula hepática; mb=membrana basal; vs= vesícula de secreção; setas em B, D, E= grânulos citoplasmáticos; (*)= reorganização epitelial; marrom em E= grânulos citoplasmáticos; setas em F= grânulos citoplasmáticos localizados no domínio apical das células principais. Escala= 20 μ m.









6. CONCLUSÕES

Por meio da análise dos dados obtidos, pode-se concluir que a amostra de lodo de esgoto utilizada apresenta componentes tóxicos ao diplópodo *R. padbergi*, o que é verificado pelos seguintes pontos:

1. Alta taxa de mortalidade dos espécimes quando comparados com o grupo controle, principalmente nos bioensaios contendo lodo a 10% e 50%;
2. Ocorrência de inúmeros pontos de renovação epitelial. Isso pode ter sido consequência de uma lesão devido à intensa intoxicação;
3. Aumento da liberação de secreção, provavelmente como uma forma de proteção do epitélio por meio da excreção e diluição de substâncias tóxicas absorvidas;
4. Aspecto vacuolizado das vesículas de secreção do tipo apócrina liberadas pelas células epiteliais, as quais possivelmente entraram num processo de morte celular por necrose.
5. Aumento no número de hemócitos, tanto isolados quanto agrupados, o que indica lesão tecidual com provável processo inflamatório;
6. Aumento de grânulos citoplasmáticos nas células da camada de corpo gorduroso dos indivíduos expostos ao lodo diluído em diferentes concentrações. Provavelmente, este aumento do número de grânulos indica a ocorrência de um processo de detoxicação.

Pelos resultados, conclui-se também que o protocolo utilizado é viável em análise ecotoxicológica de solo e que a mortalidade dos animais pode ser utilizada como um indicador do potencial tóxico de substâncias complexas como, por exemplo, o lodo de esgoto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-RIDA, A.A.M.; BOUCHÉ, M.B., The eradication of an earthworm genus by heavy metals in southern France. **Appi. Soil Ecol.**, v. 2, p. 45-52, 1995.

ANDRADE, C. A. **Nitratos e metais pesados no solo e em plantas de *Eucalyptus grandis* após aplicação de biossólido da ETE de Barueri.** 1999. 65 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1999.

ANDRESON, J.M.; BIGNELL, D.E. Bacteria in the food, gut contents and faeces of the litter feeding millipede *Glomeris marginata*. **Soil Biol. Biochem**, v.12, p.251-254, 1980.

ARAB, A.; ZACARIN, G.G.; FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; DOS SANTOS, M.G.; CABRERA, A.C. Composition of the defensive secretion of the Neotropical millipede *Rhinocricus padergi* Verhoeff 1938 (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). **Entomotropica**, v.18, p.79-82, 2003.

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.** São Paulo: Ed. Intertox, 2003.

BANO, K.; KRISHNAMOORTHY, R. V. Consumatory responses of the millipede *Jonespeltis splendidus* (Verhoeff) in relation to soil organic matter. **Proc. Indian Acad. Sci.**, v. 90, n. 6, p.631-640, 1981.

BENGTSSON, G.; RUNDGREN, S. Ground-living invertebrates in metal-polluted forest soils. **Ambio**, v.3, p. 29-33, 1984.

BENGTSSON, G., NORDSTRÖM, S.; RUNDGREN, S. Population density and tissue metal concentration of lumbricids in forest soils near a brass mill. **Environ. Pollut.**, S. A, v. 30, p.87-108, 1983.

BERGER, B.; DALLINGER, R. Accumulation of cadmium and copper by the terrestrial snail *Arianta arbustorum* L.: kinetics and budgets. **Oecologia**, v.79, p.60-65, 1989.

BERTON, R. S.; CAMARGO, O. A.; VALADARES, J. M. A. S. Absorção de nutrientes pelo milho em resposta à adição de lodo de esgoto a cinco solos paulistas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 13, p. 187-192, 1989.

BERTON, R. S.; VALADARES, J. M. A. S.; CAMARGO, O. A.; BATAGLIA, O. C. Peletização do lodo de esgoto e adição de CaCO₃ na produção de matéria seca e absorção de Zn, Cu e Ni pelo milho em três latossolos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 21, p. 685-691, 1997.

BETTIOL, W.; DE CAMARGO, O. A. A Disposição de Lodo de Esgoto em Solo Agrícola. In: **Lodo de Esgoto: Impactos Ambientais na Agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. 349p.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O.A. Reciclagem do lodo de esgoto na agricultura. In: MELO, I.S.; SILVA, C.M.S.; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. (Org.). **Biodegradação**, Jaguariúna, p.93-106, 2001.

BETTIOL, W., CARVALHO, P.C.T.; FRANCO, B.J.D.C. Utilização do lodo de esgoto como fertilizante. **O Solo**, Piracicaba, v.75, n.1, p. 44-54, 1983.

BOCCARDO, L. **Fisioecologia do diplópodo *Gymnostreptus olivaceus* SCHUBART, 1944 (Spirostreptida, Spirostreptidae)**: Termopreferência, atividade e metabolismo respiratório. Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências de Rio Claro, SP, 1992.

BOCCARDO, L.; PENTEADO, C. H. S. Nossos amigos, os piolhos-de-cobra. **Jornal Verde**, n.69, p. 8, 1997.

BOCOCK, K.L.; HEATH, J. Feeding activity of the millipede *Glomeris marginata* (Villers) in relation to its vertical distribution in the soil. In: GRAFF, O.; SATCHELL, J.E. (Eds.). **Progress in soil biology**. Friedrich Vieweg and Sohn, 1966. p. 233-240.

BOEIRA, R.C.; LIGO, M.A.V.; DYNIA, J.F. Nitrogen mineralization in a tropical soil amended with sewage sludges. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.1639-1647, 2002.

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

CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FANTAZZINI, E. R.; FONTANETTI, C. S. Ultrastructural features of the midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda: Spirobolida). **Braz. J. morphol. Sci.**, v. 21, n. 2, p. 65-71, 2004.

CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FONTANETTI, C. S.; MICÓ-BALAGUER, E. Histochemical studies of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff ovaries (Diplopoda, Spirobolida, Rhinocricidae). **Cytobios**, v. 94, p. 169-184, 1998.

CAMARGO, O.A., PIRES, A.M.M., BETTIOL, W. Lodo na agricultura. **Revista Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v.42, p. 68-70, 2008.

CESÁRIO SILVA, S.M. Principais contaminantes do lodo. In: VON SPERLING, M.; ANDREOLI, C.V.; FERNANDES, F. (Ed.) **Lodo de esgotos: tratamento e disposição final**. (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, v.6). Belo Horizonte: DESA-UFMG, 2001. p. 69-121.

CHANG, A.C.; HINESLY, T.D.; BATES, T.E.; DONER, H.E.; DOWDY, R.H.; RYAN, J.A. Effects of long term sludge application on accumulation of trace elements by crops. In: PAGE, A.L.; LOGAN, T.G.; RYAN, J.A. **Land application of sludge**. Chelsea: Lewis Publishers, 1987. p.53-66.

COLE, L.E. A study of the cryptozoa of na Illinois woodland. **Ecol. Monogr.** v.16, p. 49-86, 1946.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL-CETESB. Aplicação de lodos de sistemas de tratamento biológico em áreas agrícolas- critérios para projeto e operação –P.4230. São Paulo: CETESB, 1999.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL-CETESB. Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo 2003/CETESB- São Paulo: CETESB. 2004.273p.

CONAMA-CONSELHO Nacional do Meio Ambiente. Resolução 357/2005. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> Acesso em: 19 de maio de 2008.

COSTA, R.G. **Alguns insetos e outros pequenos animais que danificam plantas cultivadas no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: SIPA, 1958.

CROUAU, Y.; GISCLARD, C.; PEROTTI, P. The use of *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae) in bioassays of waste. **Appl. Soil Ecol.**, v.19, p.65–70, 2002.

DALLINGER, R. Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In: DALLINGER, R.; RAINBOW, P.S., eds. **Ecotoxicology of Metals in Invertebrates**. Boca Raton: Lewis Publishers; pp.246–289, 1993.

DALLINGER, R.; PROSI F. 1988 Heavy metals in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* Latreille. II. Subcellular fractionation of metal-accumulating lysosomes from hepatopancreas. **Cell Biol Toxicol** v.4, n.97, 1988.

DANGERFIELD, J.M. Ingestion of mineral soil/litter mixtures and faecal pellet production in the southern African millipede *Alloporus uncinatus* (Atterns). **Pedobiologia**, v.37, p.159-166, 1993.

DANGERFIELD, J. M.; TELFORD, S. R. Are millipedes important for soil fertility? **Zimbabwe Scence News**, v. 23, n. 7/9, p. 66-68, 1989.

DA ROS, C. O.; AITA, C.; CERETTA, C. A.; FRIES, M. R. Lodo de esgoto: efeito imediato no milho e residual na associação aveia-ervilhaca. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 17, p. 257-261, 1993.

DIEZ J.A.; DE LA TORRE A.I., CARTAGENA MC, CARBALLO M, VALLEJO A. Evaluation of the application of pig slurry to an experimental crop using agronomic and ecotoxicological approaches. **J. Environ. Qual**, v. 30, p. 2165–2172, 2001.

EUROPEAN COMMISSION, 2002. DG ENV. E3, Project ENV.E3/ETU/2000/0058, **Heavy Metals in Waste**, Final report.

EVERAARTS, J.M. DNA integrity as a biomarker of marine pollution: Strand breaks in seastar (*Asterias rubens*) and Dab (*Limanda limanda*). **Mar Pol Bul**, v.31, p.431–438, 1995.

FANTAZZINI, E.R.; FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Anatomy of the digestive tube and histochemistry of the foregut and salivary glands of “*Rhinocricus padbergi*”: Verhoeff, (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). **Arthropoda Selecta**, v.7, n.4, p.257-264, 1998.

FANTAZZINI, E.R.; FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Midgut of the millipede “*Rhinocricus padbergi*” Verhoeff, 1938 (Diplopoda: Spirobolida): histology and histochemistry. **Arthropoda Selecta**, v.11, p.135-142, 2002.

FAVA, F.; BERTIN, L. Use of exogenous specialised bacteria in the biological detoxification of a dump site polychlorobiphenyl- contaminated soil in slurry phase conditions. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 64, p.240–49, 1999.

FIEST, L.C.; ANDREOLI, C.V.; MACHADO, M.A.M. Efeitos da aplicação do lodo de esgoto nas propriedades físicas do solo. **SANARE**, v.9, n.9. Janeiro /Julho, 1998.

FIESP - FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. São Paulo. Organização e histórico dos Seminários da Indústria Brasileira da Construção Civil – Construbusiness. Disponível em <<http://fiesp.com.br/construbusiness>>. Acesso em: 11 de nov. 2003.

FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. External morphology of the antennae of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 (Diplopoda: Spirobolida). **Braz. J. morphol. Sci.**, v. 21, n. 2, p. 73-79, 2004a.

FONTANETTI, C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Presence of calcium in oocytes of the diplopod *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Spirobolida, Rhinocricidae). **Acta Histochemica et Cytochemica**, v.37, n.5, p.301-306, 2004b.

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

FONTANETTI, C. S.; TIRITAN, B.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Mineralized bodies in the fat body of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). **Braz. J. morphol. Sci.** v. 23, n. 3-4, p.487-493, 2006.

FRYER, G. Observations on some African millipedes. **Ann. Mag. Nat. Hist.**, v.12, n.10, p. 47-52, 1957.

GRÄFF, S.; BERKUS, M.; ALBERTI, G.; KÖHLER, H. R. Metal accumulation strategies in saprophagous and phytophagous soil invertebrates: a quantitative comparison. **BioMetals**, v. 10, p. 45-53, 1997.

HANLON, R.D.G.; ANDRESON, J.M. Influence of macroarthropod feeding activities on microflora in decomposing oak leaves. **Soil.Biol.Biochem.**, v.12, p.255-261,1980.

HÄTTENSCHWILER S, GASSER P. Soil animals alter plant litter diversity effects on decomposition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, n.5, p. 1519–24. 2005.

HODKINSON, I.D.; JACKSON, J.K. Terrestrial and aquatic invertebrates as bioindicators for environmental monitoring, with particular reference to mountain ecosystems. **Environmental Management**, v.35, p. 649-666, 2005.

HOFFMAN, R. L.; GOLOVATCH, S. I.; ADIS, J.; MORAIS, J. W. Diplopoda. In: **Amazonian Arachnida and Myriapoda**: identification keys to all classes, orders, families, some genera, and lists of known terrestrial species. Pensoft, 2002.

HOPKIN, S.P. Ecophysiology of Metals in Terrestrial Invertebrates. **Elsevier Applied Science**, Barking, UK, 1989.

HOPKIN, S.P. Critical concentrations, pathways of detoxification and cellular ecotoxicology of metals in terrestrial arthropods. **Funct. Ecol.**, v. 4, p.321-327, 1990.

HOPKIN S.P.; MARTIN, M.H. The distribution of zinc, cadmium, lead and copper within the hepatopancreas of a woodlouse. *Tissue Cell*14:703-715, 1982.

HOPKIN, S.P., READ, H.J. **The biology of millipedes**. New York: Oxford University Press, 1992, 233p.

HOPKIN, S. P.; HAMES, C.A.C.; DRAY, A. X- ray microanalytical mapping of the intracellular distribution of pollutant metals. **Microsc. Anal.**, v. 14, p. 23-27, 1989.

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, W. The midgut of *Tomocerus minor* Lubbock (Insecta: Collembola): ultrastructure, cytochemistry, ageing and renewal during a moulting cycle. **Cell Tissue Res.**, v. 196, p.39-57, 1979a.

HUBERT, W. Localization and identification of mineral elements and nitrogenous waste in Diplopoda. In: CAMATINI, M (Ed) **Myriapod Biology**. London: Academic Press, p. 127-133, 1979b.

JAMIESON, B.G. Phylogenetic and phenetic systematics of the opisthoporus Oligochaeta (Annelida: Clitellata). **Evolution Theory**, v. 3, p. 195-223, 1978.

JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983. 123p.

KALE, R.D. Annelids. In: VEERESH, G.K.; RAJAGOPAL, D. (Eds) **Applied Soil Biology and Ecology**. New Dehli: Oxfordand IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., p.90-109, 1998.

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 risks assessment. **Rev. Environm. Contam. Toxicol.**, v.164, p.93-147, 2000.

KHEIRALLAH, A.M. Behavioral preference of *Julus scandinavius* (Myriapoda) to different species of leaf litter. **Oikos**, v. 33, p.466-471, 1979.

KIME, R.K.; GOLOVATCH, S.I. Trends in the ecological strategies and evolution of millipedes (Diplopoda). **Biol.J. of the Lin. Soc.**, London, v.63, p.333-349, 2000.

KITAMURA, P. C. Prefácio. In: **Lodo de Esgoto: Impacto Ambiental do Uso Agrícola**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 349p, 2006.

KÖLHER, H. R.; Localization of metals in cells of saprophagous arthropods (Isopoda, Diplopoda, Collembola). **Microscopy Research and Technique**, v.56, p.393-401, 2002.

KÖHLER, H. R.; TRIEBSKORN, R. Assessment of the cytotoxic impact of heavy metals on soil invertebrates using a protocol integrating qualitative and quantitative components. **Biomarkess**, 1998.

KÖHLER H.R.; ALBERTI, G. The effect of heavy metal stress on the intestine of diplopods. In: MEYER, E.; THALER, K.; SCHEDL, W. eds. **Advances in Myriapodology**. Innsbruck: Ber nat-med Ver. Suppl. 10; pp. 257–267, 1992.

KÖLHER, 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, STORCH V, ALBERTI G. The impact of lead on the assimilation efficiency of laboratory-held Diplopoda (Arthropoda) preconditioned in different environmental situations. **Oecologia**, v. 90, p.113–119, 1992.

LAVELLE, P. Assessing the abundance and the role of invertebrate communities in tropical soils: aims and methods. **J. Afr. Zool.**, v.102, p.275-283, 1988.

LEWIS, J.G.E. The life history and ecology of three paradoxosomatid millipedes (Diplopoda: Polydesmida) in Northern Nigeria. **J.Zool.**, Londres, v.165, p.431-452, 1971.

LOKKE, H.; VAN GESTEL, C.A.M. **Handbook of soil invertebrate toxicity tests**. Chichester' John Wiley and Sons; 1998.

MAGALHÃES, D.P. FERRÃO-FILHO, A.S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ambientes aquáticos. **Oecol. Bras.**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MAIA, N.B.; MARTHOS, H.L.; BARRELLA, W. **Indicadores ambientais: conceitos e aplicações**. São Paulo: ED. Educ, 2001.

MARTIN, M.H.; COUGHTREY, P.J.; SHALES, S.W.; LITTLE, P. **Aspects of airborne cadmium contamination of soils and natural vegetation**. In: Inorganic Pollution and Agriculture, London, p. 56-69, 1980.

MCCARTHY, J.F., SHUGART, L.R. Biological markers of environmental contamination. In: MCCARTHY J.F.; SHUGART L.R (Eds). **Biomarkers of environmental contamination**. Lewis, Boca Raton, FL, 1990. pp 3–14.

MEAD, M.; GILHODES, J.C. Organisation temporelle de l'activité locomotrice chez um animal cavernicole *Blaniulus Lichtensteini* Bröl. (Diplopoda). **Journal of Comparative Physiology: Neuroethology, Sensory, Neural and Behavioral Physiology.**, v.90, n.1, p.47-52, 1974.

MELO, W.J.; MARQUES, M.O.; SANTIAGO, G.; CHELLI, R.A.; LEITE, S.A.S. Efeito de doses crescentes de lodo de esgoto sobre frações de matéria orgânica e CTC de uma lato solo cultivado com cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Campinas, v.18, n.3, p.449-455, 1994.

MEYERS, T.R.; HENDRICKS, J.D. Histopathology. In: RAND, G.M., PETROCELLI, S.R. **Fundamental of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington, p. 283-331, 1985.

MIYOSHI, A.R.; GABRIEL, V.A.; FANTAZZINI, E.R.; FONTANETTI, C.S. Microspines in the pylorus of *Pseudonannolene tricolor* and *Rhinocricus padbergi* (Arthropoda, Diplopoda). **Iheringia**, v. 95, n.2, p. 183-187, 2005.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Brasil. **Resolução nº 375, de 29 de agosto de 2006**. Brasília, 2006.

NEUHAUSER, E.F.; HARTENSTEIN, R. Pheonolic content and palatability of leaves and wood to soil isopods and diplopods. **Pedobiologia**, v.18, p.99-109, 1978.

OLIVEIRA, F.C. **Disposição de lodo de esgoto e composto de lixo urbano num latossolo vermelho-amarelo cultivado com cana-de-açúcar**. 2000. 247p. Tese (Doutorado na área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

OLIVEIRA, F.C. MATTIAZZO, M.E. Metais pesados em latossolo tratado com lodo de esgoto e em plantas de cana-de-açúcar. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.58, p.581-593, 2001.

OLIVEIRA, C.; AMARAL SOBRINO, N.M.B.; MARQUES, V.S.; MAZSUR, N. Efeitos da aplicação do lodo de esgoto enriquecido com cádmio e zinco na cultura do arroz. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.29, p. 109-116, 2005.

PAOLETTI, M. G.; FAVRETTO, M. R.; STINNER, B. R.; PURRINGTON, F. F.; BATER, J. E. Invertebrates as bioindicators of soil use. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 34, n.1, p. 341-362, 1991.

PAWERT, M.; TRIEBSKORN, R.; GRÄFF, S. Cellular alterations in collembolan midgut cells as a marker of metal exposure: ultrastructure and intracellular metal distribution. **Sci Tot Environ**, v.181, p. 187–200, 1996.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry**: Theoretical and Applied. 4th ed., London: J&A. Churchill, v.2, 1985.998p.

PEREZ, D.G. **Respostas tissulares de intestino médio do diplópodo *Rhinocricus padbergi* exposto a substrato contendo lodo de esgoto**. 2008. 42p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

SANTOS, A.D. **Estudo das possibilidades de reciclagem dos resíduos de tratamento de esgoto da Região Metropolitana de São Paulo**. 2003.282 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SABESP - Secretaria de Energia, Recursos Hídricos e Saneamento, São Paulo. **Sanegran**: saneamento da grande São Paulo. São Paulo: Superintendência de Divulgação, 1979. 16p.

SCHULTZ, G.A. Isopoda. In: PARKER, S.P. (ed). **Synopsis and classification of living organisms**. New York: McGraw-Hill, 1982. p. 249-254.

SHARPLEY, A.N.; MENZEL, R.G. The impact of soil and fertilizer phosphorus on the environment. **Adv.Agron**. 1987.

SHUGART, L.R.; BICKHAM, J.; JACKIM, G.; MCMAHON, G.; RIDLEY, W.; STEIN, J.; STEINERT, S. DNA alterations. In: HUGETT R.J., KIMERLE R.A., MEHRLE P.M., BERGMAN HL (Eds). **Biomarkers**: Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Lewis, Boca Raton, FL, 1992, pp 125–154.

SILVA, F.C. **Uso agrônômico de lodo de esgoto: efeitos em fertilidade do solo e qualidade da cana de açúcar**. 1995. 149 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

SILVA, F. C.; BOARETTO, A. E.; BERTON, R. S.; ZOTELLIH,B.; PEXE, C. A.; BERNARDES, E. M. Efeito do lodo de esgoto na fertilidade de um Argissolo Vermelho-Amarelo cultivado com cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 5, p. 831-840, 2001a.

SILVA, C.A.R.; RAINBOW, P.S.; SMITH, B D.; SANTOS, Z.L. Biomonitoring of trace metal contamination in the Potengi Estuary, Natal (Brazil), using the oyster *Crassostrea rhizophorae*, a local food source. **Water Research**, v.35, p.4072-4078, 2001b.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A. P. **Genética Toxicológica**. Rio Grande do Sul: Alcance, 2003. 424p.

SILVEIRA, M.L.A.; ALLEONI, L.R.F.; GUILHERME, L.R.G. Biosolids and heavy metals in soils. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.60, n.4, p.773-806, 2003.

SOMMERS, L.E.; NELSON, D.W.; YOST, K.J. Variable nature of chemical composition of sewage sludges. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.5,n.3, p.3003-306,1996.

SOUZA, M.L.P.; ANDREOLI, C.V.; DOMASZAK, S.C. Levantamento preliminar dos teores de metais pesados em alguns solos do Paraná. **Sanare**, Curitiba, v.5, n.5, p.68-75, 1996.

SPURGEON, D.J.; HOPKIN, S.P. Risk assessment of the threat of secondary poisoning by metals to predators of earthworms in the vicinity of a primary smelting works. **The Science of the Total Environment**, v. 187, p.167-183, 1996.

SPURGEON, D.J.; HOPKIN, S.P.; JONES, D.T. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): assessing the environmental impact of point source metal contamination in terrestrial ecosystems. **Environ. Pollut.**, v. 84, p. 123-130,1994.

STRIGANOVA, B.R.; PRISHUTOVA, Z. G. Food requirements of diplopods in the dry steppe subzone of the USSR. **Pedobiologia**, v.34, p.37-41, 1990.

STORK, N.E.; EGGLETON, P. Invertebrates as determinants and indicators of soil quality. **Amer. Journal of Alternative Agriculture**, v.7, 1992.

TAJOVSKY, K.; MOCK, A.; KRUMPÁL, M. Millipedes (Diplopoda) in birds' nests. **Eur. J. Soil Biol.**, v.37, p.321-323, 2001.

TRAJANO, E.; GOLOVATCH, S.I., GEOFFROY, J.J.; PINTO-DA-ROCHA, R.; FONTANETTI, C.S. Synopsis of Brazilian cavedwelling millipedes (Diplopoda). **Pap. Avul. Zool.**, SP, v.41, n.18, p.259-287, 2000.

TRIEBSKORN, R.; KÖHLER, H. R.; ZANH, T.; VOGT, G.; LUDWING, M.; RUMPF, S.; KRATZMANN, M.; ALBERTI, G.; STORCH, V. Invertebrate cells as targets for Hazardous substances ziet. **Fur angewandte Zool.**, v. 78, p. 277-287, 1991.

TRIEBSKORN, R.; HENDERSON, I. F.; MARTIN, A. P. Detection of iron in tissues from slugs (*Deroceras reticulatum* Müller) after ingestion of iron chelates by means of energy-filtering transmission electron microscopy (EFTEM). **Pestic. Sci.**, v. 55, p. 55-61, 1999.

TSUTIYA, M.T. Alternativas de disposição final de biossólidos. In: TSUTIYA, M.T.; COMPARINI, J.B.; SOBRINHO, P.A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P.C.T.; MELFI, A.J.; MELO, W.J. & MARQUES, M.O. (Eds). **Biossólidos na agricultura**. São Paulo, SABESP, 2001. 468p.

TSUTIYA, M.T. Metais pesados: o principal fator limitante para o uso agrícola de biossólidos das estações de tratamento de esgoto. In: 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1999.

USEPA, Report to Congress on the Discharge of Hazardous Wastes to Publicly Owned Treatment Works (The Domestic Sewage Survey) (EPA-530, SW 86 004). **Office of Water Regulation and Standards**, Washington, DC, 1986.

VAN GESTEL C.A.M.; VAN DER WAARDE, J.J.; DERKSEN, J.G.M.; VAN DER HOEK, E.E.; VEUL M.; BOUWENS, S. The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.20, p.1438–492, 2001.

VAN STRAALLEN, N.M.; BURGHOUTS, T.B.A. ; DOOMHOF, M.J.; GROOT, G.M.; JANSSEN, M.P.M.; JOOSSE, E.N.G.; VAN MEERENDONK, J.H.; THEEUWEN, J.P.H.H.; VERHOEF, H.A.; ZOOMER, H.R. Efficiency of lead and cadmium excretion in populations of *Orchesella cincta* (Collembola) from various contaminated forest soils. **J. Appl. Ecol.**, v.24, p.953-968, 1987.

VAN STRAALLEN, N.M. Ecotoxicology becomes stress ecology. **Environ. Sci.Technol.** v.37, p. 24A–30A, 2003.

VIEIRA, R.F.; SILVA, C.M.M.S. Utilização do lodo de esgoto com fonte de fósforo na WALLWORK, J.A. **Ecology of soil animals**. London, England: McGraw-Hill Publishing Company, 1970.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento dos esgotos** (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, v.1). 2 ed. Belo Horizonte: DESA-UFMG, 1996 243p.

WALLWORK, J.A.; The soil fauna as bioindicators. In. ITURRONDOBEITIA, J.C (Ed.). **Biologia Ambiental I**, Serv. Ed. Univ. Pais Vasco., 1988, p. 203-215.

WOOTON, R.C.; CRAWFORD. C.S. Food, ingestion rates and assimilation in the desert millipede *Orthoporus ornatus* (Girard) (Diplopoda). **Oecologia**, v. 20, p.231-236, 1975.

WALKER, J. Host defense mechanisms in the gastrointestinal tract. **Pediatrics**, v.57 pp. 901-916, 1976.