
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA VINHAÇA TRATADA QUÍMICAMENTE UTILIZANDO *Oreochromis niloticus* (Perciformes: Cichlidae) COMO ORGANISMO TESTE

JORGE EVANGELISTA CORREIA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Julho - 2015

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA VINHAÇA TRATADA QUÍMICAMENTE UTILIZANDO *Oreochromis niloticus* (Perciformes: Cichlidae) COMO ORGANISMO TESTE

JORGE EVANGELISTA CORREIA

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

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro
Estado de São Paulo - Brasil
Julho - 2015

574.5263 Correia, Jorge Evangelista
C824a Avaliação da toxicidade da vinhaça tratada quimicamente utilizando
Oreochromis niloticus (Perciformes: Cichlidae) como organismo teste /
Jorge Evangelista Correia. - Rio Claro, 2015
104 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia de Rio Claro

Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

Coorientador: Cintya Aparecida Christofolletti de Figueiredo

1. Ecologia aquática. 2. Ecotoxicologia. 3. Ensaio do cometa. 4. Teste
do micronúcleo. 5. Histopatologia. 6. Agrossídulo. I. Título.

Dedico esse trabalho as
pessoas mais importantes da
minha vida: meus pais
Irineu e Suely e meu irmão
Gabriel que me deram todo
o apoio e confiança. Muito
Obrigado

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais e aos meus familiares que sempre me apoiaram na minha decisão de seguir a carreira acadêmica e principalmente pelo amor que recebo diariamente, seja por uma simples conversa no telefone, seja por um abraço quando eu volto para casa.

Aos meus pais Irineu e Suely, agradeço por todos os conselhos e preocupações que sempre ajudaram a me manter focado em meus objetivos. Agradeço também por todo o cuidado que sempre tiveram comigo, por serem além de familiares, meus melhores amigos que eu sei que posso contar em todo momento. Muito obrigado pela educação e pela criação que vocês me deram, pois graças a ela que eu me tornei o homem que sou hoje e é em vocês que eu sempre me espelharei.

Ao meu irmão Gabriel muito obrigado pelo amor incondicional que eu recebo todos os dias, pelas brincadeiras, por sempre me defender mesmo quando eu estou errado, muito obrigado pela admiração que recebo e sempre tentarei fazer jus a ela.

Agradeço meus tios Elizia e Israel por me acolher quando cheguei em Rio Claro, por todo cuidado e carinho que recebi enquanto morei com eles.

A minha “tia” Cida por todo o carinho, amor que sempre recebo e por todo cuidado ao preparar minhas marmitas congeladas e ao separar minha roupa de cama para eu levar para Rio Claro até os dias de hoje.

Aos meus amigos Gustavo, Danielle, Bruno, Cecilia, Felipe, Marcos Vinicius, muito obrigado por essa longa amizade que eu sei que vai durar para a vida inteira.

Ao meu amigo Leonardo pelos seis anos de convívio diário, pela amizade e pelos conselhos. A La Arca vai durar para sempre, mesmo os dois integrantes da melhor república de Rio Claro seguindo sua trajetória em cidades diferentes.

Aos amigos Lucas e Marcel pela amizade, incentivos, conselhos e boas risadas. Sei que sempre poderei contar com vocês.

Muito obrigado a família do coração, a família CBI 2009, Abigail, Ana, Alexandre, Aline, Antônio, Arthur, Bruno, Daniela, Dayene, Elen, Fernanda, Gabriela Pessenda, Jussara, Larissa, Laryssa, Lais, Leonardo, Letícia, Lídia, Luá, Lucas, Marcel, Maria Luísa (Malu), Matheus (Tcherbi), Michelle (Fofoca), Paula Maldonado, Paula Bertoli, Pedro Coca, Pedro Francisco, Poliana, Raquel, Renan, Regiane, Vanessa e Verônica. Tenho muito orgulho dessa união, e da conquista de cada um.

Agradeço também à Amanda pelo amor e pela amizade, pelo companheirismo, por me escutar e me apoiar mesmo a distância.

Agradeço também ao melhor grupo de pesquisa que eu poderia encontrar, os “fofoletes” Ana Claudia, Cristina, Yadira, Raphael, Thays, Cleiton, Vinicius, Camila, Maria Paula, Louise e Luiza pela união, amizade, colaborações e ajudas sem vaidades.

Faço agradecimento também a minha fantástica co-orientadora, Cintya, que sempre com paciência soube me ensinar e me corrigir, obrigado pelo grande exemplo de profissional ética e cuidadosa, esse trabalho se deve muito aos seus esforços.

Agradeço em especial a minha orientadora Carmem, por ser a melhor orientadora que eu poderia ter, por ser um exemplo de pesquisadora e pessoa na qual eu me espelharei por toda vida acadêmica. Muito obrigado pela orientação e por tudo que eu aprendi e ainda aprenderei estando ao seu lado. Muito obrigado também pela amizade, pois sei que posso contar com seus conselhos para qualquer problemas.

Agradeço por fim a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos concedida (processo: 2013/13228-0). À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Rio Claro. Ao Instituto de Biociências, Departamento de Biologia e aos Laboratórios de Citogenética, Histologia, Microscopia Eletrônica e Mutagênese Ambiental, por me acolher e fornecerem toda a estrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho. À Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da UNESP.

“A mente que se abre a uma ideia, jamais voltará ao seu tamanho original”
Albert Einstein

RESUMO

A vinhaça, um dos principais resíduos gerados na transformação da cana-de-açúcar em etanol, possui potencial poluidor, frente ao alto volume subproduzido e por suas características físico-químicas. A contaminação de lagos e rios, por infiltração de resíduos dispostos no solo, como a vinhaça e fertilizantes, por exemplo, merece destaque. Com o intuito de amenizar tais efeitos, o tratamento prévio desses resíduos constitui uma alternativa viável para diminuir os impactos ao meio ambiente. Portanto, este estudo teve por objetivo verificar a efetividade na redução da toxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar por meio da correção de seu pH para um valor neutro (7,0), pela adição de cal (CaO), avaliando o seu potencial tóxico em peixes (*Oreochromis niloticus*). As análises foram realizadas por meio do ensaio do cometa e teste do micronúcleo para avaliação do potencial genotóxico, e análise histopatológica das brânquias, órgão de contato direto com o meio aquático. Após exposição das tilápias às diluições de vinhaça quimicamente tratada com cal, houve mortalidade de 30% dos peixes na diluição de 10%; em ensaios anteriores com vinhaça não tratada, a mortalidade na mesma diluição foi de 100%. O pH neutro (7,0) não permaneceu estável ao longo do bioensaio. Em relação ao ensaio do cometa, foram obtidos valores de escore de danos e cometas classe 3 com diferenças significativas em relação ao controle negativo para todas as diluições, com exceção da diluição de 1%. Não houve diferenças significativas entre os valores de micronúcleo e anormalidades nucleares entre as diluições e o controle negativo; comparando esses resultados com os de ensaios anteriores com diluições de vinhaça não tratada, foi observada uma diminuição da quantidade de micronúcleos. Por meio de análise histopatológica de brânquias, foi observado um aumento nas células clorídricas, principalmente na diluição de 5%, possivelmente em resposta a presença de zinco na amostra de vinhaça. Foram observadas diversas alterações histológicas. O desprendimento epitelial, desorganização do epitélio e hemorragia foram estatisticamente significativas nos indivíduos da diluição 5% e com exceção da desorganização, também na diluição de 10. Não houve diferenças significativas no número de células mucosas para nenhuma diluição quando comparado ao controle. Tendo em vista a maior taxa de sobrevivência dos peixes e a redução na formação de micronúcleos e os baixos índices de alterações nas brânquias nos indivíduos expostos do resíduo tratado, infere-se que o tratamento químico da vinhaça pela correção de seu pH se mostrou efetivo na redução do potencial tóxico desse resíduo, podendo se tornar uma prática rápida e de baixo custo. Entretanto, a cal pode contribuir para aceleração da salinização do solo fertirrigado por vinhaça, uma vez que esse resíduo já possui altas concentrações de potássio e sulfato.

Palavras-chave: Ensaio do cometa, teste do micronúcleo, histopatologia, agrossídeo

ABSTRACT

The vinasse, a major waste generated in the processing of sugarcane into ethanol, has a polluter potential in front of the volume generated and its physiochemical features. Contamination of lakes and rivers by infiltration of waste disposed in the soil, such as vinasse and fertilizers, deserves attention. In order to mitigate these effects, the pre-treatment of this waste is a viable alternative to reduce the environmental impacts. Despite many studies about vinasse, only a few investigate their toxic potential. Therefore, this study aimed to verify the effectiveness in reducing sugarcane vinasse toxicity by pH correction to a neutral value (7.0), by adding lime (CaO), assessing their potential toxicity in fish (*Oreochromis niloticus*). Analyses were performed using the comet assay and micronucleus test to assess the genotoxic potential, and histopathological analysis of gills, organ that has direct contact with water. After exposure of tilapia to vinasse dilutions chemically treated with lime, 30% of fish in the dilution of 10% died; in earlier bioassays with untreated vinasse, at the same dilution the mortality was 100%. The neutral pH (7.0) has not remained stable during the bioassay. Regarding the comet assay, score damage and class 3 comets had significant differences when compared to the negative control for all dilutions, except for the dilution of 1%. There were no significant differences on the values of micronuclei and nuclear abnormalities between dilutions and negative control; comparing these results with those obtained in previous bioassays, with untreated vinasse dilutions, a decrease was observed in the number of micronuclei. For histopathologic analysis in gills, a slight increase was observed in clorídricas cells number, especially in the dilution of 5%, possibly in response to the presence of zinc in the vinasse samples. Different types of histologic changes were observed. The epithelial detachment, the epithelium disorganization and bleeding were statistically significant in individuals in 5% dilution and apart from disorganization, also the dilution of 10%. There were no significant differences in the number of mucous cells to any dilution when compared to control. Considering the highest survival rate of fishes, the reduction micronuclei formation and low histopathological change index, it is inferred that the chemical treatment of vinasse by correcting its pH was effective in reducing the toxic potential of the residues and may become a quick and low-cost practice. However, lime can contribute to accelerated soil salinization fertirrigated by vinasse, since this residue has already high concentrations of potassium and sulfate.

Key-words: Comet assay, micronucleus test, histopathology, agroresidue

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	03
3. REVISÃO DE LITERATURA	
3.1. Tratamentos da vinhaça.....	04
3.2. <i>Oreochromis niloticus</i> como bioindicador para o monitoramento ambiental.....	06
3.3. Ensaio do Cometa e Teste do Micronúcleo como ferramentas para estudos em toxicologia ambiental.....	08
3.4. Histopatologia das brânquias como biomarcador da poluição aquática.....	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1 Material biológico.....	13
4.2 Vinhaça como substância tóxica.....	13
4.3 Montagem do bioensaio.....	13
4.4 Ensaio do cometa utilizando sangue periférico.....	14
4.5 Teste do micronúcleo associado às anormalidades nucleares.....	15
4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	15
4.7 Histologia.....	15
4.8 Histoquímica- Polissacarídeos neutros – Técnica Ácido Periódico-Schiff (PAS) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).....	17
4.9 Análise estatística dos resultados.....	17
5. RESULTADOS	
5.1 Artigo 1: Diminuição da toxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar a partir de ajuste de pH: Ensaio do Cometa e Teste do Micronúcleo em <i>Oreochromis niloticus</i> (Perciformes: Cichlidae).....	18

5.2 Artigo 2: Toxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar a partir da correção de seu pH com Cal (CaO): Histopatologia de brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> (Perciformes: Cichlidae).....	41
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
8. ANEXO	
Análise histopatológica de brânquias de tilápias (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostos à vinhaça da cana-de-açúcar.....	70

Rio Claro, 10 de Outubro de 2015

A handwritten signature in blue ink, reading "Jorge Evangelista Correia". The signature is stylized with a large, sweeping underline that extends across the width of the text.

Jorge Evangelista Correia
Aluno

A handwritten signature in purple ink, reading "Cinya Aparecida Christofolletti". The signature is written in a cursive style with a prominent initial 'C'.

Prof^a Dr^a. Cinya Aparecida Christofolletti
Co-orientadora

A handwritten signature in black ink, reading "Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti". The signature is written in a cursive style with a prominent initial 'C'.

Prof^a. Dr^a Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti
Orientadora

1. Introdução

O cultivo de cana-de-açúcar foi introduzido no Brasil em 1532 em São Vicente, São Paulo; tal implantação contribuiu rapidamente para o desenvolvimento da região, influenciando outras áreas do país, iniciando a primeira atividade organizada do Brasil, o ciclo da cana-de-açúcar.

O setor sucroalcooleiro recebeu grande importância no cenário nacional, tendo um novo impulso pelo incentivo estatal, durante a década de 80, por meio do programa Proálcool, com uma proposta alternativa ao uso dos derivados de petróleo, na tentativa de superar a crise instalada na época e atender a demanda do mercado interno e externo. No entanto, a indústria sucroalcooleira ganhou destaque não só na economia, como também na questão ambiental, devido a enorme quantidade de resíduos que produzia (e ainda hoje produz) (MORAES, 2015). Até a década de 80, por falta de uma legislação ambiental mais rigorosa, muitos desses resíduos eram destinados aos corpos d'água, causando sérios danos aos ecossistemas aquáticos. Após essa década, houve maior preocupação com o meio ambiente e valorização da biodiversidade. Encorajado e impulsionado por alguns tratados internacionais de cunho ambiental, o Brasil adotou medidas mais rigorosas com o intuito de preservar os recursos naturais, caracterizando a fase holística da legislação brasileira (FARIAS, 2009). Assim, resíduos que antes eram descartados diretamente nos rios, precisaram receber outro destino. A vinhaça, principal resíduo gerado pela indústria sucroalcooleira da cana-de-açúcar, é um exemplo disso.

A vinhaça, também conhecida por restilo ou vinhoto, é o principal resíduo da transformação da cana-de-açúcar em etanol, geralmente ácida (pH: 3,5-5,0), de coloração castanho-escura, de odor incômodo aos humanos e com alto conteúdo orgânico (COD: 50-150 gL⁻¹) (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011; CHRISTOFOLETTI et al., 2013a). A produção de etanol a partir de biomassa, resulta em um considerável volume de vinhaça, com alto potencial poluidor (WILKIE et al., 2000; FUESS; GARCIA, 2014); estima-se que para cada litro de etanol produzido seja gerado 10 a 15 litros de vinhaça como resíduo (CHRISTOFOLETTI et al., 2013a). O poder poluente deste líquido residual, cerca de cem vezes maior que o do esgoto doméstico, decorre da sua riqueza em matéria orgânica, baixo pH, elevada corrosividade e altos índices de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), além de elevada temperatura na saída dos destiladores. Assim, a vinhaça é considerada altamente nociva à fauna, flora, microbiota

das águas doces, além da capacidade de afugentar a fauna marinha que vem às costas brasileiras para procriação (SILVA et al., 2007).

Por outro lado, a vinhaça apresenta grande potencial para utilização em solos agrícolas, principalmente na forma de fertirrigação (PEDROSA et al., 2005; CHRISTOFOLETTI et al., 2013a). A adoção da prática de fertirrigação consiste na infiltração da vinhaça *in natura* no solo, por meio da irrigação das culturas de cana-de-açúcar (CAMARGO et al., 2009). Diversos autores, como Resende (1979), Glória e Orlando Filho (1983), Ball-Coelho et al. (1993), Lyra et al. (2003) e Silva e Cabeda (2005) constataram efeitos benéficos da vinhaça sobre o solo, frente ao aumento na retenção de umidade, porosidade, nível de potássio e condutividade elétrica observados.

Por possuir altas concentrações de potássio, nitrogênio e fósforo, elementos essenciais para o crescimento das plantas, o principal destino da vinhaça é sua utilização como fertilizante na própria cultura da cana-de-açúcar. A regulamentação da aplicação de vinhaça no solo foi estabelecida recentemente por uma norma da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), a qual se limita apenas para o estado e prescreve a quantidade máxima permitida de vinhaça por m³ de solo, de acordo com a concentração de potássio presente no solo e a necessidade de acréscimo deste íon para a cultura da cana (CETESB, 2006); entretanto, a quantidade de matéria orgânica e os impactos atmosféricos foram negligenciados (MORAES et al., 2015).

Devido a falta de fiscalização, grande parte das culturas canavieiras não seguem a regulamentação da CETESB e, diante da exorbitante quantidade de vinhaça gerada, aplicam esse resíduo indiscriminadamente na cultura. Ao promover modificações nas propriedades físicas do solo, a vinhaça pode tanto elevar a capacidade de infiltração da terra, contaminando as águas subterrâneas, como diminuí-la, promovendo o aumento do escoamento, com possível contaminação de águas superficiais. Além disso, os mecanismos de recarga dos lençóis freáticos e aquíferos são controlados principalmente pelos eventos de chuva. Deste modo, ao atingir o solo contendo vinhaça, a água pluvial pode infiltrar ou escoar superficialmente, poluindo os corpos d'água (SILVA et al., 2007).

Estudos de toxicidade da vinhaça em drosófilas (*Drosophila melanogaster*) mostraram que a taxa de fecundidade dos ovos e a fertilidade de fêmeas foram diminuídas consideravelmente com o aumento da concentração de vinhaça. Esse mesmo

estudo mostrou que a vinhaça altera a longevidade dos indivíduos, sendo este efeito muito mais significativo em machos e na concentração de 50% (YESILADA, 1999).

Em estudos realizados com *A. cepa* (cebola), Souza et al. (2013) observaram uma potencialização de efeitos clastogênicos de uma amostra de solo de *landfarming*, proveniente do tratamento de resíduos do petróleo, após a adição de vinhaça de cana-de-açúcar à amostra. As autoras inferiam que, provavelmente, houve a liberação dos metais pesados adsorvidos na matéria orgânica.

Christofoletti et al. (2013b) também testaram a toxicidade, em solo, da vinhaça, de um biosólido e diferentes combinações de ambos, por meio do teste com *Allium cepa*, antes e depois do bioprocessamento destas amostras por diplópodos. Após o bioprocessamento, as autoras observaram uma redução na toxicidade de ambos os resíduos.

Marinho et al. (2014) avaliaram os efeitos de diluições de vinhaça de cana-de-açúcar em fígados de tilápias (*Oreochromis niloticus*) e observaram alterações histopatológicas significativas, como perda da integridade citoplasmática, perda de limite celular, desorganização do tecido e redução no acúmulo de polissacarídeos de acordo com o aumento das diluições.

Tendo em vista o potencial poluidor da vinhaça e a possibilidade de contaminação do meio aquático por lixiviação/percolação desse resíduo, disposto no solo como fertilizante, estudos que avaliem a genotoxicidade da vinhaça e que proponham um tratamento eficaz na redução da toxicidade desse resíduo são de extrema importância.

2. Objetivos

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar a toxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar tratada quimicamente por ajuste de pH, por meio da análise do sangue periférico e de brânquias de tilápias (*O. niloticus*) expostas à diferentes diluições da mesma.

Os objetivos específicos constituem:

- Avaliar o potencial genotóxico da vinhaça de cana-de-açúcar tratada, pela avaliação da presença de células em processo de morte celular, células que apresentam anormalidades nucleares e eritrócitos micronucleados no sangue periférico de tilápias.

- Analisar a superfície das brânquias por meio da ultramorfolgia para avaliação de sua toxicidade.

- Analisar a estrutura do tecido branquial por meio de técnica histológica para observação de alterações provocadas pela vinhaça de cana-de-açúcar.
- Aplicar técnica histoquímica para análise mais detalhada da brânquia, buscando analisar certos tipos celulares (em particular células mucosas) e possíveis alterações fisiológicas.
- Verificar se a correção de pH é um método adequado e eficiente para a redução da toxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar.

3. Revisão de Literatura

3.1. Tratamentos da vinhaça

O tratamento de qualquer resíduo não é uma tarefa fácil, uma vez que precisam ser consideradas muitas variáveis, frente aos interesses políticos e econômicos. Para que o tratamento seja posto em prática, o mesmo tem que ser efetivo, não gerar resíduos, igualmente ou mais tóxicos do que o tratado, a eficiência do processo tem que ser mantida ao se passar de uma escala laboratorial para uma escala industrial e o custo benefício do tratamento precisa ser favorável. A vinhaça, além de ser uma mistura complexa, tem sua composição variada de acordo com a destilaria que a gera, com o processo de destilação empregado e até mesmo difere entre as safras (CHRISTOFOLETTI et al., 2013a). Esses fatores dificultam ainda mais o tratamento desse resíduo.

Entretanto, devido os efeitos tóxicos da vinhaça, muitas tecnologias vêm surgindo com o objetivo de reutilizar ou tratar a vinhaça para a redução de sua toxicidade (MANE et al., 2006; MOHANA et al., 2009). De acordo com a literatura, a vinhaça pode ser tratada tanto por processos físico-químicos como biológicos, que podem reduzir a toxicidade pela degradação de componentes orgânicos; os primeiros, normalmente envolvem reagentes para oxidar compostos orgânicos, enquanto os tratamentos biológicos são classificados como técnicas aeróbicas ou anaeróbicas, com utilização de microrganismos (BOTELHO et al., 2012).

Geralmente os processos físico-químicos são muito caros, necessitando de grandes volumes de água e grande quantidade de energia (CAMPOS et al., 2014). Esses mesmos autores avaliaram a eficiência do tratamento físico-químico e biológico da vinhaça resultante do processo de produção de cachaça e a comunidade microbiana em cada passo do tratamento; a vinhaça foi submetida a uma batelada num sistema de

fermentação de alto fluxo com lodo ativado, filtração, floculação, batelada em sistema de fermentação de baixo fluxo com lodo ativado, neutralização e desinfecção. Os autores conseguiram reduzir significativamente a carga poluidora desse resíduo, mas devido à presença de altos valores de taninos e sedimentos sólidos, resultantes do próprio tratamento, tal resíduo tratado ainda seria tóxico no meio aquático.

Botelho et al. (2012) avaliaram a toxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar nos microcrústaceos *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia magna* e no peixe *Danio rerio*, antes e depois de ajuste de pH. Os autores observaram uma diminuição na mortalidade desses organismos após o aumento do pH.

Santana et al. (2008) testaram a degradação fotolítica da vinhaça por radiação solar por meio de catalisadores a base de titânio. Os autores observaram que o tratamento não foi eficaz na mineralização da vinhaça, porém conseguiu reduzir a mortalidade do microcrustáceo *Artemia salina* reduzindo assim, a toxicidade da vinhaça.

Ferreira et al. (2011) avaliaram a diminuição da toxicidade da vinhaça tratada pelo fungo *Pleurotus sajor-caju* utilizando organismos aquáticos, como a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, os microcrustáceos *D. magna* e *D. similis* e o cnidário *Hydra attenuata*, como organismos-teste. Houve reduções de 82,8% na DQO (Demanda Química de Oxigênio), 75,3% na DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), 99,2% na coloração e 99,7% na turbidez da vinhaça, além de uma diminuição de sua toxicidade.

A maioria dos tratamentos propostos na literatura misturam tanto processos físico-químicos quanto biológicos. O tratamento biológico mais empregado é a digestão anaeróbia em reator de fermentação. A digestão anaeróbia consiste de vários processos bioquímicos complexos e sequenciais que ocorrem na ausência de oxigênio e dependem de pelo menos três grupos de microrganismos para promover estabilidade e autoregulação do sistema resultando na liberação de metano e dióxido de carbono (SPEECE, 1996; MADSEN et al., 2011; MORAES et al., 2015). Esses grupos de microrganismos incluem bactérias acidogênicas (ou fermentativas), bactérias acetogênicas e bactérias metanogênicas (MOSEY, 1982). Na presença de sulfato, sulfito ou tiosulfato, há também a atividade de bactérias redutoras de sulfato (O'FLAHERTY et al., 2006). O biogás produzido pelas bactérias na digestão anaeróbia pode ainda ser usado para fornecer energia para a própria usina de forma sustentável (MORAES et al., 2015).

Essa tecnologia surgiu no final do século XIX, mas nunca foi interessante para o setor sulcroatcooleiro, devido a baixa viabilidade econômica da geração de eletricidade a partir do biogás (CRAVEIRO et al., 1986). Contudo, devido a necessidade de diminuir a carga orgânica da vinhaça sem perder seus minerais para sua utilização como fertilizante, juntamente com economia energéticas da própria usina, a digestão anaeróbica vem ganhando espaço novamente (CHERUBINI, 2010).

De acordo com Moraes et al. (2015), no Brasil, há apenas uma usina no interior de São Paulo que utiliza a fermentação anaeróbia da vinhaça para a produção de biogás, mas ainda assim, o foco não é ambiental e sim econômico. Para esses mesmos autores a falta de investimentos para o tratamento anaeróbio da vinhaça em escala industrial nas usinas é o principal fator para esse tratamento não ocorrer, uma vez que com a fertirrigação os custos são menores para a maioria das usinas.

Embora haja estudos para o tratamento da vinhaça, poucos possuem o enfoque ambiental, com o intuito de diminuir a toxicidade desse resíduo para uma destinação mais segura ao meio ambiente. A grande pressão econômica, em busca de redução de gastos na produção do setor sulcroatcooleiro não favorecem os investimentos em projetos que visem a proteção do meio ambiente e a passagem de estudos promissores em escala laboratorial para a escala industrial. Por isso, estudos que alertem a problemática da disposição de resíduos no meio ambiente e proponham tratamentos economicamente viáveis são de extrema importância nos dias de hoje.

3.2. *Oreochromis niloticus* como bioindicador para o monitoramento ambiental

Os peixes são ecologicamente e economicamente muito importantes. Eles representam um grupo de vertebrados com diversos comportamentos e estratégias reprodutivas, além de desempenhar importante papel na cadeia alimentar, quer como predadores ou como presas; possuem ampla variação de comportamento e habitat, que aumentam seu potencial para a exposição a substâncias tóxicas (RAND, 2008).

Segundo Van Dick (2003), os peixes são organismos relativamente sensíveis a mudanças em seu ambiente, incluindo a incidência da poluição. Assim, o estado de saúde dos peixes é capaz de refletir e dar uma boa indicação da condição de um ecossistema aquático. Além disso, existe extensa literatura sobre seu comportamento, fisiologia e requerimentos ambientais, que os tornam relevantes como grupo de

organismos testes para avaliar os efeitos biológicos de substâncias tóxicas (RAND, 2008).

A tilápia (*Oreochromis* sp) é uma espécie nativa da África; originária da bacia do Rio Nilo (CARVALHO, 2006), foi introduzida no Brasil por volta de 1971, no Ceará (CASTAGNOLLI, 1992). A espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-nilo) pertencente à família Cichlidae (SANTOS, 1977), apresenta coloração cinza azulada, corpo curto e alto, cabeça e cauda pequenas (GALLI; TORLONI, 1984). A característica principal que distingue *O. niloticus* é a presença de listras verticais por todo comprimento da nadadeira caudal (COSTA-PIERCE, 2003).

É uma espécie de peixe cujo cultivo, bem como importância, vem crescendo, sendo atualmente uma das mais importantes aquiculturas do mundo, atrás apenas da cultura de carpas e salmonídeos. Além disso, é a mais importante espécie de tilápia cultivada, representando mais de 80% da produção total de tilápias (MOUSA; MOUSA, 1999; AL-SHAMSI et al., 2006). Esta espécie, que é primariamente, porém não estritamente herbívora, teve sua cultura favorecida em virtude de características como rápido crescimento, grande resistência às condições adversas e doenças, adaptabilidade à diversos tipos de meios e ambientes, entre outros (PONCE-MARBÁN et al., 2006). Outra característica que torna vantajosa a criação de tilápias é a capacidade do organismo em obter um ótimo desenvolvimento em grandes concentrações populacionais, característica que diminui o custo de manutenção *per capita* (PONCE-MARBÁN et al., 2006).

Segundo Girón-Pérez et al. (2007), a tilápia-do-nilo é um ótimo modelo para avaliação do ecossistema aquático e para realização de estudos toxicológicos. Os peixes, como um todo, são excelentes para este tipo de estudo, pois possuem a capacidade de retirar, estocar e bioacumular compostos e/ou poluentes em seus organismos (STREIT, 1998); por possuírem essas propriedades, eles podem sinalizar o potencial perigo de novas substâncias químicas ou para a possibilidade de poluição ambiental.

Outros autores afirmam, ainda, que eles são considerados bons organismos teste para monitorar a qualidade da água, especialmente as espécies pequenas de aquário, que podem ser mantidas em laboratório e facilmente expostas às substâncias tóxicas, sendo utilizadas na avaliação da presença de substâncias com potencial de causar danos à saúde humana (HARSHBARGER; CLARK, 1990; AL-SABTI; METCLAFE, 1995). Segundo Alves-Costa (2001), as espécies *O. niloticus* e *Hoplias malabariscus* são

excelentes sistemas-teste para ensaios laboratoriais realizados para a investigação da toxicidade de contaminantes em ecossistemas aquáticos. Logo, inúmeros trabalhos vêm empregando tilápias em estudos de poluição aquática (FIGUEIREDO-FERNANDES et al., 2006; VAN DICK et al., 2007; BIAGINI et al., 2009; SOUZA; FONTANETTI, 2006; FONTANETTI et al., 2012).

3.3. Ensaio do Cometa e Teste do Micronúcleo como ferramentas para estudos em toxicologia ambiental

O ensaio do cometa é um teste muito usado, que tem como objetivo detectar danos no DNA (COLLINS et al., 2014), sejam eles, quebras de fita simples e/ou duplas, bem como sítios álcali-lábeis (SPEIT; HARTMANM, 1995; SOUZA et al., 2005). Segundo Mitchelmore e Chipman (1998) e Koppen et al. (1999), o ensaio do cometa pode ser considerado rápido, economicamente viável, sensível e não necessita de muitas células para ser realizado.

O princípio básico do ensaio do cometa é a migração do DNA em uma matriz de agarose sob condições eletroforéticas. Quando observadas em microscópio, as células têm a aparência de um cometa, com cabeça (região nuclear) e uma cauda contendo os fragmentos de DNA que migraram em direção ao polo positivo, essas duas regiões compõem um nucleóide (HARTMANN et al., 2003). Dessa forma, quanto maior a cauda do cometa maior foi o dano genético induzido no nucleóide. Portanto, o ensaio do cometa é capaz de detectar quebras no material genético das células (SINGH et al., 1988); entretanto, essas lesões são consideradas primárias e, dessa forma, são passíveis de reparo. Assim, podem ou não resultar em alterações genéticas (COLLINS et al., 2014).

A análise do ensaio do cometa pode ser realizada visualmente ou por meio do uso de programas específicos. Visualmente, as células podem ser classificadas segundo Rigonato et al. (2005) de acordo com a categoria de migração da cauda em quatro classes (0, 1, 2 e 3), sendo que a classe 0 representa nenhum ou mínimo dano e a classe 3 representa máximo dano. É classificado em classe 0 quando não há migração de fragmentos de material genético (cauda); em classe 1, quando o tamanho da cauda do cometa não excede o diâmetro da cabeça; em 2 quando o tamanho da cauda é entre uma a duas vezes o tamanho da cabeça e em classe 3, quando o tamanho da cauda é maior que duas vezes o tamanho da cabeça.

Vários autores como Kumar et al. (2010) e Çavas (2011), utilizaram o ensaio do cometa para avaliar efeitos genotóxicos em peixes *Channa punctatus* e *Carassius auratus*, respectivamente. Todos observaram a eficácia do ensaio do cometa, constatando efeitos genotóxicos do inseticida malathion em *C. punctatus*, da atrazina em *C. auratus*, Hoshina e Marin-Morales (2011) e Souza e Fontanetti (2012) avaliaram o impacto do efluente de uma refinaria de petróleo em Paulínia, São Paulo, despejado no Rio Atibaia e a toxicidade da água do rio Paraíba do Sul próximo a essa mesma refinaria, respectivamente, utilizando o ensaio do cometa em eritrócitos de *O. niloticus*; os dados obtidos indicaram a presença de substâncias genotóxicas em dois pontos de coleta, no local de despejo do efluente da refinaria e na jusante do despejo.

O teste do micronúcleo é um ensaio citogenético comumente utilizado em vários sistemas biológicos, para o monitoramento de genotoxicidade ambiental e seu emprego vem crescendo exponencialmente ao longo dos anos (BOLT et al., 2011).

Micronúcleos são pequenas massas intracitoplasmáticas de cromatina, com aparência de um pequeno núcleo, resultantes de quebras cromossômicas e/ou aneuploidia durante a divisão celular (AL-SABTI; METCALFE, 1995; GRISOLIA; STARLING, 2001; KIRSCH-VOLDERS et al., 2011). Durante a telófase, o envoltório nuclear é formado ao redor do cromossomo inteiro ou do fragmento cromossômico perdido, que se descondensa e, gradualmente vai assumindo a morfologia de um núcleo interfásico, com exceção do tamanho, pois este é bem menor que o núcleo principal, razão pela qual é chamado de micronúcleo (FENECH et al., 2011; KIRSCH-VOLDERS et al., 2011).

Micronúcleos contendo cromossomos/cromátides inteiros podem ser formados após falha no fuso mitótico, levando a erros de ligação dos microtúbulos ao cinetócoro ou outras partes do aparato mitótico, erros no DNA centromérico ou em outras subestruturas cromossomais, levando assim a uma perda cromossômica e, conseqüentemente, a células aneuplóides (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011). Já micronúcleos contendo fragmentos cromossômicos se originam diretamente de quebras de fita dupla do DNA, conversão de quebras de fita simples em quebras de fita dupla após replicação, inibição da síntese de DNA, quebras de pontes anafásicas, ou amplificação de genes por quebras seguida de fusão (MATEUCA et al., 2006; FENECH et al., 2011; KIRSCH-VOLDERS et al., 2011).

Em suma, micronúcleos podem ser formados por diversos mecanismos, tanto genéticos quanto epigenéticos; como resultado de exposição a agentes clastogênicos e aneugênicos, ou formado espontaneamente como mecanismo de defesa, ou contribuindo para diferenciação celular (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011). Os micronúcleos formados podem ter dois destinos na célula: eles podem ser reincorporados ao núcleo principal após eventos de divisão celular, ou podem ser fixados na célula, conferindo assim, uma mutação (FENECH et al., 2011; KIRSCH-VOLDERS et al., 2011).

Junto com a observação de micronúcleos, anormalidades na morfologia nuclear também podem ser observadas e quantificadas. Descritas por Carrasco et al. (1990), as alterações morfológicas no envoltório nuclear em eritrócitos de peixes podem ser do tipo “blebbed”, núcleo que apresentam uma pequena evaginação nuclear, “lobed”, núcleo que apresenta uma grande evaginação nuclear, maior que os “blebbed”, e os “notched”, núcleos que apresentam invaginação pronunciada e vacuolização. Ainda segundo Cerqueira e Meireles (2014) há mais dois tipos de alterações nucleares a serem consideradas: os núcleos “broken-egg”, núcleos que apresentam uma estrutura similar e menor que um núcleo, conectada a ele por um filamento Feülgen-positivo; e “brotos”, projeção nuclear resultante de estrangulamento em uma pequena e limitada área da superfície celular.

Contudo, ainda não está totalmente esclarecido o mecanismo de formação dessas alterações nucleares. Entretanto, mesmo assim, estudos indicam que as anormalidades nucleares são induzidas em resposta a exposição a contaminantes (PALHARES; GRISOLIA, 2002; ERGENE et al., 2007) e estão relacionadas a formação de micronúcleos (CHEONG et al., 2013).

O teste do micronúcleo tem sido aplicado, com sucesso, em eritrócitos de peixes (HOSE et al., 1987; GRISOLIA; STARLING, 2001; SOUZA; FONTANETTI, 2006; FUZINATTO et al., 2013); por serem nucleados, são excelentes para a realização deste teste, uma vez que podem ser facilmente marcados como resultado de atividade clastogênica dos contaminantes (AL-SABTI; METCALFE, 1995); tem se mostrado uma técnica promissora *in vivo* para avaliar o potencial genotóxico, instabilidade cromossômica e a qualidade da água (FENECH et al., 2011; GRISOLIA; STARLING, 2001).

Osman et al. (2011), Ozkan et al. (2011) e Ragugnetti et al. (2011) avaliaram o potencial genotóxico da água do rio Nilo, da substância Ibuprofen e doses subletais de

cádmio, respectivamente, por meio do teste do micronúcleo em eritrócitos de *O. niloticus*, comprovando a eficácia do teste do micronúcleo e da tilápia como organismo teste.

3.4. Histopatologia das brânquias como biomarcador da poluição aquática

As brânquias dos peixes são constituídas por filamentos ou lamelas primárias, arrançados em aros duplos ao longo do osso. As lamelas secundárias são originadas nos filamentos e estão dispostas perpendicularmente às margens inferior e superior de cada filamento, servindo mais para sustentação da lâmina secundária, do que para processos de trocas gasosas (ROSETY-RODRÍGUEZ, 2002).

O epitélio branquial é constituído por diferentes tipos celulares, incluindo células pavimentosas ou respiratórias, células mucosas e células clorídricas, sendo estas últimas, em peixes de água doce, envolvidas em atividades de transporte iônico (LAURENT et al., 1985; LAURENT; PERRY, 1990). O número, tamanho, forma e estrutura das células clorídricas podem ser modificados pela exposição a certos fatores ambientais (JAGOE; HAINES, 1997; BRITO, 2009).

As células pavimentosas são caracterizadas por apresentar uma rede de cristas em sua superfície (LAURENT, 1982); as cristas, geralmente, são consideradas estruturas importantes na retenção de muco no epitélio branquial (LEWIS, 1979), indicativas de aumento da atividade celular (GOSS et al., 1994).

Mazon et al. (2002), estudando os efeitos do cobre nas brânquias de *Prochilodus scrofa*, em observação ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), detectaram uma redução das cristas das células pavimentosas, sendo a razão para esta redução, segundo o autor, desconhecida. Brito (2009) observou esta mesma redução em peixes expostos agudamente a águas de um lago impactado por metais. Biagini et al. (2009), analisando peixes criados em água poluída tratada por flotação, também observaram a perda das cristas nas células pavimentosas; os autores comentam que este é um bom parâmetro para detecção de toxicidade.

Para a avaliação histopatológica de diferentes órgãos de peixes, Bernet et al. (1999) propuseram um protocolo como ferramenta de avaliação semi-quantitativa. Neste protocolo, os autores dividem as alterações em cinco grupos: distúrbios circulatórios, alterações regressivas, alterações progressivas, inflamação e neoplasia. Os distúrbios circulatórios incluem hemorragias, aneurismas e edemas intercelulares; as

alterações regressivas são aquelas que culminam em uma redução funcional ou perda do órgão e, entre outras, podem ser alterações estruturais, como a fusão lamelar, desprendimento do epitélio respiratório, alterações nucleares e necroses; as alterações progressivas levam a um aumento da atividade de células ou tecidos, como a hiperplasia e o aumento da produção de muco; a inflamação é caracterizada por exudados, ativação do sistema endotelial e infiltração; e a neoplasia, caracterizada pela presença de tumores benignos e malignos.

Ao analisar brânquias em cortes histológicos corados com coloração convencional, de diferentes espécies submetidas à águas com diferentes poluentes, outros autores propuseram diferentes funções para as alterações encontradas; Mallat (1985) propôs que a fusão lamelar pode ter um caráter protetor, já que diminui a superfície das brânquias; porém, este tipo de lesão reduz a superfície branquial capaz de realizar trocas gasosas (HEMALATHA; BANERJEE, 1997). A hiperplasia do epitélio lamelar pode possuir uma função defensiva, pois aumenta a distância que as substâncias presentes na água têm que percorrer para alcançar a corrente sanguínea (ERKEM; KOLANKAYA, 2000). A ruptura do epitélio branquial reflete a ação deletéria direta dos poluentes (TEMMINK et al., 1983); além dessas alterações, outros autores encontraram focos de hemorragia nas brânquias (ROSETY-RODRÍGUEZ et al., 2002).

Técnicas histoquímicas podem ser utilizadas para observar certas alterações em alguns tipos celulares, uma vez que estas técnicas identificam com maior detalhe células que apresentam, em seu interior, componentes específicos como proteínas e glicoconjugados (FONTANETTI et al., 2011).

Jagoe e Haines (1997) utilizaram técnicas histoquímicas para estudar efeitos de água com adição de ácido e alumínio nas brânquias de salmão; observaram diferenças na distribuição, tamanho e forma das células clorídricas. Os autores sugerem que um aumento dessas células e mudanças em sua estrutura pode ocorrer na tentativa de aumentar a captação de íons do ambiente, uma vez que o pH baixo aumenta a saída desses íons.

Biagini et al. (2009), verificaram a eficiência do emprego de técnicas ultramorfológicas, histológicas e histoquímicas como ferramentas para o diagnóstico de alterações no tecido branquial de peixes *O. niloticus*. Por meio da técnica histoquímica PAS (Ácido Periódico Schiff), que marca polissacarídeos neutros, notaram um aumento

significativo de células mucosas nos grupos tratamentos, em comparação com o controle.

4. Materiais e Métodos

4.1. Material biológico

A espécie de peixe *O. niloticus* (Perciformes, Cichilidae), conhecida popularmente como tilápia do Nilo, foi utilizada neste trabalho como organismo teste. Foram utilizados cinco espécimes em cada tratamento (com réplica para cada um), totalizando 60 indivíduos, com tamanho médio de 10 cm, para evitar diferenças intra-específicas relacionadas ao tamanho e idade dos peixes. Os espécimes, oriundos de piscicultura, foram trazidos ao Instituto de Biociências, UNESP- Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, onde foram aclimatados em tanque, a temperatura média de 23°C, com sistemas de filtragem e aeração.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sendo protocolado sob nº 003518-2/2 em 24 de maio de 2013.

4.2. Vinhaça como substância tóxica

Para a montagem do bioensaio foi utilizada a vinhaça de cana-de-açúcar obtida em uma usina sucroalcooleira, localizada em uma cidade do interior do estado de São Paulo. O pH da vinhaça foi ajustado para 7 por meio da adição de cal (CaO), produto comumente utilizado no campo para correção do pH no solo; após a correção do pH, tais amostras foram misturadas diretamente nos aquários em diluições de 1%, 2,5%, 5% e 10%, tendo como base estudos de Algur e Kadioglu (1992), no qual foram usadas concentrações similares para estimar crescimento, biomassa e produção primária em *Pisum sativum* e *Helianthus annuus*, e estudos de Kumar e Gopal (2001), no qual estas diluições de vinhaça foram usadas em bioensaios com *Channa punctatus* (Pisces).

4.3. Montagem do bioensaio

Para os bioensaios foram utilizados cinco aquários, com capacidade de 40 L cada. Dois deles receberam água de poço artesiano, um para o controle negativo e o outro para o controle positivo, em cujos peixes foi injetada, intraperitonealmente, a substância ciclofosfamida (10cc/50 gramas de peixe). Os outros aquários receberam água e vinhaça tratada (pH 7,0) nas diluições de 1%, 2,5%, 5% e 10%. Os bioensaios

foram realizados em duplicata. Os aquários receberam aeração por 48 horas. Após esse período, cinco peixes, já aclimatados, foram colocados aleatoriamente em cada aquário, onde permaneceram por 96 horas, a fim de que fossem estimados os efeitos agudos da vinhaça.

4.4. Ensaio do cometa utilizando sangue periférico

Para o ensaio do cometa, a metodologia utilizada foi a técnica alcalina, baseada em Singh et al. (1988) e Christofolletti et al. (2009). A princípio, as lâminas foram mergulhadas em agarose normal (ponto de fusão normal) 1,5% à 60°C, e posteriormente secas e armazenadas. Após a punção cardíaca, com seringas devidamente heparinizadas, uma amostra de 5 µL do sangue dos peixes foi diluída em 1.000 µL de PBS. As lâminas pré-gelatinizadas foram montadas com 10 µL da suspensão celular + 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) à 37°C. Posteriormente, foi adicionada uma lamínula sobre cada lâmina, levando-as à geladeira, por 20 minutos, para solidificação do gel. Decorrido este tempo, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram mantidas em solução de lise gelada e recém-preparada (1 mL de triton X-100, 20 mL de DMSO e 79 mL de solução de lise estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, pH 10,0-10,5), em geladeira, por no mínimo uma hora, protegidas da luz.

A solução de lise possui propriedades detergentes e contém altas concentrações de sais, que promovem a desintegração das membranas celulares. Após a lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba horizontal de eletroforese contendo tampão alcalino (NaOH 300mM + EDTA 1mM, pH~13) à 4°C. A cuba foi disposta em um banho de gelo e a corrida de eletroforese foi realizada com voltagem constante (39V) e amperagem de 280-300 mA, por 20 minutos. Durante o tratamento alcalino, ocorreu o relaxamento e a desespiralização dos sítios de rompimento da molécula de DNA. As lâminas foram, então, neutralizadas com tampão (Tris-HCl 0,4M, pH 7,5) em três lavagens de 5 minutos cada, para a remoção de sais e detergentes, secas a temperatura ambiente e fixadas em etanol 100%, por 10 minutos, para precipitar o DNA e secar a agarose. Toda a metodologia acima foi realizada na ausência de luz.

As lâminas foram acondicionadas à temperatura ambiente para a secagem e estocadas para posterior análise. Foram analisados 100 nucleóides de cada peixe para a determinação da frequência das classes de cometas e escore de dano.

4.5. Teste do micronúcleo associado às anormalidades nucleares

Após exposição, os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,1g de benzocaína em 1 mL de álcool etílico para cada 100 mL de água deionizada). Para confecção das lâminas, foi retirado aproximadamente 0,3 cm³ de sangue, de cada peixe vivo, por meio de punção cardíaca, utilizando seringas heparinizadas. Após a punção, a agulha foi limpa com papel absorvente, a fim de se evitar a contaminação do sangue com líquido corporal e/ou muco. A primeira gota foi descartada, também para evitar a contaminação do sangue, sendo utilizadas as gotas posteriores para a confecção das lâminas, por meio da técnica de esfregaço sangüíneo.

Três extensões sangüíneas foram feitas para cada indivíduo. O material foi fixado em etanol absoluto por 10 minutos e secas à temperatura ambiente. Logo após, as lâminas foram submetidas à reação de Feulgen, com uma hidrólise ácida (11 minutos), em banho-maria à 60°C (MELLO; VIDAL, 1978).

Foram analisados 3000 eritrócitos de cada peixe, sob objetiva de imersão, para a determinação da frequência de células micronucleadas e portadoras de outras anormalidades nucleares.

4.6. Microscopia Eletrônica de Varredura

Após exposição, os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,1g de benzocaína em 1 mL de álcool etílico para cada 100 mL de água deionizada) e tiveram o segundo arco branquial retirado e fixado no fixador Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) e mantido em geladeira. A desidratação do material foi realizada utilizando uma série de concentrações crescentes de acetona, levado ao ponto crítico e colado em suporte metálico. O material foi então analisado ao microscópio eletrônico de varredura de baixo vácuo HITACHI TM3000 e fotografado.

4.7. Histologia

O segundo arco branquial dos espécimes expostos foi retirado e fixado em solução Bouin (15 ml de solução aquosa saturada de ácido pícrico, 5 ml de formaldeído e 1 ml ácido acético), durante aproximadamente 24 horas; em seguida, o material foi mergulhado em tampão fosfato de sódio pH=7,4 e mantido em geladeira.

O material foi desidratado em soluções de etanol 70, 80, 90, 95% durante 30 minutos cada banho. Posteriormente, o material foi transferido para uma solução de

resina de embebição Leica, por 24 horas em geladeira. O material foi então colocado em moldes preenchidos com resina contendo catalisador. Após o endurecimento da resina, o material foi seccionado com auxílio do micrótomo Leica RM2245; as secções foram hidratadas e recolhidas em lâminas. Depois de secas, as lâminas foram mergulhadas em hematoxilina de Harris por 6 minutos, depois foram colocadas em água, por 4 minutos, para que a reação ocorresse. Logo em seguida, as lâminas foram mergulhadas em eosina aquosa por 5 minutos, lavadas com água corrente, secas e montadas com entellan (Merck).

Foram analisadas duas lâminas com oito cortes de 6 µm para cada peixe, sendo n=5 para cada um dos bioensaios. Assim, foram analisados um total de 120 lâminas e 960 cortes histológicos.

A descrição e a avaliação das alterações histopatológicas tiveram como base o protocolo padronizado de Bernet et al. (1999) e adaptado por Marinho et al., (2014); neste protocolo, um fator de importância (*w*) foi definido para cada lesão, de acordo com sua importância patológica, ou seja, como isso afeta a função do órgão e a capacidade de sobrevivência dos peixes. As alterações foram previamente classificadas em três fatores de importância: (1) Importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível quando a exposição ao irritante termina; (2) Importância patológica moderada, a lesão é reversível na maioria dos casos, quando o estressor é neutralizado; e (3) Importância patológica acentuada, a lesão é geralmente irreversível, levando à perda parcial ou total da função do órgão. Para melhor compreensão dos resultados, as anomalias histopatológicas descritas foram também classificadas em escores (*a*) que variaram de 0 a 6, dependendo do grau e da extensão da alteração, sendo: (0) nenhuma ocorrência; (2) pouca ou rara ocorrência; (4) ocorrência frequente; e (6) ocorrência muito frequente. Além disso, valores intermediários também foram considerados. Ao multiplicar o fator de importância pelo escore, obtêm-se o índice da alteração. Para o cálculo do índice total de cada indivíduo, ou seja, o índice correspondente à avaliação das alterações histopatológicas em sua brânquia, foi utilizado o seguinte cálculo: $\text{Índice}_{\text{ind}} = \sum (\text{fator de importância} \times \text{escore})$. Os resultados encontrados no controle e nos tratamentos foram comparados entre si.

4.8. Histoquímica- Polissacarídeos neutros – Técnica Ácido Periódico-Schiff (PAS) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

Para observação de células mucosas, os cortes do material foram oxidados por 10 minutos em solução de ácido periódico 0,4% e colocados no reativo de Schiff por aproximadamente 1 hora no escuro; foram deixados então em água sulfurosa por 3 minutos e lavados em água corrente, por 30 minutos.

As células mucosas foram avaliadas segundo Biagini et al. (2009); três cortes histológicos, com três lamelas principais íntegras, de cada indivíduo, foram selecionados para a contagem de células mucosas. Dessas lamelas principais foram contadas as células mucosas de 30 regiões interlamelares de todos os indivíduos de todos os tratamentos.

4.9. Análise estatística dos resultados

Os dados gerados a partir da análise das lâminas para todas as técnicas utilizadas nesse estudo tiveram sua normalidade testada pelo método de Shapiro-Wilk. Com base no valor de significância deste teste, foi realizado o teste estatístico paramétrico ($p > 0,05$) ANOVA com teste pos-hoc de Tukey, ou o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, ambos com valor de significância com $p < 0,05$.

5. Resultados

Durante a realização desta dissertação foram produzidos dois artigos científicos a serem submetidos a revistas especializadas da área.

Artigo 1: Diminuição da toxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar a partir de ajuste de pH: Ensaio do Cometa e Teste do Micronúcleo em *Oreochromis niloticus*.

Artigo 2: Toxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar a partir da correção de seu pH com cal (CaO): Histopatologia de brânquias de *Oreochromis niloticus* (Perciformes: Cichlidae).

De modo a contribuir na comparação dos resultados segue em anexo um artigo relacionado ao tema que está em fase de submissão.

Artigo anexo: Análise histopatológica de brânquias de tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostos à vinhaça da cana-de-açúcar.

Autores: Correia, J.E.; Christofolletti, C.A.; Marcato, A.C.C.; Marinho, J.F.U.; Fontanetti, C.S.

Submetido a revista Science of the Total Environment

5.1. Artigo 1

Diminuição da toxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar a partir de ajuste de pH: Ensaio do Cometa e Teste do Micronúcleo em *Oreochromis niloticus* (Perciforme: Cichlidae)

Jorge E. Correia¹, Cintya Ap. Christofolletti², Yadira Ansoar-Rodríguez¹, Thays A. Guedes¹, Carmem S. Fontanetti ^{1*}

¹ UNESP (Universidade Estadual Paulista), Av. 24-A, 1515. Bela Vista. Rio Claro, SP, Brasil.

² Centro Universitário Hermínio Ometto (FHO- UNIARARAS), Av. Dr. João Maximiliano Baruto, 500. Jd. Universitário. Araras, SP, Brasil.

*Corresponding author: Tel.: +55 19 35264139; fax: +55 19 35264136.

E-mail: fontanet@rc.unesp.br

Resumo

A produção de resíduos industriais e sua destinação são temas de grande relevância atualmente. No Brasil a vinhaça, resíduo da destilação da cana-de-açúcar em etanol, se destaca, pois para cada litro de álcool produzido é gerado de 10 a 15 litros de vinhaça como resíduo, sendo o país o segundo maior produtor de etanol no mundo. Uma alternativa para a destinação desse resíduo é a fertirrigação da própria cultura da cana, porém as altas quantidades lançadas podem saturar o solo e assim, por lixiviação/percolação contaminar corpos d'água. O objetivo deste estudo foi verificar o potencial tóxico da vinhaça em tilápias (*Oreochromis niloticus*) e avaliar a eficácia do tratamento físico-químico deste resíduo por ajuste de pH com cal (CaO), produto acessível e barato. Foram aplicados o teste do micronúcleo e o ensaio do cometa em animais expostos a diluições de 1, 2,5, 5 e 10% de vinhaça bruta e ajustada a pH neutro. Os bioensaios com diluições de vinhaça *in natura* indicaram um potencial tóxico e genotóxico da vinhaça; os peixes da maior concentração morreram em menos de 48h de exposição; a incidência de micronúcleo foi significativa para todas as diluições. No ensaio do cometa, os escores de dano, com exceção da diluição de 1%, foram estatisticamente significativos para todas as diluições. No bioensaio com a vinhaça quimicamente tratada (pH neutro), a maioria dos peixes da diluição 10% sobreviveram, não houve incidência de micronúcleos estatisticamente significativa em relação ao controle negativo. Os escores de dano no ensaio do cometa foram similares aos resultados da vinhaça não tratada. O tratamento da vinhaça por meio de ajuste de seu pH mostrou-se uma alternativa eficaz na diminuição da toxicidade desse resíduo, uma vez que reduziu a mortalidade dos peixes nas maiores concentrações e também a incidência de danos no DNA. No entanto o uso da cal deve ser feita com cautela, uma vez a vinhaça já possui altas concentrações de potássio e sulfato, podendo contribuir para uma salinização.

Palavras-chave: Toxicidade, resíduo agroindustrial, fertirrigação, indústria sucroalcooleira, contaminação ambiental.

1. Introdução

Atualmente, um dos temas de discussão mais relevantes na comunidade científica mundial é o impacto gerado pelas atividades antrópicas ao meio ambiente, o qual influencia a qualidade da água, do solo e do ar. Neste sentido, o setor agrícola ganha destaque mundial, uma vez que as monoculturas necessitam de grandes áreas de terra, fazem uso excessivo de agrotóxicos e produzem grande quantidade de resíduos, os quais podem conter elementos e substâncias potencialmente poluidoras (WILKIE et al., 2000; RIBEIRO et al., 2007; UNICA, 2007; FUESS; GARCIA, 2014).

A vinhaça, caracterizada como efluente com alto poder poluente e alto valor fertilizante, é o principal resíduo da indústria sucroalcooleira, possui pH ácido (pH 3,5-5) e coloração castanho-escuro (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011; CHRISTOFOLETTI et al., 2013). O poder poluente deste líquido residual é cerca de cem vezes maior que o do esgoto doméstico, devido a sua riqueza em matéria orgânica, baixo pH, elevada corrosividade e altos índices de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), além de elevada temperatura na saída dos destiladores. A produção de etanol a partir de biomassa resulta em um considerável volume de vinhaça; em média, para cada litro de etanol são gerados de 10 a 15 litros de vinhaça como resíduo (KUMAR; GOPAL, 2001; CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo (UNICA, 2014), com capacidade de produzir em torno de 25 bilhões de litros de etanol por ano (UNICA, 2014). A vinhaça é considerada altamente nociva à fauna, flora, microbiota das águas doces, além da capacidade de afugentar a fauna marinha que vem às costas brasileiras para procriação (SILVA et al., 2007). Por outro lado, a vinhaça apresenta grande potencial para utilização em solos agrícolas, principalmente na forma de fertirrigação (PEDROSA et al., 2005; CHRISTOFOLETTI et al., 2013; FUESS; GARCIA, 2014).

Ao promover modificações nas propriedades físicas do solo, a vinhaça pode tanto elevar a capacidade de infiltração da terra, contaminando as águas subterrâneas, como reduzi-la, promovendo a elevação do escoamento, com possível contaminação de águas superficiais. Além disso, os mecanismos de recarga dos lençóis freáticos e aquíferos são controlados principalmente pelos eventos de chuva. Deste modo, ao atingir o solo contendo vinhaça, a água pluvial pode infiltrar ou escoar superficialmente, poluindo os corpos d'água (SILVA et al., 2007).

Devido os efeitos tóxicos da vinhaça, muitas tecnologias vêm surgindo com o objetivo de reutilizar ou tratar a vinhaça para a redução de sua toxicidade (MANE et al., 2006; MOHANA et al., 2009). A vinhaça pode ser tratada tanto por processos físico-químicos como biológicos, que podem reduzir a toxicidade pela degradação de componentes orgânicos; os primeiros, normalmente envolvem reagentes para oxidar compostos orgânicos, enquanto os tratamentos biológicos são classificados como técnicas aeróbicas ou anaeróbicas (BOTELHO et al., 2012). Geralmente os processos físico-químicos são muito caros, necessitando de grandes volumes de água e grande quantidade de energia (CAMPOS et al., 2014).

Tendo em vista a importância da água para a vida e a relevância da contaminação dos recursos hídricos por resíduos agroindustriais, dentre eles a vinhaça de cana-de-açúcar, que pode chegar ao ambiente aquático por despejo indiscriminado em campo, lixiviação e/ou percolação, é imprescindível estudos que avaliem a sua toxicidade e proponham tratamentos eficazes e economicamente viáveis.

Nesse sentido, com o intuito de verificar uma possível redução da toxicidade/genotoxicidade da vinhaça da cana-de-açúcar, o presente estudo objetivou avaliar a eficácia do tratamento físico-químico deste resíduo por ajuste de pH com cal (CaO), produto acessível e barato, por meio de testes com tilápias (*Oreochromis niloticus*). Foram aplicados o teste do micronúcleo e o ensaio do cometa em animais expostos a diluições de 1, 2,5, 5 e 10% de vinhaça bruta e ajustada a pH neutro, para observação de alterações do DNA dos animais.

2. Material e métodos

2.1. Material Biológico

A espécie de peixe *O. niloticus* (Perciformes, Cichilidae), conhecida popularmente como tilápia do Nilo, foi utilizada neste trabalho como organismo teste. Foram utilizados cinco espécimens em cada tratamento (com réplica para cada um), totalizando 120 indivíduos, com tamanho médio de 10 cm, para evitar diferenças intra-específicas relacionadas ao tamanho e idade dos peixes. Os espécimes, oriundos de piscicultura, foram trazidos ao Instituto de Biociências, UNESP- Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, onde foram aclimatados em tanque, a temperatura média de 23°C, com sistemas de filtragem e aeração.

Os bioensaios foram aprovados pelo “Comitê de Ética no Uso de Animal”, do Instituto de Biociências, da UNESP – Campus de Rio Claro e, está protocolado sob nº 1047 de 16.02.2011 e nº 003518-2/2 em 24 de maio de 2013.

2.2. Vinhaça

Para a montagem dos bioensaios foi utilizada a vinhaça de cana-de-açúcar obtida junto à uma indústria sucroalcooleira, localizada no município de Araras (22° 21' 25" S, 47° 23' 03" W), São Paulo, Brasil. As amostras de vinhaça foram trazidas ao Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Rio Claro mantidas em geladeira a 4°C até serem utilizadas. Para a realização dos bioensaios foram utilizadas amostras de vinhaça de três safras diferentes (2010, 2011 e 2013).

2.3. Tratamento da vinhaça – safra 2013

O pH da vinhaça foi ajustado para 7 por meio da adição de cal (CaO), produto comumente utilizado no campo; após a correção do pH, tais amostras foram misturadas diretamente nos aquários em diluições de 1, 2,5, 5 e 10% .

2.4. Montagem dos experimentos

Foram realizados experimentos com as diluições de vinhaça bruta com uma repetição (vinhaça safra 2010 e 2011) e de vinhaça tratada em réplica utilizando as mesmas diluições (vinhaça safra 2013). No primeiro bioensaio com vinhaça *in natura* foram utilizadas apenas as diluições de 1, 5 e 10%; para uma melhor compreensão de seus efeitos tóxicos, foi adicionada aos bioensaios seguintes a diluição de 2,5% de vinhaça. O design experimental para todos os bioensaios foi o mesmo. Foram utilizados aquários com capacidade de 40 L cada. Dois deles receberam água de poço artesiano, um para o controle negativo e o outro para o controle positivo; para o controle positivo, os peixes receberam injeções intraperitoneais de ciclofosfamida (10cc/50 gramas de peixe) na concentração de 22 mg mL⁻¹. Os outros aquários receberam água e vinhaça nas diluições de 1, 2,5, 5 e 10%. Os aquários receberam aeração por 48 horas. Após esse período, cinco peixes, já aclimatados, foram colocados aleatoriamente em cada aquário, onde permaneceram por 96 horas, a fim de que fossem estimados os efeitos agudos da vinhaça.

2.5. Análises físico-químicas das amostras de vinhaça

Foram realizadas análises físico-químicas e de metais das amostras de vinhaça bruta e das águas dos aquários com as diluições de vinhaça tratada após realização dos bioensaios. Os parâmetros foram: pH, dureza, condutividade elétrica, nitrogênio amoniacal, nitrogênio Kjeldhal, sódio, cálcio, potássio, magnésio, sulfato, fosfato total, DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e DQO (Demanda Química de Oxigênio), Os metais analisados foram: Al, Ba, B, Pb, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn.

2.6. Ensaio do cometa

Para o ensaio do cometa, a metodologia utilizada foi a técnica alcalina, baseada em Singh et al. (1988) e Christofolletti et al. (2009). A princípio, as lâminas foram mergulhadas em agarose normal (ponto de fusão normal) 1,5% à 60°C, e posteriormente secas e armazenadas. Após a punção cardíaca, com seringas devidamente heparinizadas, uma amostra de 5 µL do sangue dos peixes foi diluída em 1.000 µL de PBS (Phosphate buffer solution). As lâminas pré-gelatinizadas foram montadas com 10 µL da suspensão celular + 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) à 37°C. Posteriormente, foi adicionada uma lamínula sobre cada lâmina, levando-as à geladeira, por 20 minutos, para solidificação do gel. Decorrido este tempo, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram mantidas em solução de lise gelada e recém-preparada (1 mL de triton X-100, 20 mL de DMSO e 79 mL de solução de lise estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, pH 10,0-10,5), em geladeira, por no mínimo uma hora, protegidas da luz.

Após a lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba horizontal de eletroforese contendo tampão alcalino (NaOH 300mM + EDTA 1mM, pH~13) à 4°C. A cuba foi disposta em um banho de gelo e a corrida de eletroforese foi realizada com voltagem constante (39V) e amperagem de 280-300 mA, por 20 minutos. As lâminas foram, então, neutralizadas com tampão (Tris-HCl 0,4M, pH 7,5) em três lavagens de 5 minutos cada, para a remoção de sais e detergentes, secas a temperatura ambiente e fixadas em etanol 100%, por 10 minutos, para precipitar o DNA e secar a agarose. Toda a metodologia acima foi realizada na ausência de luz.

As lâminas foram acondicionadas à temperatura ambiente para a secagem e estocadas para posterior análise. Foram analisados 100 nucleóides de cada peixe para a determinação da frequência das classes de cometas e escore de dano. Visualmente, as células foram classificadas de acordo com a categoria de migração da cauda em quatro classes (0, 1, 2 e 3), sendo que a classe 0 representa nenhum ou mínimo dano e a classe

3 representa máximo dano. É classificado em classe 0 quando não há migração de fragmentos de material genético (cauda); em classe 1, quando o tamanho da cauda do cometa não excede o diâmetro da cabeça; em 2 quando o tamanho da cauda é entre uma a duas vezes o tamanho da cabeça e em classe 3, quando o tamanho da cauda é maior que duas vezes o tamanho da cabeça (RIGONATO et al., 2005).

2.7. Teste do Micronúcleo associado à anormalidades nucleares

Após exposição, os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,1g de benzocaína em 1 mL de álcool etílico para cada 100 mL de água deionizada). Para confecção das lâminas, foi retirado aproximadamente 0,3 cm³ de sangue, de cada peixe vivo, por meio de punção cardíaca, utilizando seringas heparinizadas. Após a punção, a agulha foi limpa com papel absorvente, a fim de se evitar a contaminação do sangue com líquido corporal e/ou muco. A primeira gota foi descartada, também para evitar à contaminação do sangue, sendo utilizadas as gotas posteriores para a confecção das lâminas, por meio da técnica de esfregaço sangüíneo.

Três extensões sangüíneas foram feitas para cada indivíduo. O material foi fixado em etanol absoluto por 10 minutos e secas à temperatura ambiente. Logo após, as lâminas foram submetidas à reação de Feulgen, com uma hidrólise ácida (11 minutos), em banho-maria à 60°C (MELLO; VIDAL, 1978). Foram analisados 3000 eritrócitos de cada peixe, sob objetiva de imersão, para a determinação da frequência de células micronucleadas e portadoras de outras anormalidades nucleares.

2.8. Análises estatísticas

Tanto para as análises do teste do micronúcleo quanto para o ensaio do cometa os valores obtidos na quantificação tiveram sua normalidade testada pelo método Shapiro-Wilk e foi empregado o método estatístico de Kruskal-Wallis com valor de $p < 0,05$, com auxílio do programa estatístico IBM SPSS Statistics 22 (IBM Company).

3. Resultados

3.1. Análises físico-químicas

As análises físico-químicas da vinhaça nas três safras utilizadas nos bioensaios estão na tabela 1. Por meio de tais análises, observaram-se algumas diferenças entre as safras, porém o pH baixo, altas concentrações de DBO e DQO, grandes quantidades de potássio, características desse resíduo, foram confirmadas. Houve também presença de

metais, tais como bário, cobre, cromo, níquel e zinco, em pelo menos duas safras estudadas. Foi observada a presença de outros metais, como alumínio, cobalto, ferro, manganês e mercúrio em uma das safras.

O pH das diluições após a introdução dos peixes nos aquários não permaneceu estável; com o fim da exposição, com exceção da diluição de 10%, o pH estava alcalino, 9,2 na vinhaça 1%, 8,4 na vinhaça 2,5% e 8,9 na vinhaça 5%. A DBO e a DQO da vinhaça reduziram consideravelmente nas diluições de vinhaça tratada.

3.2. Mortalidade dos peixes

A mortalidade dos peixes expostos às diluições de vinhaça bruta foi alta; todos os peixes da diluição de 10% de vinhaça bruta morreram em menos de 48h de exposição nos bioensaios de 2010 e 2011. No primeiro bioensaio (safra 2010) a mortalidade foi ainda maior, uma vez que todos os peixes da diluição 5% também morreram.

No bioensaio realizado em réplica (safra 2013), com diluições da vinhaça tratada com cal, observou-se a morte de três indivíduos na maior diluição, uma considerável redução na mortalidade dos peixes em comparação com a vinhaça bruta das amostras anteriores.

3.3. Ensaio do Cometa

A frequência de nucleóides em cada classe de migração e o escore do dano dos bioensaios com vinhaça *in natura* e vinhaça tratada está representada em forma de média e desvio padrão nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

No primeiro bioensaio com a vinhaça *in natura*, foram observados valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, apenas para os animais do controle positivo. Diferentemente, no segundo bioensaio, devido a adição da diluição de 2,5% e a sobrevivência dos peixes na diluição de 5%, observou-se escores de dano estatisticamente significativos nessas diluições. Os valores obtidos no segundo bioensaio revelaram uma resposta dose-dependente no escore dos danos, portanto quanto maior a concentração de vinhaça na água, maior o dano causado ao DNA dos peixes.

Após o ajuste da vinhaça para um pH neutro, apenas a diluição de 1% não apresentou diferenças significativas em relação ao controle negativo quanto ao escore de danos e a todas as classes de cometa. Mesmo com a sobrevivência dos peixes da

diluição de 10%, a resposta continuou dose-dependente em relação ao escore de danos e aos cometas classe 3.

3.4. Teste do micronúcleo associado à anormalidades nucleares

Os peixes expostos à vinhaça *in natura* apresentaram um aumento estatisticamente significativo na incidência de micronúcleos quando comparados ao controle negativo para todas as diluições, com exceção da diluição de 1% no segundo bioensaio (Tabela 2).

Após o tratamento da vinhaça por meio da neutralização de seu pH, houve uma redução na incidência de eritrócitos micronucleados, não havendo diferenças significativas entre o controle e todas as diluições de vinhaça (Tabela 2).

Em relação às anormalidades nucleares foram observados eritrócitos portadores de núcleos com diferentes morfologias (Figura 1). As observações das anormalidades foram realizadas segundo as descritas por Carrasco et al. (1990) como: tipo “notched” (Figura 1B), núcleos que apresentam invaginação pronunciada e/ou vacuolização; “blebbed” (Figura 1C), núcleo que apresentam uma pequena evaginação nuclear; “lobed” (Figura 1D), núcleo que apresenta uma grande evaginação nuclear, maior que os “blebbed”. Ainda segundo Cerqueira e Meireles (2014) há mais dois tipos de alterações nucleares: “brotos”, projeção nuclear resultante de estrangulamento em uma pequena e limitada área da superfície celular (Figura 1E) e núcleos “broken-egg”, núcleos que apresentam uma estrutura similar e menor que um núcleo, conectada a ele por um filamento Feülgen-positivo (Figura 1F).

A incidência de anormalidades nucleares foi significativa em relação ao controle negativo para todas as concentrações de vinhaça *in natura* no segundo bioensaio. Não foram observadas diferenças significativas na incidência de anormalidades nucleares no primeiro bioensaio com vinhaça *in natura*, e tampouco no bioensaio com a vinhaça quimicamente tratada (Tabela 2).

4. Discussão

Dado o potencial de contaminação da vinhaça, é de grande importância estudos que avaliem sua toxicidade e os possíveis impactos ao meio ambiente, utilizando bioindicadores e biomarcadores sensíveis e eficientes na detecção de um potencial poluidor; se comprovado sua toxicidade, é fundamental propor meios de reduzi-la possibilitando minimizar seu impacto sobre os ecossistemas.

No presente estudo foram realizados dois bioensaios para avaliar o possível efeito tóxico de diluições de vinhaça *in natura*. No primeiro, provavelmente, devido à alta quantidade de matéria orgânica, altos valores de DBO e DQO, e também à presença de alguns metais como níquel, mercúrio, bário e molibdênio na vinhaça, os peixes das diluições 5% e 10% morreram, em menos de 48h. Na repetição do bioensaio, tendo em vista a mortandade dos peixes nas diluições mais altas, foi adicionada ao desenho experimental uma diluição de 2,5%, para melhor compreensão dos possíveis efeitos tóxicos da vinhaça. Durante esse bioensaio, diferentemente do primeiro, os peixes da concentração 5% sobreviveram. Pelos resultados obtidos nas análises químicas, inferiu-se que a morte dos peixes da concentração 5% no primeiro bioensaio, pode ter sido decorrente da presença dos diferentes metais, em diferentes concentrações, não detectados nas análises do segundo bioensaio.

Na avaliação da genotoxicidade pelo ensaio do cometa, os resultados dos bioensaios com vinhaça não tratada mostraram uma ação genotóxica estatisticamente significativa em quase todas as diluições, com exceção da diluição 1%; os escores de dano aumentaram de forma dose-dependente. O teste do cometa tem como objetivo detectar danos no DNA (COLLINS et al., 2014), sejam eles, quebras de fita simples e/ou duplas, bem como sítios álcali-lábeis (SPEIT; HARTMANM, 1995; SOUZA et al., 2005; ANSOAR-RODRÍGUEZ et al., 2015), entretanto, essas lesões são consideradas primárias e, dessa forma, são passíveis de reparo (COLLINS et al., 2014). Provavelmente a alta concentração de cromo no segundo bioensaio pode ter induzido a essas alterações.

Em relação a análise do teste do micronúcleo das diluições de vinhaça *in natura*, observou-se que os valores de eritrócitos micronucleados foram estatisticamente significativos para todas as diluições com exceção da diluição 1%, no segundo bioensaio. Micronúcleos são biomarcadores de eventos genotóxicos e de instabilidade cromossômica (FENECH et al., 2011), que quando formados podem ter dois destinos na célula: eles podem ser reincorporados ao núcleo principal após eventos de divisão celular, ou podem ser fixados na célula, conferindo assim, uma mutação (FENECH et al. 2011; KIRSCH-VOLDERS et al., 2011).

Assim como a quantificação de micronúcleos, os valores de anormalidades nucleares encontrados foram estatisticamente significativos para todas as diluições testadas, com exceção da diluição 1% no primeiro bioensaio. Essas anormalidades nucleares podem decorrer de alterações na estrutura do DNA, como quebras de fita

simples ou quebras de fita dupla e da formação de adutos (ligação covalente de um elemento ou composto químico com as bases nitrogenadas do DNA), entre outros (GRISOLIA, 2005; KIRSCH-VOLDERS, 2011). Ainda de acordo com esses autores, uma provável causa da iniciação do câncer pode ser a formação dessas anormalidades nucleares, como resultado da interação de compostos genotóxicos com o DNA. Estudos indicam que as anormalidades nucleares são induzidas em resposta a exposição a contaminantes (PALHARES; GRISOLIA, 2002; ERGENE et al., 2007) e estão relacionadas a formação de micronúcleos (CHEONG et al., 2013).

No primeiro bioensaio, os valores de micronúcleos foram maiores do que os obtidos no segundo, provavelmente, devido a presença de diferentes metais como o bário, o cromo, o níquel (em concentração acima do permitido pela CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo), mercúrio e molibdênio, detectados pelas análises químicas da primeira coleta e não observados na segunda. Tais resultados reforçam a importância das análises químicas de misturas complexas, tal como a vinhaça, pois podem auxiliar no esclarecimento dos efeitos observados nos organismos expostos e demonstrar que há uma variação de elementos químicos, o que deve ser considerado para a sua disposição na agricultura.

Embora todos os metais detectados na primeira amostra (Safra 2010) não o tenham sido na segunda (Safra 2011), observou-se que a concentração de cromo detectada na segunda amostra de vinhaça foi bem maior que a primeira. De acordo com a literatura, os íons cromo na sua forma trivalente são altamente benéficos, porém no seu estado de oxidação VI, esse elemento é classificado como mutagênico e carcinogênico em animais (QUEIROZ FERREIRA, 2001; MATSUMOTO et al., 2006). Uma vez que o efluente em estudo provém de uma destilação, formas oxidadas desse elemento seriam extremamente possíveis e pode ter sido a causa dos danos.

Devido os efeitos tóxicos da vinhaça, muitas tecnologias vêm surgindo com o objetivo de reutilizar ou tratar a vinhaça para a redução de sua toxicidade (MANE et al. 2006; MOHANA et al., 2009). Ferreira et al. (2011) avaliaram a redução da toxicidade da vinhaça tratada pelo fungo *Pleurotus sajor-caju* utilizando organismos aquáticos, como a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, os microcrustáceos *Daphnia magna* e *D. similis* e o cnidário *Hydra attenuata*, como organismos-teste. Houve reduções de 82,8% na DQO, 75,3% na DBO, 99,2% na coloração e 99,7% na turbidez da vinhaça, além de uma redução de sua toxicidade. Do mesmo modo, Botelho et al. (2012) avaliaram a toxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar nos microcrustáceos *Ceriodaphnia*

dubia e *D. magna* e no peixe *Danio rerio*, antes e depois de ajuste de pH. Os autores observaram uma redução na mortalidade desses organismos após o aumento do pH. Campos et al. (2014) avaliaram a eficiência do tratamento físico-químico da vinhaça oriunda da produção de cachaça e a comunidade microbiana em cada passo do tratamento. Os autores conseguiram reduzir significativamente a carga poluidora desse resíduo, mas devido a persistência de altos valores de taninos e sedimentos sólidos, proveniente do próprio tratamento, ainda seria tóxico no meio aquático.

Tendo isso em vista, somado à observação do potencial genotóxico da vinhaça de cana-de-açúcar demonstrado nesse estudo, foi realizado um bioensaio para avaliar a redução da toxicidade desse resíduo pelo tratamento químico da vinhaça, elevando seu pH de ácido para neutro (pH=7,0), utilizando cal, produto já utilizado em campo para correção do pH do solo e de baixo custo. Contudo nesse bioensaio, o pH estabilizado em 7,0, não se manteve após o período de exposição dos peixes por 96 horas, atingindo valores alcalinos, com exceção da concentração de 10%. Provavelmente, a presença dos peixes pode ter ocasionado um desbalanço no sistema e favorecido a liberação de moléculas hidroxilas provenientes da interação cal/água.

No bioensaio com vinhaça tratada houve morte de três peixes em uma das réplicas da diluição de 10% de vinhaça tratada. Mesmo com o pH alcalino houve uma redução na mortalidade dos peixes expostos às diluições de vinhaça tratada em comparação à peixes expostos as mesmas diluições de vinhaça bruta, indicando assim, que o tratamento com a cal conseguiu minimizar os efeitos letais da vinhaça em concentrações mais altas.

Em relação ao ensaio do cometa, houve diferenças significativas nos escores de dano e cometas de classe 3 entre os controles e as três maiores diluições. Collins et al. (2014), afirmaram que o ensaio do cometa é muito sensível e que vários fatores externos, como por exemplo, o tempo entre a coleta do sangue e o processamento da amostra, e temperatura da amostra, podem favorecer maiores danos; no tempo entre coleta e processamento do sangue pode haver reparo nos danos do DNA, a menos que as amostras sejam armazenadas a 4°C ou em gelo, mas, por outro lado o sangue mantido a 4°C pode levar a um aumento nos danos em relação a amostras mantidas a temperatura ambiente.

Na avaliação da genotoxicidade pelo teste do micronúcleo associado à anormalidades nucleares não foram observadas diferenças significativas entre as diluições de vinhaça tratada e o controle negativo. Assim, comparando os resultados

entre as diluições de vinhaça tratada e não tratada, observou-se uma redução na presença de eritrócitos micronucleados, sugerindo uma redução do potencial genotóxico desse resíduo quando tratado quimicamente. Os valores obtidos pela quantificação das anormalidades nucleares não variaram muito entre a vinhaça tratada e a não tratada.

Tendo em vista o cenário mundial, onde há crescente preocupação com o meio ambiente e valorização de combustíveis “verdes”, a perspectiva de crescimento do setor sulcroativo aumenta. Assim, monitorar os efeitos dos efluentes na natureza é de extrema importância. O uso indiscriminado de vinhaça nos canais sugere precaução; embora esse resíduo possa atuar como fertilizante e ser benéfico para as plantas, esse efluente também pode ser lixiviado ou sofrer percolação no perfil de solo e acabar chegando a corpos d’água ou lençóis subterrâneos, podendo contaminar assim o meio aquático, principalmente por metais não essenciais, que são conhecidamente mutagênicos e carcinogênicos. Portanto, buscar tratamentos que possam mitigar os efeitos tóxicos de potenciais contaminantes é de extrema importância.

5. Conclusão

Pelos resultados obtidos pelo teste do micronúcleo e outras anormalidades em eritrócitos circulantes e no ensaio do cometa em peixes da espécie *O. niloticus*, expostos a diluições de vinhaça de cana-de-açúcar pode-se concluir que este resíduo possui potencial genotóxico para todas as diluições e letalidade em concentrações maiores. O tratamento químico da vinhaça por meio de ajuste de seu pH se mostrou uma alternativa eficaz na redução da toxicidade desse resíduo, uma vez que reduziu a mortalidade dos peixes nas maiores concentrações e também a incidência de micronúcleos. Considerando a elevada quantidade de potássio e sulfato presente na vinhaça, a adição de cal poderia contribuir na aceleração do processo de salinização do solo e, portanto, seu uso deve ser feito com cautela.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2011/06749-8, 2013/13228-0, 2012/50197-2, pelo apoio financeiro, aos doutores Dejanira de Franceschi de Angelis, Matheus Mantuanelli Roberto pela revisão do artigo e aos pesquisadores Ana Claudia de Castro Marcato e Nilton Riguetto Neto pela ajuda na montagem dos bioensaios e contribuições.

7. Referências bibliográficas

ANSOAR-RODRÍGUEZ, Y.; FONTANETTI, C.S.; CHRISTOFOLETTI, C.A.; DÍAZ-LLERA, S. del C. Aplicaciones del ensayo cometa en genética ecotoxicológica. **CENÍC**, v.46, n.1, p.51-62, 2015.

BOTELHO, R.G.; TORNISIELO, V.L.; de OLINDA, R.A.; MARANHO, L.A.; MACHADO-NETO, L. Acute toxicity of sugarcane vinasse to aquatic organisms before and after pH adjustment. **Toxicological and Environmental Chemistry**, p. 1-11, 2012.

CAMPOS, C.R.; MESQUITA, V.A. SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F. Efficiency of physicochemical and biological treatments of vinasse and their influence on indigenous microbiota for disposal in environment. **Waste Management**, v. 34, p. 2036-2046, 2014.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MAYERS, M.S. Assessment of the piscine micronuclei test as in situ biological indicator of chemical contaminants effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, Ottawa, v.47, p.2123-2136, 1990.

CERQUEIRA, E. D. M. M.; MEIRELES, J. R. C. The Use of the Micronucleus Test to Monitor Individuals at Risk of Oral Cancer. **In: Concept Press Admin Team. (Org.). The Research and Biology of Cancer. 1ed. Hong Kong: iConcept Press Ltd., 2014, p. 33-58.**

COLLINS, A., KOPPEN, G., VALDIGLESIAS, V., DUSINSKA, M., KRUSZEWSKI, M., MØLLER, P.; ROJAS, E.; DHAWAN, A.; BENZIE, I.; COSKUN, E.; MORETTI, M.; SPEIT, G.; BONASSI, S. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v.759, p.27-39, 2014.

CHEONG, H. S., SETH, I., JOINER, M. C., & TUCKER, J. D. Relationships among micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds within individual cells in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutagenesis**, v.28, n.4, 433-440, 2013.

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

CHRISTOFOLETTI, C.A.; DAVID, J.A.O.; FONTANETTI, C.S. Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus*: a methodological comparisons. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, p.155-159, 2009.

DEMATTE, J. L. I. Recuperação e manutenção da fertilidade dos solos. **Visão agrícola**, v. 1, p. 48-59, 2004.

ERGENE, S.; ÇAVAS, T.; ÇELIK, A.; KOELI, N.; KAYA, F.; KARAHAN, A. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. **Ecotoxicology**, v. 16, p. 385-391, 2007.

ESPAÑA-GAMBOA, E., MIJANGOS-CORTES, J., BARAHONA-PEREZ L., DOMINGUEZ-MALDONADO, J., HERNÁNDEZ-ZARATE, G., ALZATEGAVIRIA, L. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management Research**, v.29, p.1235-1250, 2011.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A.T.; SURRALES, J. CROFT, J.; PARRY, J.; NORPPA, H. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in human cells. **Mutagenesis**, v.26, p.125–132, 2011.

FERREIRA, L.F.R.; AGUIAR, M.M.; MESSIAS, T.G.; POMPEU, G.B.; QUEIJEIRO LOPEZ, A.M.; SILVA, D.P.; MONTEIRO, R.T Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.44, p.132-137, 2011.

FONTANETTI, C.S.; SOUZA, T. S.; CHRISTOFOLETTI, C. A. . The role of biomonitoring in the quality assessment of water resources. **In:** Bilibio, C.; Hensel, O.; Selbach, J. (Org.). Sustainable water management in the tropics and subtropics - and cases study in Brazil. 1ªed.Brasil/Alemanha: UNIPAMPA/UNIKASSEL, 2012, v. 3, p. 975-1005.

FUESS, L.T.; GARCIA, M.L. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. **Journal of Environmental Management**, v.145, p.210-229, 2014.

GRISOLIA, C. K. Agrotóxicos Mutações, Câncer e Reprodução. **Editora da UNB**. Brasília, p.392, 2005.

JUNIOR, C.C.; MARQUES, M.O.; JÚNIOR, L.C.T. Efeito residual de quatro aplicações anuais de lodo de esgoto e vinhaça na qualidade tecnológica da cana de açúcar. **Engenharia Agrícola**, v.28, n.1, p.196-203, 2008.

KIRSCH-VOLDERS, M.; PLAS, G.; ELHAJOUJI, A.; LUKAMOWICZ, M.; GONZALEZ, L.; LOOCK, K.V.; DECORDER, I. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 85, p.873–899, 2011.

KUMAR, S.; GOPAL, K. Impact of Distillery Effluent on Physiological Consequences in the Freshwater Teleost *Channa punctatus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.66, p.617-622, 2001.

MANE, J.D.; MODI, S.; NAGAWADE, S.; PHADNIS, S.P.; BHANDARI, V.M.. Treatment of spent wash using chemically modified bagasse and colour removal studies. **Bioresource Technology**, v.97, p. 1752–1755, 2006.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics Molecular Biology**, v.29, n.1, p.148-158, 2006.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura**, v.30, p.665-676, 1978.

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

PALHARES D., GRISOLIA, C.K. Comparasion between the micronucleus frequencys of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment, **Genetic and Molecular Biology**, v.25, p.281-284, 2002.

PEDROSA, E.M.R.; ROLIM, M.M.; ALBUQUERQUE, P.H.S.; CUNHA, A.C. Supressividade de nematóides em cana-de-açúcar por adição de vinhaça ao solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.9, p.197-201, 2005.

QUEIROZ FERREIRA, A.D. O impacto do crômio nos sistemas biológicos. **Química Nova**, v.4, p. 572-578, 2002.

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

RIGONATO, J.; MANTOVANI, M.S.; JORDÃO, B.Q. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, p.464-468, 2005.

SILVA, M.A.S.; GRIEBELER, N.P.; BORGES, L.C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.11, n.11, p.108-114, 2007.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, n.1, p.184-191, 1988.

SOUZA V.H.E.; SOARES, C.H.L.; CANTAGALLI, L.B.; VICENTINI, V.E.P. **Utilização de testes citogenéticos para avaliação de mutagênese ambiental**. 2005.

Disponível em:

<<http://www.pec.uem.br/dcu/Trabalhos/6laudas/SOUZA,%20Vitor%20Hugo%20Enumo%20de.pdf>>. Acesso em: 14/05/2015.

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**, v. 605, p. 87-93, 2006.

SPEIT, G.; HARTMANM, A. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). **Mutagenesis**, v. 10, p. 555-560, 1995.

UNICA, 2007. Produção e uso do Etanol combustível no Brasil. Respostas às questões mais frequentes Disponível em: <<http://www.portalunica.com.br/portalunica/index.php?Secao=referencia&SubSecao=estatisticas&SubSacao=producao20Brasil&id=%20and%id=9>>. Acesso em: 10/10/14.

UNICA, 2014. Acompanhamento de safra Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/>>. Acesso em: 16/05/15.

WILKIE, A., RIEDESEL, K., OWENS, J. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, v.19, p.63–102. 2000.

Tabela 1. Análises físico-químicas da vinhaça de cana-de-açúcar das safras de 2010, 2011 e 2013.

Parâmetro	Safra 2010	Safra 2011	Safra 2013				
	Vinhaça bruta	Vinhaça bruta	Vinhaça bruta	Vinhaça 1%	Vinhaça 2,5%	Vinhaça 5%	Vinhaça 10%
pH inicial	3,90	4,37	4,60	7,32	7,22	7,23	7,32
pH final	-	-	-	9,20	8,40	8,90	7,60
Cálcio (mg/L)	719	671	828 (25%)	27,87	62,33	95,20	96,80 (5%)
Condutividade Elétrica (µs/cm)	13530	15110	8294	446	685	1110	1022
DBO (mg/L)	5046	7941	13394,30	<LQ	22,10	26,40	47,10
DQO (mg/L)	13380	25225	31723,20	<LQ	144,50 (2%)	246,50	325,90
Dureza (mg CaCO ₃ /L)	2493	276	3390,40	107,80	257,70	384,90	400,70
Fosfato total (mg/L)	1,30	-	5,51 (20%)	0,673 (2%)	0,40 (5%)	3,93 (10%)	1,46 (10%)
Magnésio (mg/L)	237	264	321,25 (25%)	9,27	24,78	35,75	38,62
Potássio (mg/L)	2056	3401	3276 (100%)	38,06	91,36	264,40 (5%)	224,95 (5%)
Sódio (mg/L)	50,20	114	13,57	36,50	8,58	15,10	9,02
Sulfato (mg/L)	710	2993	340,27 (20%)	32,76 (2%)	70,58 (5%)	174,64 (10%)	123,319 (10%)
Alumínio	-	-	0,47	<LQ	0,08	<LQ	0,15
Bário	0,41	<LQ	0,21	0,07	0,06	0,05	0,069
Boro	-	-	<LQ	0,369	<LQ	<LQ	<LQ
Chumbo	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cobalto	-	-	0,014	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cobre	0,35	0,76	0,15	<LQ	0,009	<LQ	<LQ
Cromo	0,04	3,56	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Ferro	-	-	8,53	0,077	0,228	0,412	0,495
Manganês	-	-	3,11 (25%)	<LQ	0,026	0,131	0,147
Mercúrio	0,0019	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Molibdênio	0,008	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Níquel	0,03	<LQ	0,029	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Nitrogênio Amoniacal	-	-	10,92	3,12	4,12	9,57	7,47
Nitrogênio Kjeldahl	267	171	234,10	4,80	10,60	14,30	12,60
Zinco	1,66	<LQ	0,625	0,02	0,022	0,038	0,032

LQ: Limite de quantificação; valores entre parênteses: amostra diluída para quantificação.

Tabela 2. Média e desvio padrão de eritrócitos micronucleados e com anormalidades nucleares de peixes expostos à diluições de vinhaça de cana-de-açúcar *in natura* (safra 2010 e 2011) e de vinhaça tratada.

Tratamento	Vinhaça (2010)		Vinhaça (2011)		Vinhaça tratada (2013)	
	MN	Anormalidades	MN	Anormalidades	MN	Anormalidades
CN	0,40±0,54	161,60±27,30	0	31,40±8,61	0,40±0,51	76,70±39,74
CP	7,00±2,91*	210,40±47,76	3,60±1,14 *	72,40±33,47	3,30±2,00*	111,70±33,49
V1%	11,40±3,91*	185,40±75,36	2,20±1,64	77,80±49,60*	0,60±0,96	104,00±56,29
V 2,5%	-	-	4,20±1,48 *	93,60±47,61*	1,40±1,57	104,00±65,23
V 5%	-	-	5,40±0,54*	149,80±38,98*	1,10±1,1	112,40±87,98
V10%	-	-	-	-	0,28±0,75	56,98±43,84

CN: Controle negativo; CP: Controle positivo; V1%: Concentração de 1% de vinhaça; V2,5%: Concentração de 2,5% de vinhaça; V5%: Concentração de 5% de vinhaça; *valores estatisticamente significativos, pelo método de Kruskal-Wallis, com $p < 0,05$, em relação ao controle negativo.

Tabela 3. Média e desvio padrão de nucleóides com cometa e escore de danos em *O. niloticus* expostos às diferentes diluições de vinhaça de cana-de-açúcar *in natura* por 96 horas.

Tratamentos	Vinhaça (2010)					Vinhaça (2011)				
	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Escore	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Escore
CN	14,80±7,46	26,00±8,51	34,80±6,90	25,80±13,21	173,00±28,87	35,60±9,44	31,80±8,31	17,40±7,43	17,20±4,32	113,20±17,76
CP	2,60±2,07*	10,20±5,06*	31,40±14,70	57,80±20,09*	246,40±27,21*	10,80±1,92*	14,60±3,97*	27,60±7,12	50,20±9,95*	220,40±13,46*
V1%	7,40±4,87	24,20±4,65	39,60±3,57	30,20±6,05	194,00±18,66	25,40±8,82	21,00±5,33	26,60±2,96	28,60±12,75	155,00±31,93
V 2,5%	-	-	-	-	-	23,20±8,10	17,20±4,60*	27,00±5,09	37,60±10,01	184,00±18,46*
V 5%	-	-	-	-	-	13,20±7,85*	14,00±1,22*	23,60±1,51	51,20±7,25*	214,80±21,79*
V10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CN: Controle negativo; CP: Controle positivo; V1%: Concentração de 1% de vinhaça; V2,5%: Concentração de 2,5% de vinhaça; V5%: Concentração de 5% de vinhaça;

*valores estatisticamente significativos, pelo método de Kruskal-Wallis, com $p < 0,05$, em relação ao controle negativo.

Tabela 4: Média e desvio padrão de nucleóides com cometa e escore de danos em *O. niloticus* expostos às diferentes diluições de vinhaça tratada, por 96 horas.

Tratamento	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Escore
CN	24,4±9,63	35,2±3,11	23,4±8,82	21,2±7,52	145,6±34,63
CP	7,66±2,64*	13,55±4,06*	29,44±9,83	55±15,65*	237,44±24,20*
V1%	13,33±7,08	23,88±9,70	34±7,48	34,66±12,27	195,88±28,65
V 2,5%	11,9±6,38*	22,5±7,09*	32,8±7,26	42±8,23*	212,8±25,08*
V5%	7,88±3,01*	19,44±6,12*	33,33±6,24	44,22±10,67*	218,77±24,41*
V10%	12±4,28	16,71±3,4*	29,28±2,21	48,57±6,42*	221±19,26*

CN: Controle negativo; CP: Controle positivo; V1%: Concentração de 1% de vinhaça; V2,5%: Concentração de 2,5% de vinhaça; V5%: Concentração de 5% de vinhaça;

*valores estatisticamente significativos, pelo método de Kruskal-Wallis, com $p < 0,05$, em relação ao controle negativo.

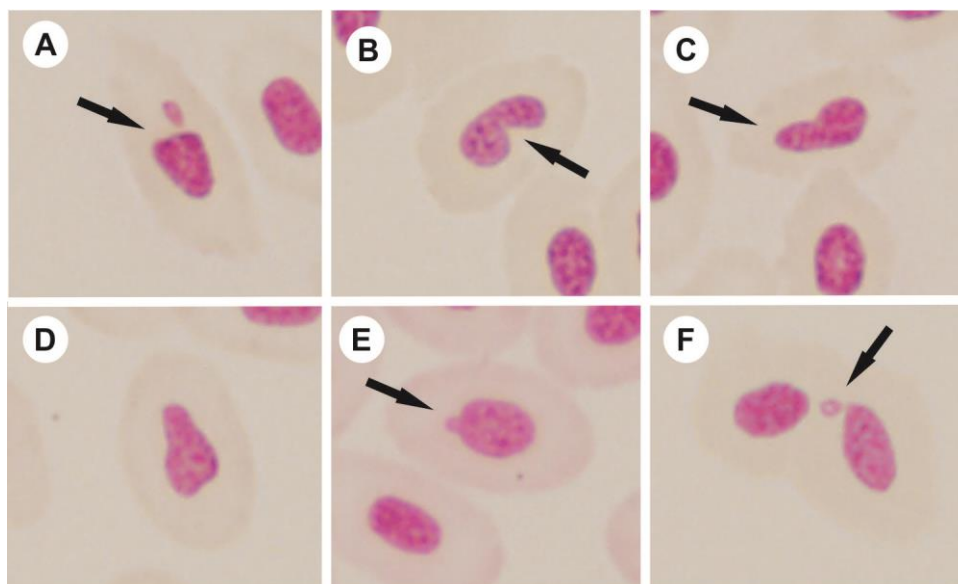


Figura 1: Eritrócitos de *O. niloticus*, expostos à vinhaça tratada com cal. **A.** Eritrócito com micronúcleo (seta); **B.** Eritrócito com alteração “notched” (seta); **C.** Eritrócito com alteração “blebbed”; **D.** Eritrócito com alteração “lobed” (seta); **E.** Eritrócito com alteração “broto” (seta); **F.** Eritrócito com alteração “broken-egg” (seta).

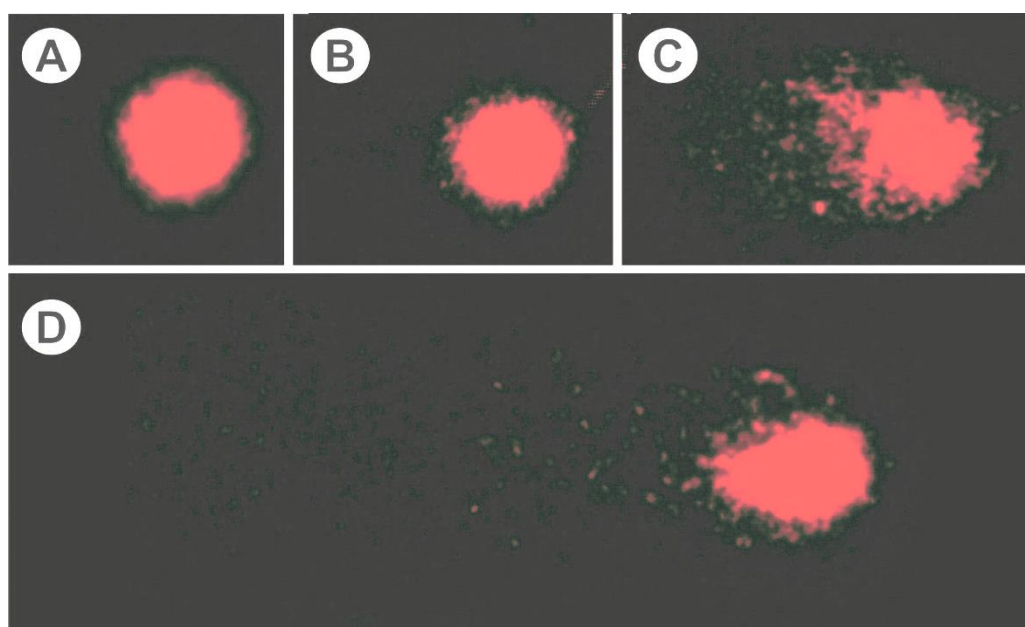


Figura 2: Classes de migração de cometas em nucleóides de *O. niloticus* expostos à vinhaça. **A.** Nucleóide de classe 0 (sem dano aparente); **B.** Nucleóide de classe 1 (pouco dano); **C.** Nucleóide de classe 2 (médio dano); **D.** Nucleóide de classe 3 (máximo dano)

5.2. Artigo 2

Toxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar a partir da correção de seu pH com Cal (CaO): Histopatologia de brânquias de *Oreochromis niloticus* (Perciformes: Cichlidae)

Jorge E. Correia¹, Cintya Ap. Christofolletti², Ana Claudia Marcato, Carmem S. Fontanetti ^{1*}

¹ UNESP (Universidade Estadual Paulista), Av. 24-A, 1515. Bela Vista. Rio Claro, SP, Brasil.

² Centro Universitário Hermínio Ometto (FHO- UNIARARAS), Av. Dr. João Maximiliano Baruto, 500. Jd. Universitário. Araras, SP, Brasil.

*Corresponding author: Tel.: +55 19 35264139; fax: +55 19 35264136.

E-mail: fontanet@rc.unesp.br

Resumo

A busca por combustíveis alternativos aos combustíveis fósseis, formas de energia mais “verdes” é uma preocupação da sociedade atual. Nesse cenário, o etanol ganha cada vez mais espaço no mercado mundial. O Brasil e os Estados Unidos são os maiores produtores mundiais de etanol, proveniente da cana-de-açúcar e do milho, respectivamente, possuindo grande importância em suas economias. Entretanto, a indústria sulcroatcooleira ganha destaque também em questões ambientais, uma vez que o principal resíduo gerado na destilação é a vinhaça. Devido ao seu elevado conteúdo orgânico e elevadas quantidades de potássio, a vinhaça é utilizada na forma de fertilizante. Em virtude das elevadas quantidades de vinhaça lançada na agricultura, esse resíduo pode saturar o solo, podendo atingir recursos hídricos por lixiviação/percolação. Tendo em vista seu potencial poluidor e sua alta toxicidade em meio aquático, esse estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar por meio da histopatologia de brânquias de tilápias (*Oreochromis niloticus*) após tratamento físico-químico para correção de pH através de adição de cal (CaO), produto barato e comumente utilizado em campo para correção de pH no solo. Os peixes foram expostos, em réplica, por 96 horas à vinhaça tratada nas diluições de 1, 2,5, 5 e 10%. Após exposição, três peixes da diluição de 10% morreram. Foi observado aumento nas células clorídricas, principalmente na diluição de 5%, possivelmente em resposta a presença de zinco na amostra de vinhaça. Foram observadas diversas alterações histológicas. O desprendimento epitelial, desorganização do epitélio e hemorragia foram estatisticamente significativas nos indivíduos da diluição 5% e com exceção da desorganização, também na diluição de 10%. Não houve diferenças significativas no número de células mucosas para nenhuma diluição. Comparando os efeitos da vinhaça não tratada avaliada em estudos prévios, os resultados aqui observados sinalizam uma diminuição da toxicidade da vinhaça após tratamento físico-químico para correção de pH. Porém é importante salientar que o uso de cal no solo merece cautela, uma vez que a alta carga orgânica da vinhaça associada a esse composto pode provocar a salinização no solo.

Palavras-chave: Tratamento físico-químico, tilápias, desprendimento epitelial, agrosresíduo.

1. Introdução

Os Estados Unidos e o Brasil são os maiores produtores de etanol do mundo, proveniente das culturas de milho e cana-de-açúcar, respectivamente. O etanol é produzido a partir da destilação do mosto produzido pela fermentação da sua matriz orgânica, por exemplo a cana-de-açúcar (CHRISTOFOLLETTI et al., 2013). A destilação para a produção do etanol gera resíduos, o principal deles é a vinhaça (ESPANÑA-GAMBOA et al., 2011; CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

A vinhaça possui pH ácido, variando de 3,5 a 5 e coloração castanho-escuro, riqueza em matéria orgânica (COD: 50-150 gL⁻¹), elevada corrosividade e altos índices de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), além de elevada temperatura na saída dos destiladores (ESPANÑA-GAMBOA et al., 2011; CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Por ser gerado em elevadas quantidades, cerca de 10 a 15 litros de vinhaça por litro de etanol produzido, e pelo seu potencial poluidor, a destinação desse resíduo tem que ser feita com cautela.

Yesilada (1999) observou diminuição da taxa de fecundidade dos ovos, fertilidade das fêmeas e longevidade de machos de drosófilas (*Drosophila melanogaster*) expostas a vinhaça. Souza et al. (2013), observaram que ao ser adicionada em amostra de solo de *landfarming*, a vinhaça promoveu a potencialização dos efeitos clastogênicos dessa amostra em ensaios com *Allium cepa* (cebola) provavelmente por uma liberação dos metais traço adsorvidos na matéria orgânica.

Kumar e Gopal (2001) avaliaram a toxicidade da vinhaça em peixes da espécie *Channa punctatus* em diferentes concentrações; observaram grande produção de muco, redução nas proteínas e alta concentração de ácido lático em diferentes órgãos, como cérebro, fígado, rins e músculos.

Dimensionar os efeitos tóxicos da vinhaça no meio aquático é de grande importância. Nesse contexto, o emprego da análise histopatológica em brânquias de peixes constitui excelente biomarcador para avaliação do meio aquático (MALLAT, 1985; EVANS, 1987). Correia et al. (artigo anexo) observaram alterações significativas em brânquias de tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas a diluições de vinhaça de cana-de-açúcar, como desprendimento epitelial, desorganização do epitélio e hemorragia. Marinho et al. (2014) observaram alterações histopatológicas significativas em fígados de indivíduos da mesma espécie também expostas a vinhaça de cana-de-açúcar.

A composição da vinhaça varia de acordo com a destilaria que a gera, com o processo de destilação empregado e até mesmo difere entre as safras

(CHRISTOFOLLETTI et al., 2009), fatores que dificultam o tratamento desse resíduo. Entretanto, alguns possíveis tratamentos são sugeridos pela literatura com o intuito de reduzir a toxicidade da vinhaça ou reutilizá-la (MANE et al., 2006; MOHANA et al., 2009). Esses tratamentos podem ser por processos físico-químicos ou biológicos.

Santana et al. (2008), testaram a degradação fotolítica da vinhaça por radiação solar por meio de catalisadores a base de titânio. Os autores observaram que o tratamento não foi eficaz na mineralização da vinhaça, porém conseguiu reduzir a mortalidade do microcrustáceo *Artemia salina* reduzindo assim, a toxicidade da vinhaça.

Botelho et al. (2012) avaliaram a toxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar nos microcrustáceos *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia magna* e no peixe *Danio rerio*, antes e depois de ajuste de pH. Os autores observaram uma diminuição na mortalidade desses organismos após o aumento do pH.

Tendo em vista o potencial poluidor da vinhaça e seus efeitos tóxicos, propor tratamentos que mitiguem seus efeitos tóxicos ao meio ambiente são de extrema importância, uma vez que seu principal uso é como fertilizante. Portanto, esse trabalho objetivou avaliar o potencial tóxico da vinhaça após a correção de seu pH para um valor neutro (7,0) pela adição de cal (CaO), por meio de análise histopatológica de brânquias de tilápias (*O. niloticus*), uma vez que esse órgão é o primeiro a entrar em contato com possíveis poluentes. Ademais, as brânquias possuem alta sensibilidade devido a sua grande área de contato com o meio aquático, por sua função respiratória (PANDEY et al., 2008).

2. Materiais e Métodos

2.1. Material Biológico

Foram utilizados como organismos teste, peixes da espécie *O. niloticus* (Perciformes, Cichlidae), popularmente conhecido como tilápia do Nilo. Foram utilizados indivíduos com tamanho médio de 10 cm, para evitar diferenças intra-específicas relacionadas ao tamanho e idade dos peixes. Os espécimes, oriundos de piscicultura, foram aclimatados em tanque.

Antes do início dos experimentos, o presente trabalho foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil, protocolo nº 003518-2/2 em 24 de maio de 2013.

2.2. Vinhaça de cana-de-açúcar

Para a montagem do bioensaio foi utilizada a vinhaça de cana-de-açúcar obtida junto à uma indústria sucroalcooleira, localizada no município de Araras (22°21'25"S, 47°23'03"W), São Paulo, Brazil. A amostra de vinhaça foi trazida ao Instituto de Biociências, UNESP, campus de Rio Claro mantida em geladeira a 4°C até ser utilizada.

2.3. Tratamento da vinhaça

O pH da vinhaça foi ajustado para 7 por meio da adição de cal (CaO), produto comumente utilizado no campo para acerto de pH no solo; após a correção do pH, tais amostras foram misturadas diretamente nos aquários em diluições de 1, 2,5, 5 e 10%.

2.4. Bioensaio com *O. niloticus*

O bioensaio foi montado em réplica em aquários com capacidade de 40 litros. Em cada aquário, foram dispostos cinco peixes já aclimatados, no qual permaneceram 96 horas, em temperatura ambiente de aproximadamente 24°C, com sistemas de filtragem e aeração. O controle negativo recebeu água de poço artesiano e nos outros tratamentos foram adicionados diluições crescentes de vinhaça, de 1, 2,5, 5 e 10%, tendo como base estudo anterior, o qual utilizou as mesmas diluições de vinhaça bruta para analisar seu efeito sobre tilápias (CORREIA et al., artigo no Anexo).

2.5. Dissecção dos animais

Decorrido o tempo de exposição de 96 horas, os espécimes de *O. niloticus* foram retirados dos aquários, anestesiados, dissecados em solução fisiológica e eutanasiados com espinhalamento por tesoura cirúrgica. Após a retirada do segundo arco branquial, este foi fixado em solução Bouin e paraformaldeído, de acordo com a técnica de coloração a ser empregada, permanecendo no fixador por pelo menos 2 horas.

2.6. Análise físico-química da vinhaça *in natura* e diluições de vinhaça tratada

Foram realizadas análises físico-químicas e de metais das amostras de vinhaça *in natura* e das águas dos aquários com as diluições de vinhaça tratada após realização dos bioensaios. Os parâmetros foram: pH, dureza, condutividade elétrica, nitrogênio amoniacal, nitrogênio Kjeldhal, sódio, cálcio, potássio, magnésio, sulfato, fosfato total, DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e DQO (Demanda Química de Oxigênio), Os

metais analisados foram: alumínio, bário, boro, chumbo, cobalto, cobre, cromo, ferro, manganês, molibdênio, níquel e zinco.

2.7. Ultramorfolgia – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O segundo arco branquial dos espécimes expostos foi retirado e fixado em fixador Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), mantido em geladeira. Este material foi então desidratado em uma série de concentrações crescentes de acetona, levado ao ponto crítico e colado em suporte metálico. As análises foram feitas ao microscópio eletrônico de varredura de baixo vácuo HITACHI TM3000.

2.8. Histologia

O segundo arco branquial dos espécimes expostos foi retirado e fixado em solução Bouin (15 ml de solução aquosa saturada de ácido pícrico, 5 ml de formaldeído e 1 ml ácido acético), durante aproximadamente 24 horas; em seguida, o material foi mergulhado em tampão fosfato de sódio pH=7,4 e mantido em geladeira.

O material foi desidratado em soluções de etanol 70, 80, 90, 95% durante 30 minutos cada banho. Posteriormente, o material foi transferido para uma solução de resina de embebição Leica, por 24 horas em geladeira. O material foi então colocado em moldes preenchidos com resina contendo catalisador. Após o endurecimento da resina, o material foi seccionado com auxílio do micrótomo Leica RM2245; as secções foram hidratadas e recolhidas em lâminas. Depois de secas, as lâminas foram mergulhadas em hematoxilina de Harris por 6 minutos, depois foram colocadas em água, por 4 minutos, para que a reação ocorresse. Logo em seguida, as lâminas foram mergulhadas em eosina aquosa por 5 minutos, lavadas com água corrente, secas e montadas com Entellan.

Foram analisadas duas lâminas com oito cortes de 6 μ m para cada peixe, sendo n=5 para cada um dos bioensaios. Assim, foram analisados um total de 120 lâminas e 960 cortes histológicos.

A descrição e a avaliação das alterações histopatológicas tiveram como base o protocolo padronizado de Bernet et al. (1999) e adaptado por Marinho et al. (2014). Neste protocolo, um fator de importância (*w*) foi definido para cada lesão, de acordo com sua importância patológica: (1) Importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível quando a exposição ao irritante termina; (2) Importância patológica moderada, a lesão é reversível na maioria dos casos, quando o estressor é neutralizado; e (3) Importância patológica acentuada, a lesão é geralmente irreversível, levando à perda

parcial ou total da função do órgão. As anomalias histopatológicas descritas também foram classificadas em escores (*a*) que variaram de 0 a 6, dependendo do grau e da extensão da alteração, valores intermediários também foram considerados. Ao multiplicar o fator de importância pelo escore, obtêm-se o índice da alteração. Para o cálculo do índice total de cada indivíduo, foi utilizado o seguinte cálculo: $\text{Índice}_{\text{ind}} = \sum (\text{fator de importância} \times \text{escore})$. Os resultados encontrados no controle e nos tratamentos foram comparados entre si.

2.9. Histoquímica – Polissacarídeos neutros – Técnica Ácido Periódico-Schiff (PAS) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

Para observação de células mucosas, os cortes do material foram oxidados por 10 minutos em solução de ácido periódico 0,4% e colocados no reativo de Schiff por aproximadamente 1 hora no escuro; foram deixados então em água sulfurosa por 3 minutos e lavados em água corrente, por 30 minutos.

As células mucosas foram avaliadas segundo Biagini et al. (2009); três cortes histológicos, com três lamelas principais íntegras, de cada indivíduo, foram selecionados para a contagem de células mucosas. Dessas lamelas principais foram contadas as células mucosas de 30 regiões interlamelares de todos os indivíduos de todos os tratamentos.

2.10. Análise estatística

Os dados gerados a partir da análise das lâminas para todas as técnicas utilizadas nesse estudo tiveram sua normalidade testada pelo método de Shapiro-Wilk. Com base no valor de significância deste teste, foi realizado o teste estatístico paramétrico ($p > 0,05$) ANOVA com teste pos-hoc de Tukey, ou o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, ambos com valor de significância com $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Análises físico-químicas da vinhaça *in natura* e diluições de vinhaça tratada

O pH das diluições após a introdução dos peixes nos aquários não permaneceu estável; com o fim da exposição, com exceção da diluição de 10%, o pH estava alcalino, 9,2 na vinhaça 1%, 8,4 na vinhaça 2,5% e 8,9 na vinhaça 5%. A vinhaça apresentou altos índices de potássio e sulfato, características desse resíduo. A DBO e a DQO da vinhaça reduziram consideravelmente nas diluições de vinhaça tratada (Tabela 1).

A análise detectou a presença de alumínio, bário, cobalto, cobre, ferro, manganês, níquel e zinco na amostra de vinhaça bruta, a maioria desses metais continuou presentes após as diluições (Tabela 1).

3.2. Mortalidade dos peixes

Após a exposição por 96 horas à vinhaça tratada três peixes da diluição de 10% morreram. Ao longo do tempo de coleta mais dois peixes dessa diluição morreram antes de serem dissecados.

3.3. Ultramorfologia

O epitélio branquial é composto em sua maioria por células pavimentosas. Essas células possuem expansões da sua membrana plasmática, as cristas, que ajudam na retenção de muco. No grupo controle foi observado que as células em sua maioria apresentavam cristas de forma íntegra (Figura 1A); poucas células apresentaram pequenas regiões sem cristas obtendo um índice de alteração abaixo do moderado. Nos grupos expostos a vinhaça tratada não foi observada diferença significativa; todos os grupos obtiveram índice de alteração abaixo do moderado (Tabela 2).

No grupo controle foram observadas células clorídricas do tipo α e β (segundo descrição de PERRY, 1999) (Figura 1C), com grande predominância do tipo β . O número de células clorídricas aumentou nos animais dos grupos expostos, principalmente na diluição de 5% (Figura 1D), entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) quando comparados grupo controle e grupos tratamentos (Tabela 3).

3.4. Análise histológica

O controle apresentou morfologia branquial com poucas alterações, todas apresentando índice de alteração abaixo de 2 (pouca ou rara ocorrência). As alterações observadas nos grupos expostos foram o desprendimento epitelial (Figura 2B), desorganização do epitélio respiratório (Figura 2C), hemorragia (Figura 2D), edema (Figura 2E) e aneurisma (Figura 2F). As análises histológicas revelaram diferenças significativas pelo teste estatístico Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) para o desprendimento epitelial, desorganização lamelar e hemorragia na diluição de 5%. Na diluição de 10% o desprendimento epitelial e hemorragia também foram significativos. Entretanto, os índices de alteração se mantiveram abaixo do moderado (Tabela 2).

3.5. Análise histoquímica

Por meio da análise das células mucosas evidenciadas pelo PAS (Figura 3) pode-se verificar que não houve diferenças significativas entre os tratamentos e o controle (Tabela 3). Nesse caso, o teste estatístico empregado foi o ANOVA com $p < 0,05$.

4. Discussão

As brânquias possuem um papel vital na fisiologia dos peixes, além de serem o principal sítio de trocas gasosas; também possuem funções de osmoregulação, equilíbrio ácido-básico e excreção de compostos nitrogenados (MACHADO, 1999). As brânquias são o primeiro órgão de contato com possíveis poluentes e possuem grande sensibilidade dada pela grande área de contato com o meio aquático, devido sua função respiratória (PANDEY et al., 2008).

Dado o grande volume produzido, o uso da vinhaça na fertirrigação é a principal alternativa para o descarte desse resíduo da cana-de-açúcar, porém as grandes quantidades dispostas em campo podem sofrer lixiviação ou percolar nos perfis de solo e acabar contaminando os recursos hídricos. Devido seu alto potencial poluidor, propor tratamentos prévios a disposição na agricultura é de grande importância. O presente estudo objetivou analisar as possíveis alterações histopatológicas nas brânquias de tilápias expostas a diferentes diluições de vinhaça de cana-de-açúcar tratada previamente com cal (CaO) para a correção de seu pH.

Após exposição aguda por 96 horas, três peixes morreram na diluição de 10% num total de dez indivíduos, uma vez que o bioensaio foi realizado em réplica. Entre o período de exposição e coleta, mais dois peixes da mesma concentração morreram, impossibilitando a preservação do tecido branquial para fixação. Correia et al. (artigo no Anexo) observaram mortalidade maior para as mesmas diluições de vinhaça de cana-de-açúcar *in natura*; todos os peixes da maior diluição morreram em menos de 48 horas de exposição nos dois bioensaios realizados e 60% da diluição de 5% também morreram em um dos bioensaios. Tendo isso em vista, o tratamento da vinhaça pela correção de seu pH se mostrou efetivo na redução da mortalidade das tilápias. A influência do pH em um ecossistema pode se dar tanto de modo direto, com efeitos sobre a fisiologia das espécies, como de modo indireto, podendo em determinadas condições contribuir para a precipitação de elementos químicos tóxicos, como metais traço (CETESB, 2013).

A análise físico-química da vinhaça de cana-de-açúcar indicou a presença de metais traço na amostra bruta como por exemplo alumínio, bário, cobalto, cobre,

manganês, níquel e zinco, alguns permanecendo detectáveis até mesmo nas amostras da água dos aquários nas diluições. Se os agentes poluentes encontrarem-se dissolvidos na água, por exemplo os metais traço, estes podem entrar em contato com os filamentos branquiais e com as lamelas respiratórias e poderão alterar a morfologia normal das brânquias (MACHADO, 1999).

Laurent e Perry (1991) consideraram as alterações morfológicas das brânquias ocorridas durante mudanças ambientais como tentativas adaptativas de se conservar algumas funções fisiológicas, tais como respiração e equilíbrio osmótico. As cristas das células pavimentosas são importantes na retenção de muco no epitélio branquial, como uma forma de proteção (MALLAT, 1985). No presente estudo não houve diminuição significativa das cristas das células pavimentosas; em todos os tratamentos esse parâmetro manteve um índice de alteração abaixo de 4 que indicaria uma extensão moderada dessa alteração na brânquia. Em tilápias expostas às mesmas diluições de vinhaça não tratada, as perdas das cristas constituiu uma alteração importante, com índices de alteração elevados para todas as diluições testadas (CORREIA et al., artigo no Anexo).

As células clorídricas possuem principalmente a função de regulação de íons nas brânquias dos peixes. Em peixes de água doce, como a tilápia, há uma tendência osmoregulatória de se perder íons para o meio aquático; as células clorídricas, nesses peixes possuem então, a função de realizar a captura de íons cálcio, sódio e cloreto por transporte ativo (PERRY, 1997). A adição de cal a vinhaça pode ter favorecido a proliferação desse tipo celular na brânquia. Embora esses valores não tenham sido significativos em relação ao controle, a contabilização dessas células foi maior em relação aos estudos de Correia et al. (artigo no Anexo) com a vinhaça *in natura*.

Laurent e Perry (1991) relataram como variações na concentração de O_2 , $NaCl$ e Ca^{+2} atingem a lamela respiratória dos peixes, a superfície apical das células de cloreto e as populações das células de cloreto e das células secretoras de muco. Sobre os efeitos de poluentes, os autores descrevem que alguns metais pesados, como o zinco, estimulam a proliferação de células de cloreto, pois aceleram a perda de íons pelo epitélio e dificultam sua absorção. O nitrito compete com o cloro pelos sítios de troca Cl^-/HCO_3^- , e a proliferação das células de cloreto seria um ajuste compensatório para manter a concentração interna de Cl^- em valor constante. As análises físico-químicas da vinhaça tratada com cal e das águas dos aquários nas diluições indicaram a presença de zinco; esse metal foi encontrado em maior concentração na diluição de 5%, a mesma diluição que obteve a maior quantidade de células clorídricas.

O tecido branquial por ser o órgão de contato direto com o meio externo possui mecanismos de proteção que ajudam a barrar a entrada de possíveis toxicantes na corrente sanguínea (CERQUEIRA; FERNANDES, 2002). Esses mecanismos de proteção são respostas celulares que podem ser de defesa ou compensatórios (MALLAT, 1985; TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). Em contrapartida da defesa do organismo, essas respostas alteram a fisiologia do órgão, podendo prejudicar sua função (MACHADO, 1999).

O desprendimento epitelial foi uma das principais alterações encontradas nesse estudo, sendo estatisticamente significativa nas diluições de 5 e 10%, embora seu índice de alteração seja baixo. Focos com edema e hiperplasia também foram encontrados em algumas brânquias analisadas. São mecanismos típicos de defesa das brânquias que promovem o aumento da barreira água-sangue; esta perda da superfície respiratória pode resultar em morte por anóxia (RAND; PETROCELLI, 1985). Nowak (1992) usou a distância de difusão respiratória para quantificar os efeitos do inseticida organoclorado Endosulfan sobre as brânquias de bagres. Foram observados edema, descolamento do epitélio respiratório e hiperplasia do epitélio branquial. Tais alterações resultaram em um significativo aumento da distância de difusão respiratória, afetando as trocas gasosas.

Nas tilápias expostas a vinhaça tratada houve desorganização do epitélio respiratório, a qual pode levar à focos hemorrágicos. A desorganização e hemorragia foram significativas na diluição de 5 %, sendo a última alteração significativa também na diluição de 10%. Aparentemente, as células pavimentosas perdem aderência uma com as outras, resultando numa ruptura do tecido, causando a hemorragia, fazendo com que o órgão atingido perca a sua funcionalidade.

Correia et al. (artigo no Anexo) em tilápias expostas as mesmas diluições observaram índice de alterações maiores para desorganização do epitélio quando comparado com o índice de alterações em indivíduos expostos a vinhaça tratada com cal. O índice de alterações para focos hemorrágicos foi similar.

Outra resposta de proteção da brânquia é a produção de muco pelas células mucosas (BERNET et al., 1999; DAVID et al., 2009). O muco é normalmente encontrado nos filamentos, mas pode ser encontrado no epitélio respiratório de peixes expostos a condições de estresse, o que pode sugerir que a camada formada pela produção de muco protege as superfícies lamelares contra os agentes tóxicos, infecciosos e partículas em suspensão (MALLAT, 1985). Não houve nesse estudo diferenças significativas entre número contabilizado de células mucosas no controle e nos tratamentos. Correia et al.

(artigo no Anexo) observou um aumento significativo dessas células para todas as diluições de vinhaça *in natura* com exceção da diluição de 5% em um dos bioensaio.

Tendo em vista que vinhaça de cana-de-açúcar é gerada em uma proporção de 10 a 15 vezes maior do que a de etanol e que só na última safra (2014/2015) o Brasil produziu cerca de 27,54 bilhões de litros de etanol, propor tratamentos que mitiguem seus efeitos tóxicos tanto no ambiente terrestre quanto o aquático são de extrema importância, uma vez que esse resíduo é utilizado indiscriminadamente como fertilizante, e pode atingir o meio aquático por percolação/lixiviação.

5. Conclusão

Os resultados desse estudo comprovam a eficácia do tratamento da vinhaça a partir da correção de seu pH para um valor neutro (7,0), uma vez que os índices de alterações permaneceram baixos e menores em relação aos índices obtidos em estudos com a vinhaça *in natura* nas mesmas diluições testadas. A cal é um produto barato e já é utilizada na agricultura para correção de pH no solo. Porém, a vinhaça possui grandes quantidades de potássio, sulfato e sódio, que em adição com cal pode contribuir para uma salinização do solo. Portanto, mais estudos que promovam a redução da toxicidade desse resíduo são necessários.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) processos 2013/13228-0 e 2012/50197-2 pelo suporte financeiro, a Gerson Mello Souza, Antonio Teruyoshi Yabuki e Monika Iamonte pelo apoio técnico e aos pesquisadores Yadira Ansoar Rodríguez, Thays Guedes e Nilton Riguetto Neto pela ajuda na montagem dos bioensaios.

7. Referências Bibliográficas

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of fish diseases**, v.22, p.25-34, 1999.

BIAGINI, F.R.; DAVID, J.A.O.; FONTANETTI, C.S. The use of histological, histochemical and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted waters. **Micron**, v.40, p.839-844, 2009.

BOTELHO, R.G.; TORNISIELO, V.L.; de OLINDA, R.A.; MARANHO, L.A.; MACHADO-NETO, L. Acute toxicity of sugarcane vinasse to aquatic organisms before and after pH adjustment. **Toxicological and Environmental Chemistry**, p. 1-11, 2012.

CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 52, n. 2, p. 83-91, 2002.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Variáveis de qualidade das águas. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp#cobre>. Acessado em: 20/01/2013.

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

CORREIA, J.E.; CHRISTOFOLETTI, C.A.; MARCATO, A.C.C.; MARINHO, J.F.U.; FONTANETTI, C.S. Análise histopatológica de brânquias de tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostos à vinhaça da cana-de-açúcar (Artigo no anexo).

ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATEGAVIRIA, L. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Manag Res.**, v.29, p.1235-1250, 2011.

EVANS, D. H. The fish gill: Site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. **Environmental Health Perspect**, v.71, p.47-58, 1987.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983, 123p.

KARNOVSKY, M.J.; A formaldehyde-glutaraldehyde fixative at high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal Cell Biology**, v.11, p.137-140, 1965.

KUMAR, S.; GOPAL, K. Impact of Distillery Effluent on Physiological Consequences in the Freshwater Teleost *Channa punctatus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.66, p.617-622, 2001.

LAURENT, P.; PERRY, S.F. Effect of cortisol on gill chlorid cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. **Cell and Tissue Research**, v.259, p.429-442, 1990.

LAURENT, P; PERRY, S. F. Environmental effects on fish Gill morphology. **Physiological Zoology**, Chicago, v. 64, n.1, p. 4-25, 1991.

MACHADO, M.R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. **Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 1, n. 1, p. 63-76, 1999.

- MALLAT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. **Canadian journal of fisheries and aquatic sciences**, v.42, p.630-648, 1985.
- MANE, J.D.; MODI, S.; NAGAWADE, S.; PHADNIS, S.P.; BHANDARI, V.M.. Treatment of spent wash using chemically modified bagasse and colour removal studies. **Bioresource Technology**, v.97, p. 1752–1755, 2006.
- MARINHO, J.F.U.; CORREIA, J.E.; MARCATO, A.C.C.; PEDRO-ESCHER, J. FONTANETTI, C.S. Sugar cane vinasse in water bodies: impact assessed by liver histopathology in tilapia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.110, p.239-245, 2014.
- MOHANA, S.; ACHARYA, B.K.; MADAMWAR, D. Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications. **Journal of Hazardous Materials**. v.163, p.12–25, 2009.
- NOWAK, B. Histological changes in gills induced by residues of endossulfan. **Aquatic Toxicology**, v. 23, p. 65-84, 1992.
- PANDEY, S.; PARVEZ, S.; ANSARI, R.A.; ALI, M.; KAUR, M.; HAYAT, F.; AHMAD, F.; RAISUDDIN, F. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, p. 183-192, 2008.
- PERRY, S.F. Relationships Between Branchial Chloride Cells and Gas Transfer in Freshwater Fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.119A, p. 9-16, 1998
- PERRY, S.F. The chloride cell: Structure and Function in the Gills of Freshwater Fishes. **Annual Review of Physiology**, v.59, p. 325-347, 1999.
- RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. New York: Ed. Washington, Mcgraw Hill, 1985. 666 p.
- SANTANA, V.S.; MACHADO, N.R.C.F. Photocatalytic degradation of the vinasse under solar radiation. **Catal. Today**, v.133, p.606–610, 2008.
- SOUZA, T.S.; HENCKLEIN, F.A.; De ANGELIS, D.F.; FONTANETTI, C.S. Clastogenicity of landfarming soil treated with sugar cane vinasse. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, p. 1627-1636, 2013.
- TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. 2. ed. Tokyo: Kodanska / Stuttgart: Fischer Verlag. 195p, 1995.
- YESILADA, E. Genotoxic activity of vinasse and its effect on fecundity and longevity of *Drosophila melanogaster*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.63, p.560-566, 1999.

Tabela 1. Análises físico-químicas da vinhaça de cana-de-açúcar

Parâmetro	Vinhaça bruta	Vinhaça 1%	Vinhaça 2,5%	Vinhaça 5%	Vinhaça 10%
pH inicial	4,60	7,32	7,22	7,23	7,32
pH final	-	9,20	8,40	8,90	7,60
Cálcio (mg/L)	828 (25%)	27,87	62,33	95,20	96,80 (5%)
Condutividade Elétrica ($\mu\text{s/cm}$)	8294	446	685	1110	1022
DBO (mg/L)	13394,30	<LQ	22,10	26,40	47,10
DQO (mg/L)	31723,20	<LQ	144,50 (2%)	246,50	325,90
Dureza (mg CaCO_3/L)	3390,40	107,80	257,70	384,90	400,70
Fosfato total (mg/L)	5,51 (20%)	0,673 (2%)	0,40 (5%)	3,93 (10%)	1,46 (10%)
Magnésio (mg/L)	321,25 (25%)	9,27	24,78	35,75	38,62
Potássio (mg/L)	3276 (100%)	38,06	91,36	264,40 (5%)	224,95 (5%)
Sódio (mg/L)	13,57	36,50	8,58	15,10	9,02
Sulfato (mg/L)	340,27 (20%)	32,76 (2%)	70,58 (5%)	174,64 (10%)	123,319 (10%)
Alumínio	0,47	<LQ	0,08	<LQ	0,15
Bário	0,21	0,07	0,06	0,05	0,069
Boro	<LQ	0,369	<LQ	<LQ	<LQ
Chumbo	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cobalto	0,014	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cobre	0,15	<LQ	0,009	<LQ	<LQ
Cromo	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Ferro	8,53	0,077	0,228	0,412	0,495
Manganês	3,11 (25%)	<LQ	0,026	0,131	0,147
Merúrio	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Molibdênio	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Níquel	0,029	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Nitrogênio Amoniacal	10,92	3,12	4,12	9,57	7,47
Nitrogênio Kjeldahl	234,10	4,80	10,60	14,30	12,60
Zinco	0,625	0,02	0,022	0,038	0,032

LQ: Limite de quantificação; valores em parênteses: amostra diluída.

Tabela 2: Frequência de ocorrência de alterações significativas encontradas nas brânquias em *O. niloticus* expostos à vinhaça tratada.

Alterações	CN	V1%	V2,5%	V5%	V10%
Desprendimento epitelial	0,20±0,48	0,72±1,28	0,78±1,28	2,51±1,03*	2,70±1,35*
Desorganização lamelar	1,35±1,33	1,81±0,90	2,49±0,60	3,51±0,90*	2,90±0,65
Hemorragia	0,80±1,05	0,72±0,83	0,49±0,54	2,61±1,50*	3,10±0,96*
Aneurisma	0,50±0,94	0,20±0,48	0,05±0,15	1,61±1,27	1,00±1,22
Edema	0	0,30±0,97	0,07±0,20	0,36±1,16	0
Perda das cristas	3,60±1,83	3,20±1,31	3,15±1,52	3,65±0,88	3,80±0,90

Dados apresentados como média ± desvio padrão. CN: Controle negativo; V1%: Vinhaça 1%; V2,5%: Vinhaça 2,5%; V5%: Vinhaça 5%

*: Valor significativo para $p < 0,05$ pelo teste Kruskal-Wallis em relação ao controle negativo.

Tabela 3: Média (M) e desvio padrão (DP) de células mucosas e células clorídricas quantificadas entre as lamelas secundárias de *O. niloticus* do grupo controle e expostos às diferentes concentrações de vinhaça tratada.

Tratamento	Controle	V 1%	V 2,5%	V 5%	V10%
Células Mucosas	394,3±113,68	442,2±105,32	454,2±127,91	424,9±90,25	412,8±65,26
Células clorídricas	27,00±14,15	34,50±14,91	30,40±10,28	41,30±12,45	28,40±9,65

Dados apresentados como valores máximos, mínimos, média e desvio padrão, frequência e células mucosas totais. CN: Controle negativo; V1%: Vinhaça 1%; V2,5%: Vinhaça 2,5%. V5%: Vinhaça 5%

*: Valor significativo para $p < 0,05$ pelo teste ANOVA em relação ao controle.

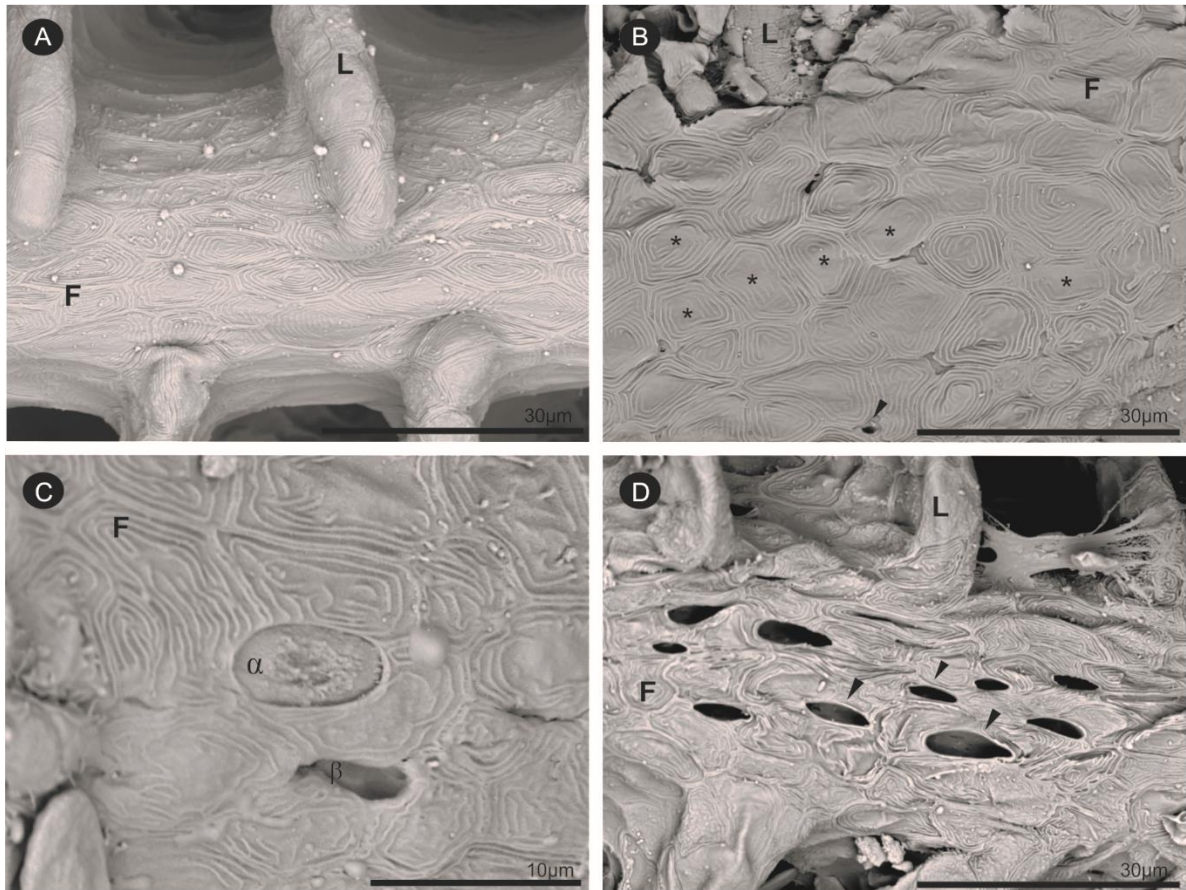


Figura 1: Micrografias eletrônicas de varredura de brânquias de *O. niloticus*. A: Grupo Controle; B, C e D: Grupos expostos à vinhaça tratada; (F): filamento primário; (L): lamela secundária (*): células pavimentosas com perda de cristas; (cabeças de seta): células clorídricas.

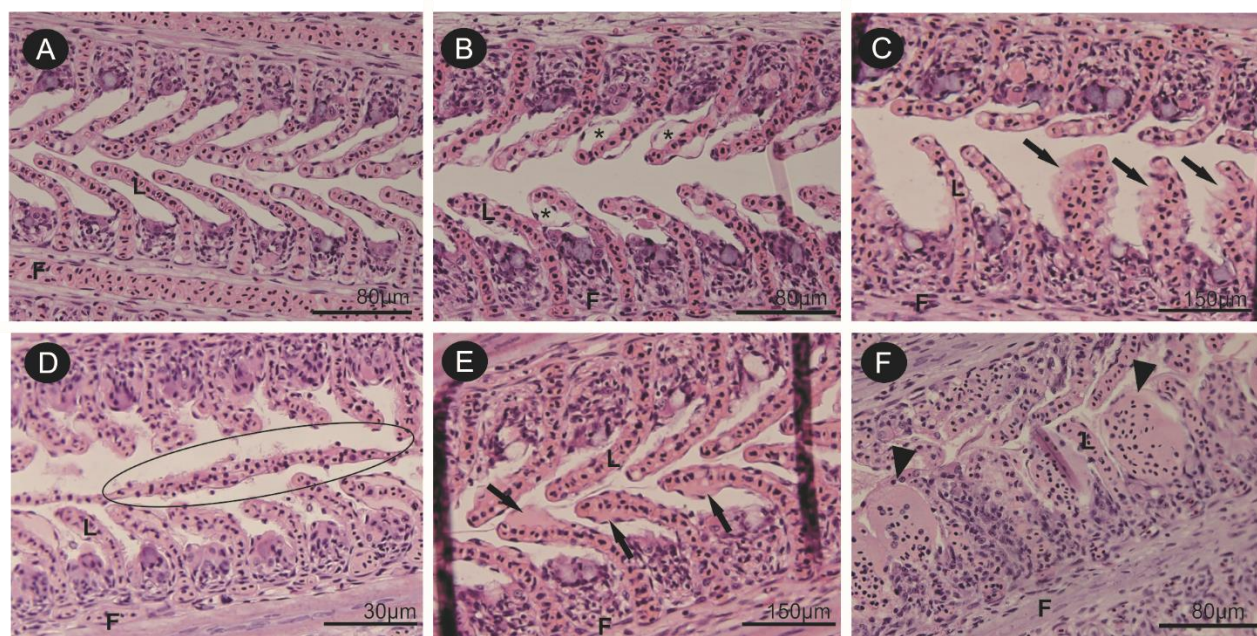


Figura 2. Secções histológicas de brânquias em *O. niloticus*. A. Grupo Controle; B, C, D, E e F: Grupos expostos. (F): filamento primário; (L): lamela secundária; (*) desprendimento epitelial; (setas em C) desorganização e perda da integridade das lamelas; (círculo) hemorragia; (setas em E) edema; (cabeças de seta) aneurisma.

6. Considerações Finais

O setor sulcroalcooleiro é um dos setores mais importantes para economia do país; o Brasil é o maior produtor de etanol no mundo, 1% de todo o seu território é coberto pela cana-de-açúcar. Além de ganhar destaque na economia, o setor sulcroalcooleiro se destaca também em questões ambientais, uma vez que no processo de destilação da cana em etanol é gerado um volume quinze vezes maior de vinhaça como resíduo.

A vinhaça é utilizada como fertilizante da própria cultura da cana, uma vez que seu lançamento em corpos hídricos é proibida por lei, e o tratamento desse resíduo não é economicamente viável para as usinas. Embora a vinhaça seja um bom fertilizante devido a sua grande concentração de macronutrientes, esse resíduo possui alta quantidade de matéria orgânica e outros compostos que podem ser tóxicos tanto para a biota do terrestre, quanto aquática.

Os danos no DNA evidenciados no presente estudo pelo ensaio do cometa, são danos primários, passíveis, portanto, de correção. O baixo número de eritrócitos micronucleados nos peixes expostos à vinhaça tratada sugere diminuição do potencial genotóxico desse resíduo quando seu pH é corrigido para um valor neutro, uma vez que a quantidade de micronúcleos na vinhaça não tratada foi significativamente maior. Os metais contidos na vinhaça podem ser os responsáveis pela ação na molécula de DNA; ao alterar o pH de ácido para neutro, a disponibilidade dos metais no meio aquático pode ter sido alterada diminuindo sua toxicidade.

A brânquia é um dos órgãos vitais dos peixes, responsável pela respiração, ajuda no controle de osmoregulação, entre outras funções. Em contrapartida, é um dos órgãos mais sensíveis, uma vez que está em contato direto com o meio aquático. Essas características fazem de suas alterações teciduais excelentes biomarcadores. A semiquantificação dessas alterações se tornou uma ferramenta muito útil na avaliação de possíveis danos nesse órgão.

Nas tilápias expostas as diluições de vinhaça tratada, os índices de alteração foram todos baixos, mesmo apresentando diferenças significativas em relação ao controle. Quando comparadas aos índices obtidos em tilápias expostas a vinhaça não tratada, cujos índices foram maiores, pode-se inferir que a vinhaça tratada foi menos agressiva para a brânquia.

Portanto, estudos que proponham um pré-tratamento para a vinhaça para reduzir sua toxicidade antes de ser utilizada como fertilizante se faz necessário. Esse estudo

demonstrou que o acerto do pH da vinhaça foi efetivo ao reduzir a toxicidade desse resíduo; houve diminuição da taxa de mortalidade de tilápias, diminuição na incidência de micronúcleo nas células sanguíneas desses animais e os índices de alterações histopatológicas nas brânquias foram baixos.

Tendo em vista os resultados apresentados, a correção do pH da vinhaça pode ser um tratamento efetivo em reduzir sua toxicidade, podendo ser aplicada pelo setor sulcroalcooleiro, unindo produção e preservação ambiental. Em contrapartida, o uso da cal associado a vinhaça pode contribuir para uma potencial salinização no solo, uma vez que esse resíduo já possui altas concentrações de potássio e sulfato.

7. Referências bibliográficas

- ALGUR, O.F.; KADIOGLU, A.; The effects of vinasse on the growth, biomass and primary productivity in pea (*Pisum sativum*) and sunflower (*Helianthus annuus*). **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.39, p.139-144, 1992.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D.; Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.323, p.121-135, 1995.
- AL-SHAMSI, L.; HAMZA, W.; EL-SAYED, A.-F. Effects of food sources on growth rates and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v. 9, p. 447-455, 2006.
- BALL-COELHO, B.; TIESSEN, H.; STEWART, J.W.B.; SALCEDO, I.H.; SAMPAIO, E.V.S.B. Residue management effects on sugarcane yield and soil properties in Northeastern Brazil. **Agronomy Journal**, Madison, v.85, p.1004-1008, 1993.
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of fish diseases**, v.22, p.25-34, 1999.
- BIAGINI, F.R.; DAVID, J.A.O.; FONTANETTI, C.S. The use of histological, histochemical and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted waters. **Micron**, v.40, p.839-844, 2009.
- BOLT, H. M.; STEWART, J. D.; HENGSTLER, J. G. A comprehensive review about micronuclei: mechanisms of formation and practical aspects in genotoxicity testing. **Archives of toxicology**, v. 85, n. 8, p. 861-862, 2011.
- BOTELHO, R.G.; TORNISIELO, V.L.; de OLINDA, R.A.; MARANHO, L.A.; MACHADO-NETO, L. Acute toxicity of sugarcane vinasse to aquatic organisms before and after pH adjustment. **Toxicological and Environmental Chemistry**, p. 1-11, 2012.
- BRITO, L.T. **Análise de brânquias de peixes expostos às águas de ambiente lântico**. Trabalho de conclusão de curso (TCC). UNESP – IB – Rio Claro/SP, 2009.

CAMARGO, J.A.; PEREIRA, N.; CABELLO, P.R.; TERAN, F.J.P. Viabilidade da aplicação do método respirométrico de Bartha para análise da atividade microbiana de solos sob aplicação da vinhaça. **Engenharia Ambiental**, v. 6, p. 264-271, 2009.

CAMPOS, C.R.; MESQUITA, V.A. SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F. Efficiency of physicochemical and biological treatments of vinasse and their influence on indigenous microbiota for disposal in environment. **Waste Management**, v. 34, p. 2036-2046, 2014.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MAYERS, M.S. Assessment of the piscine micronuclei test as in situ biological indicator of chemical contaminants effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, Ottawa, v.47, p.2123-2136, 1990.

CARVALHO, E.D. Avaliação dos impactos da piscicultura em tanques-rede nas represas dos grandes tributários do Alto Paraná (Tietê e Paranapanema): o pescado, a ictiofauna agregada e as condições limnológicas. **Relatório Científico (FAPESP)**, Botucatu, SP, 46 p., 2006.

CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 189p. 1992.

ÇAVAS, T. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. **Food and Chemical Toxicology**. v. 49, p. 1431-1435, 2011.

CERQUEIRA, E. D. M. M., & MEIRELES, J. R. C. The Use of the Micronucleus Test to Monitor Individuals at Risk of Oral Cancer. **In: Concept Press Admin Team. (Org.). The Research and Biology of Cancer**. 1ed.Hong Kong: iConcept Press Ltd., 2014, p. 33-58.

CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) Vinhaça-criterios e procedimentos para aplicação no solo na agricultura. Norma técnica P4231. São Paulo, 2006.

CHEONG, H. S., SETH, I., JOINER, M. C., & TUCKER, J. D. Relationships among micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds within individual cells in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutagenesis**, v.28, n.4, 433-440, 2013.

CHERUBINI F. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, v.51, p.1412-1421, 2010.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; DAVID, J.A.O.; FONTANETTI, C.S. Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus*: a methodological comparions. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, p.155-159, 2009.

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

CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C.S.. Assessment of the Genotoxicity of Two Agricultural Residues After Processing by Diplopods Using the *Allium cepa* Assay. **Water, Air and Soil Pollution** (Dordrecht. Online), v. 224, p. 1523, 2013b.

COLLINS, A., KOPPEN, G., VALDIGLESIAS, V., DUSINSKA, M., KRUSZEWSKI, M., MØLLER, P.; ROJAS, E.; DHAWAN, A.; BENZIE, I.; COSKUN, E.; MORETTI, M.; SPEIT, G.; BONASSI, S. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v.759, p.27-39, 2014.

COSTA-PIERCE, B. A. Rapid evolution of the established feral tilapia (*Oreochromis* spp.): the need to incorporate invasion science into regulatory structures. **Biology Environmental Magazine**, v. 5, p. 71-84, 2003.

CRAVEIRO AM, SOARES HM, SCHMIDELL W. Technical aspects and cost estimations for anaerobic systems treating vinasse and brewery/soft drink wastewaters. **Water Science Technology** v.18, p.123–134, 1986.

ERGENE, S.; ÇAVAS, T.; ÇELIK, A.; KOELI, N.; KAYA, F.; KARAHAN, A. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. **Ecotoxicology**, v. 16, p. 385-391, 2007.

ERKEM, B.; KOLANKAYA, D. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v.64, p.418 – 425, 2000.

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

FARIAS, T.Q. **Competência legislativa em matéria ambiental. Revista Direito e Liberdade**, v. 5, p. 1-19, 2009.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A.T.; SURRALES, J. CROFT, J.; PARRY, J.; NORPPA, H. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in human cells. **Mutagenesis**, v.26, p.125–132, 2011.

FERREIRA, L.F.R.; AGUIAR, M.M.; MESSIAS, T.G.; POMPEU, G.B.; QUEIJEIRO LOPEZ, A.M.; SILVA, D.P.; MONTEIRO, R.T Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.44, p.132-137, 2011.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A., FONTAÍNHAS-FERNANDES A., MONTEIRO R., REIS-HENRIQUES M.A., ROCHA, E. Effects of the Fungicide Mancozeb on Liver Structure of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*: Assessment and Quantification of Induced Cytological Changes Using Qualitative Histopathology and the Stereological Point-Sampled Intercept Method. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.76, p.249–255. 2006.

FONTANETTI, C.S.; Nogarol, L.R.; SOUZA, R.B.; PEREZ, D.G.; MAZIVIERO, G.T. Bioindicators and biomarkers in the assessment of soil toxicity. **In: Soil Contamination**, c. 08, 2011.

FONTANETTI, C.S.; SOUZA, T. S.; CHRISTOFOLETTI, C. A. . The role of biomonitoring in the quality assessment of water resources. In: Bilibio, C.; Hensel, O.; Selbach, J. (Org.). **Sustainable water management in the tropics and subtropics - and cases study in Brazil**. 1ªed.Brasil/Alemanha: UNIPAMPA/UNIKASSEL, 2012, v. 3, p. 975-1005.

FUESS, L.T.; GARCIA, M.L. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. **Journal of Environmental Management**, v.145, p.210-229, 2014.

FUZINATTO, C. F., FLOHR, L., MELEGARI, S. P., & MATIAS, W. G. Induction of micronucleus of *Oreochromis niloticus* exposed to waters from the Cubatão do Sul River, southern Brazil. **Ecotoxicology and environmental safety**, 98, 103-109. 2013.

GALLI, L. F.; TORLONI, C. E. C. **Criação de peixes**. Editora Nobel, 2ª edição; São Paulo, 1984.

GIRÓN-PÉREZ, M. I.; SANTERRE, A.; GONZALEZJAIME, F.; CASAS-SOLIS, J.; HERNANDEZ CORONADO, M.; PEREGRINA-SANDOVAL, J.; TAKEMURA, A.; ZAITSEVA, G. Immunotoxicity and hepatic function evaluation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to diazinon. *Fish and Shellfish Immunology*, London, v. 23, n. 4, p. 760-769, 2007.

GLÓRIA, N.A.; ORLANDO FILHO, J. Aplicação da vinhaça como fertilizante. **Boletim Técnico Planasucar**, Piracicaba, v.5, n.1, p.5-38, 1983.

GOSS, G.G.; LAURENT, P.; PERRY, S.F. Gill morphology during hypercapnia in brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*): Role of chloride cells and pavement cells in acid base regulation. **Journal of fish diseases**, v.45, p.706-718, 1994.

GRISOLIA, C. K.; STARLING, F. L. R. M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 491, p. 39-44, 2001.

HARSHBARGER, J. C.; CLARK, J., B. Epizootiology of neoplasms in bony fish of North-America. **Science of the Total Environment**, v. 94, n. 1-2, p. 1-32, 1990.

HARTMANN, A. *et al.* Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 45-51, January 2003.

HEMALATHA, S.; BANERJEE, T. K. Histopathological analysis of sublethal toxicity of zinc chloride to the respiratory organs of the airbreathing catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Biological research**, v.30, p.11-21, 1997.

HOSE, J.R.; CROSS, J.N.; SMITH, S.G.; DIEHL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites of Southern California. **Marine Environmental Research**, Oxford, v.22, n.3, p.167-176, 1987.

HOSHINA, M.M.; MARIN-MORALES, M.A. Evaluation of the Genotoxicity of Petroleum Refinery Effluents Using the Comet Assay in *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Rio Claro, v.5, p.75-79, 2011.

JAGOE, H.C.; HAINES, T.A. Changes in gill morphology of Atlantic salmon (*Salmo salar*) Smolts due to addition of acid and aluminum to stream water. **Environmental Pollution**, v.97, n.1-2, p.137-146, 1997.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983, 123p.

KARNOVSKY, M.J.; A formaldehyde-glutaraldehyde fixative at high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal Cell Biology**, v.11, p.137-140, 1965.

KIRSCH-VOLDERS, M.; PLAS, G.; ELHAJOUJI, A.; LUKAMOWICZ, M.; GONZALEZ, L.; LOOCK, K.V.; DECORDER, I. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 85, p.873–899, 2011.

KOPPEN, G.; TONCELLI, L.M.; TRIEST, L.; VERSCHAEVE, L. The comet assay: a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves. **Mechanisms of Ageing and Development**, Limerick, v.110, n.1-2, p.13-24, 1999.

KUMAR, S.; GOPAL, K. Impact of Distillery Effluent on Physiological Consequences in the Freshwater Teleost *Channa punctatus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.66, p.617-622, 2001.

KUMAR, R.; NAGPURE, N.S.; KUSHWAHA, B.; SRIVASTAVA, S.K.; LAKRA, W.S. Investigation of the Genotoxicity of Malathion to Freshwater Teleost Fish *Channa punctatus* (Bloch) Using the Micronucleus Test and Comet Assay. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.58, p. 123-130, 2010

LAURENT, P.; HOBE, H.; DUNEL-ERB, S. The role of environmental sodium chloride relative to calcium in gill morphology of freshwater salmonid fish. **Cell and Tissue Research**, v.240, p.675-692, 1985.

LAURENT, P. Structure of vertebrate gills. In.: **Gills**. HOULIHAN, D.F.; RANKIN, J.C.; SHUTTLEWORTH, T.J. (eds). Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 228p. 1982.

LAURENT, P.; PERRY, S.F. Effect of cortisol on gill chlorid cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. **Cell and Tissue Research**, v.259, p.429-442, 1990.

LAURENT, P; PERRY, S. F. Environmental effects on fish Gill morphology. **Physiological Zoology**, Chicago, v. 64, n.1, p. 4-25, 1991.

LEWIS, S.V. A scanning electron microscope study of gills of the air breathing catfish, *Clarias batrachus*. **Journal of fish biology**, v.15, p.381-384, 1979.

LYRA, M. R. C. C.; ROLIM, M. M.; SILVA, J. A. A. da. Toposequência de solos fertirrigados com vinhaça: contribuição para a qualidade das águas do lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 7, n. 3, p. 523-532, 2003.

MADSEN M, HOLM-NIELSEN JB, ESBENSEN KH. Monitoring of anaerobic digestion processes: a review perspective. **Renewable Sustainable Energy Rev**; v.15, p.3141–3155, 2011.

MALLAT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. **Canadian journal of fisheries and aquatic sciences**, v.42, p.630-648, 1985.

MANE, J.D.; MODI, S.; NAGAWADE, S.; PHADNIS, S.P.; BHANDARI, V.M.. Treatment of spent wash using chemically modified bagasse and colour removal studies. **Bioresource Technology**, v.97, p. 1752–1755, 2006.

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

MATEUCA R, LOMBAERT N, AKA PV, DECORDIER I, KIRSCH-VOLDERS M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie** v.88, p.1515–1531, 2006.

MELO, A. S. S. A.; SILVA, M. P. Estimando o valor da “externalidade positiva” do uso da vinhaça na produção de cana de açúcar: um estudo de caso. Disponível em: <http://www.ecoeco.org.br/conteudo/publicacoes/encontros/iv_en/mesa4/2.pdf> Acessado em 14 de Fevereiro de 2012.

MONTEIRO, R.T.; ROMANHOLO FERREIRA, L.F.; AGUIAR, M.M.; MESSIAS, T.G.; POMPEU, G.B.; QUEIJEIRO LOPEZ, A.M.; SILVA, D.P. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Piracicaba, v.44, p.132-137, 2011.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, v.339, p.135-147, 1998.

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

MORAES, B.S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.44, p. 888-903, 2015.

MOSEY F. New developments in the anaerobic treatment of industrial wastes. **Water Pollution Control**, v.81, p,540–552, 1982.

MOUSA, M. A; MOUSA, S.A. Immunocytochemical Study on the Localization and Distribution of the Somatolactin Cells in the Pituitary Gland and the Brain of *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). **General and Comparative Endocrinology**, v. 113, p. 197-211, 1999.

O'FLAHERTY V, COLLINS G, MAHONY T. The microbiology and biochemistry of anaerobic bioreactors with relevance to domestic sewage treatment. **Rev Environ Sci Biotechnol**, v.5, p.39–55, 2006.

OSMAN, A.G.M.; EL REHEEM, A.M.A.; MOUSTAFA, M.A.; MAHMOUD, U.M.; ABUEL-FADI, K.Y.; KLOAS, W. *In situ* evaluation of the genotoxic potential of the river Nile: I. Micronucleus and nuclear lesion test of erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) and *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Toxicological and Environmental Chemistry**. v.93, Issue 5, 2011.

OZKAN F.; GUNDUZ, S.G.; BERKOZ, M.; OZLUER HUNT, A. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, following exposure to sublethal cadmium doses. *Turkish Journal of Zoology*. v.35, p. 585-592, 2011.

PALHARES D., GRISOLIA, C.K. Comparasion between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. **Genetic and Molecular Biology**, v.25, p.281-284, 2002.

PEDROSA, E.M.R.; ROLIM, M.M.; ALBUQUERQUE, P.H.S.; CUNHA, A.C. Supressividade de nematóides em cana-de-açúcar por adição de vinhaça ao solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.9, p.197-201, 2005.

PONCE-MARBÁN, D.; HERNÁNDEZ, J. M.; GASCA-LEYVA, E. Simulating the economic viability of Nile tilapia and Australian redclaw crayfish polyculture in Yucatan, Mexico. **Aquaculture**, v. 261, p. 151-159, 2006.

RAGUGNETTI, M.; ADAMS, M.L.; GUIMARÃES, A.T.B.; SPONCHIADO, G.; VASCONCELOS, E.C.; OLIVEIRA, C.M.R. Ibuprofen Genotoxicity in Aquatic

Environment: An Experimental Model Using *Oreochromis niloticus*. **Water, Air and Soil Pollution**. v.218, p.361-364, 2011.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. New York: Ed. Washington, McGraw Hill, 1985. p. 666

RESENDE, J.O. **Conseqüências da aplicação de vinhaça sobre algumas propriedades físicas de um solo aluvial (estudo de um caso)**. 1979. 112p. (Tese de Doutorado), ESALQ, Piracicaba-SP.

RIGONATO, J.; MANTOVANI, M.S.; JORDÃO, B.Q. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, p.464-468, 2005.

ROSETY-RODRÍGUEZ, M.; ORDOÑEZ, F.J.; ROSETY, M.; ROSETY, J.M.; RIBELLES, A.; CARRASCO, C. Morpho-histochemical changes in the gills of turbot, *Scophthalmus maximus* L., induced by sodium dodecyl sulfate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.51, p.223-228, 2002.

SANTANA, V.S.; MACHADO, N.R.C.F. Photocatalytic degradation of the vinasse under solar radiation. **Catal. Today**, v.133, p.606-610, 2008.

SANTOS, E. **Pesca e piscicultura**. Editora Itatiaia Limitada; Belo Horizonte, 1977.

SILVA, A.J.N.; CABEDA, M.S.V. Influência de diferentes sistemas de uso e manejo na coesão, resistência ao cisalhamento e óxidos de Fe, Si E Al em solo de tabuleiro costeiro de Alagoas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.29, n.3, p.447-457, 2005.

SILVA, M.A.S.; GRIEBELER, N.P.; BORGES, L.C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.11, n.11, p.108-114, 2007.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, n.1, p.184-191, 1988.

SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C.S. DNA damage of erythrocytes of *Oreochromis niloticus*, after acute exposure to river water receiving effluent from an oil refinery. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology-JBSE**, v.5, n.2-3, 2012.

SOUZA, T.S.; HENCKLEIN, F.A.; De ANGELIS, D.F.; FONTANETTI, C.S. Clastogenicity of landfarming soil treated with sugar cane vinasse. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185 , p. 1627-1636, 2013.

SOUZA V.H.E.; SOARES, C.H.L.; CANTAGALLI, L.B.; VICENTINI, V.E.P. **Utilização de testes citogenéticos para avaliação de mutagênese ambiental**. 2005.

Disponível em:

<<http://www.pec.uem.br/dcu/Trabalhos/6laudadas/SOUZA,%20Vitor%20Hugo%20Enumo%20de.pdf>>. Acesso em: 14/05/2015.

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**, v. 605, p. 87-93, 2006.

SPEECE, R.E. Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters. **Archae Press**; 1996.

SPEIT, G.; HARTMANM, A. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). **Mutagenesis**, v. 10, p. 555-560, 1995.

STREIT, B. Bioaccumulation of contaminants in fish. In: BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B. (Ed.). **Fish ecotoxicology**. Basel: Birkhauser, p. 353-387, 1998.

TEMMINK, J.; BOWMEISTER, P. DE JONG P.; VAN DER BERG, J. An ultra structural study of chromate-induced hyperplasia in the gill of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Aquatic Toxicology**, v.4, p.165-179, 1983.

WILKIE, A., RIEDESEL, K., OWENS, J. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, v.19, p.63-102. 2000.

YESILADA, E. Genotoxic activity of vinasse and its effect on fecundity and longevity of *Drosophila melanogaster*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.63, p.560-566, 1999.

ANEXO

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE BRÂNQUIAS DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) EXPOSTOS À VINHAÇA DA CANA-DE-AÇÚCAR

Correia, J.E.; Christofolletti, C.A.; Marcato, A.C.C.; Marinho, J.F.U.; Fontanetti, C.S. ^{1*}

¹ UNESP (Universidade Estadual Paulista), Av. 24-A, 1515. Bela Vista. Rio Claro, SP, Brasil.

² Centro Universitário Hermínio Ometto (FHO- UNIARARAS), Av. Dr. João Maximiliano Baruto, 500. Jd. Universitário. Araras, SP, Brasil.

*Corresponding author: Tel.: +55 19 35264139; fax: +55 19 35264136.

E-mail: fontanet@rc.unesp.br

RESUMO

Atualmente a cana-de-açúcar é uma das principais monoculturas do país, tendo forte impacto na economia e também no meio ambiente. A vinhaça da cana-de-açúcar, um dos principais resíduos gerados na transformação da cana em etanol, possui potencial poluidor, frente ao largo volume subproduzido e às suas características físico-químicas. Deste modo, este estudo procurou avaliar a toxicidade da vinhaça por meio da análise das brânquias de peixes *Oreochromis niloticus*, expostos a diferentes diluições (1, 2,5, 5 e 10%), em dois bioensaios. As brânquias foram coletadas, fixadas e posteriormente analisadas por meio de técnicas ultramorfológica, histológica e histoquímica (para detecção de células mucosas). Após exposição à vinhaça observou-se uma redução das cristas presentes na superfície das células pavimentosas estatisticamente significativa no segundo bioensaio; estas estruturas são responsáveis pela retenção do muco, o qual ajuda na proteção do tecido; também foi observado um entumescimento das células nos tratamentos com vinhaça e um aumento na quantidade de células clorídricas. As alterações teciduais mais observadas foram desprendimento epitelial e perda da integridade das lamelas secundárias, levando a ruptura das mesmas, desenvolvendo assim um quadro de hemorragia. No primeiro bioensaio a quantificação destas alterações foi estatisticamente significativa para a diluição 5%, e focos de hemorragia foram significativos para todas as diluições; no segundo bioensaio a desorganização epitelial foi estatisticamente significativa apenas para a diluição de 2,5% de vinhaça; além destas alterações foram observados focos de hiperplasia nas brânquias dos peixes da diluição de 5%. Observou-se um aumento significativo das células mucosas em relação ao controle, em ambos os bioensaios realizados, contudo não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Os resultados revelaram a ação tóxica da vinhaça, uma vez que foram observadas alterações histopatológicas nos animais expostos, em todas as diluições testadas sugerindo uma maior cautela na disposição da vinhaça de cana-de-açúcar em solos, frente a sua capacidade de ser lixiviada ou percolada até os recursos hídricos, podendo prejudicar seriamente a fauna aquática.

Palavras-chave: Vinhoto, toxicidade aquática, histologia, ultramorfologia, histoquímica.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil se posiciona no cenário mundial como um dos maiores exportadores de recursos agrícolas; dentre os principais estão a soja, o milho, o café e a cana-de-açúcar. Frente à natureza exportadora, tais monoculturas necessitam de grandes áreas de terra, fazem uso excessivo de agrotóxicos e pesticidas, além de produzir grande quantidade de resíduos, os quais podem conter elementos e substâncias potencialmente poluidoras (RIBEIRO et al., 2007; UNICA, 2007); conseqüentemente, o agronegócio tem se tornado um dos setores da economia que mais causam impacto ambiental.

Atualmente, um dos temas de discussão mais relevantes na comunidade científica mundial é o impacto gerado pelas atividades antrópicas ao meio ambiente, influenciando a qualidade da água, do solo e do ar. O descarte de produtos tóxicos no meio ambiente leva a sérios danos aos organismos, aos ecossistemas terrestres e principalmente ao aquático, uma vez que os ecossistemas de água doce, juntamente com os estuários, fornecem os sistemas mais baratos e convenientes para descarte de efluentes (ODUM, 1988). Esses efluentes, principalmente os industriais, podem ter composições complexas podendo apresentar pesticidas e metais tóxicos, ocasionando sérios danos aos organismos (VEGA et al., 1996). Em consequência disso, a preocupação em diagnosticar e monitorar a poluição ambiental aquática é crescente e de extrema importância.

A vinhaça da cana-de-açúcar, também conhecida popularmente por restilo, vinhoto ou garapão, caracteriza-se como um dos principais resíduos da transformação da cana-de-açúcar em etanol. Geralmente é ácida (pH 3,5-5), de coloração castanho-escura, de odor incômodo aos humanos e com alto conteúdo orgânico (COD 50-150 g.L⁻¹) (WALISZEWSKI et al., 1997; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011). A produção de etanol a partir de biomassa resulta em um considerável volume de vinhaça, com alto potencial poluidor (WILKIE et al., 2000). Em média, para cada litro de etanol são gerados de 10 a 15 litros de vinhaça como resíduo (YESILADA, 1999; KUMAR; GOPAL, 2001; CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Por ser rica em matéria orgânica e micronutrientes, a vinhaça possui também alto valor fertilizante e é amplamente reutilizada para fertirrigação da própria cana-de-açúcar, mas devido às altas quantidades utilizadas, é capaz de saturar o solo e contaminar corpos d'água que estejam próximos a

estes cultivos (SILVA et al., 2007). Dessa forma, a vinhaça pode acarretar diversos danos à vida aquática.

Os peixes possuem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, indicando assim, o potencial perigo de novas substâncias químicas ou para a possibilidade de poluição ambiental. São considerados bons organismos teste para monitorar a qualidade da água, especialmente as espécies pequenas de aquário, que podem ser mantidas em laboratório e facilmente expostas às substâncias tóxicas, sendo utilizadas na avaliação da presença de substâncias com potencial de causar danos à saúde humana (HARSHBARGER; CLARK, 1990; AL-SABTI; METCLAFE, 1995).

Em contrapartida, as brânquias dos peixes são o principal alvo de vários poluentes aquáticos (KIKUCHI et al., 1978), sendo seu epitélio, um excelente modelo para examinar os efeitos de substâncias dissolvidas nos tecidos (EVANS, 1987; BIAGINI et al., 2009); além disso, as brânquias são os órgãos mais afetados por seu contato constante com a água (MACHADO, 1999), por isso, são geralmente considerados bons indicadores da qualidade da água e os peixes, modelos para estudo de impacto ambiental (FONTANETTI et al., 2012).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial tóxico da vinhaça em meio aquático, utilizando a histopatologia das brânquias de tilápias do Nilo após exposição aguda a diferentes diluições deste efluente, em bioensaios laboratoriais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material biológico

Foram utilizados como organismos teste, peixes da espécie *O. niloticus* (Perciformes, Cichlidae), popularmente conhecido como tilápia do Nilo. Foram utilizados indivíduos com tamanho médio de 10 cm, para evitar diferenças intra-específicas relacionadas ao tamanho e idade dos peixes. Os espécimes, oriundos de piscicultura, foram aclimatados em tanque.

Antes do início dos experimentos, o presente trabalho foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências, UNESP (Universidade Estadual Paulista), Rio Claro, São Paulo, Brasil, protocolo nº 1047 de 16/02/2011.

2.2 Vinhaça como substância tóxica

As amostras de vinhaça de cana-de-açúcar foram coletadas em uma usina de açúcar e álcool, localizada na cidade de Araras, São Paulo, Brasil, oriundas de duas safras distintas (safras 2011 e 2012). Os efluentes foram mantidos em câmara fria (4°C), no Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, até o início dos experimentos.

2.3 Análise físico-química da vinhaça

Foram realizadas análises físico-químicas de uma das amostras do efluente, por laboratório especializado (TASQA Serviços Analíticos Ltda., Paulínia, São Paulo, Brasil), para determinação precisa de sua composição. Foram mensurados os parâmetros: pH, condutividade elétrica, dureza, resíduo não filtrável total, nitrogênio nitrato e nitrito, nitrogênio Kjeldahl, amônia, cálcio, enxofre total, fosfato total, magnésio, potássio, sódio, sulfato, DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), DQO (Demanda Química de Oxigênio) e metais (arsênio, bário, cádmio, chumbo, cobre, cromo, mercúrio, molibdênio, níquel, selênio e zinco).

2.4 Bioensaios com *O. niloticus*

Os bioensaios foram montados em aquários com capacidade de 40 litros. Em cada aquário, foram dispostos cinco peixes já aclimatados (machos e fêmeas, distribuídos aleatoriamente), no qual permaneceram 96 horas, a temperatura ambiente de aproximadamente 24°C, com sistemas de filtragem e aeração. O controle negativo recebeu água de poço artesiano e nos outros tratamentos foram adicionados diluições crescentes de vinhaça, de 1, 2,5, 5 e 10%, tendo como base estudos anteriores, os quais utilizaram diluições similares de vinhaça para analisar seu efeito em diferentes organismos (ALGUR, KADIOGLU, 1992; KUMAR; GOPAL, 2001).

2.5 Dissecção dos animais

Decorrido o tempo de exposição de 96 horas, os espécimes de *O. niloticus* foram retirados dos aquários, anestesiados, dissecados em solução fisiológica e eutanasiados por espinhalamento utilizando tesoura cirúrgica. Após a retirada do segundo arco

branquial, este foi fixado em solução Bouin e formaldeído, de acordo com a técnica de coloração a ser empregada, permanecendo no fixador por pelo menos 2 horas.

2.6 Ultramorfologia – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O segundo arco branquial dos espécimes expostos foi retirado e fixado em fixador Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), mantido em geladeira. Este material foi então desidratado em uma série de concentrações crescentes de acetona, levado ao ponto crítico e colado em suporte metálico. As análises foram feitas ao microscópio eletrônico de varredura de baixo vácuo HITACHI TM3000.

2.7 Histologia e Histoquímica

As brânquias foram desidratadas em solução de etanol a 70, 80, 90 e 95%. Em seguida, foram imersas em resina de embebição (Leica Histo-resin – Embedding Kit), por 24 horas, em geladeira. O material foi então transferido para moldes plásticos contendo resina de inclusão e, posteriormente, cortados com auxílio de micrótomo. As secções foram coradas por hematoxilina e eosina (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983), de acordo com rotina histológica, ou ainda submetidas ao teste histoquímico de PAS (Periodic Acid-Schiff) para a detecção de polissacarídeos neutros (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

2.8 Interpretação dos resultados

Foram analisadas duas lâminas com oito cortes de 6 μm para cada peixe, sendo $n=5$ para cada um dos bioensaios. Assim, foram analisados um total de 40 lâminas e 160 cortes histológicos para cada técnica realizada, por bioensaio. Os resultados encontrados no controle e nos tratamentos dos dois bioensaios foram comparados entre si.

A descrição e a avaliação das alterações histopatológicas tiveram como base o protocolo padronizado de Bernet et al. (1999) e adaptado por Marinho et al. (2014): um fator de importância (w) foi definido para cada lesão, de acordo com sua importância patológica, ou seja, como isso afeta a função do órgão e a capacidade de sobrevivência dos peixes. As alterações foram previamente classificadas em três fatores de importância: (1) Importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível quando a exposição ao irritante termina; (2) Importância patológica moderada, a lesão é reversível na maioria dos casos, quando o estressor é neutralizado; e (3) Importância patológica acentuada, a lesão é geralmente irreversível, levando à perda parcial ou total

da função do órgão. Para melhor compreensão dos resultados, as anomalias histopatológicas descritas foram também classificadas em escores (*a*) que variaram de 0 a 6, dependendo do grau e da extensão da alteração, sendo: (0) nenhuma ocorrência; (2) pouca ou rara ocorrência; (4) ocorrência frequente; e (6) ocorrência muito frequente. Valores intermediários também foram considerados. Ao multiplicar o fator de importância pelo escore, obtêm-se o índice da alteração. Para o cálculo do índice total de cada indivíduo, ou seja, o índice correspondente à avaliação das alterações histopatológicas em sua brânquia, foi utilizado o seguinte cálculo: $\text{Índice}_{\text{ind}} = \sum (\text{fator de importância} \times \text{escore})$. A partir dos índices individuais foram obtidos os valores de média e desvio padrão para cada grupo – controle e tratamentos – os quais foram avaliados estatisticamente por meio de ANOVA, com $p < 0,05$.

As principais alterações observadas neste estudo, nas brânquias de *O. Niloticus* e seus valores de importância estão na Tabela 1.

3. RESULTADOS

3.1 Análises físico-químicas da vinhaça

Pela análise química realizada, a vinhaça de cana-de-açúcar apresentou baixo pH, altos valores de DBO e DQO, bem como de potássio (3401 mg/L). Os valores obtidos para dureza e sulfato foram altos (Tabela 2). Em relação a presença de metais, observou-se a presença de cobre na concentração de 0,76 mg/L, abaixo da máxima permitida pela CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) que é de 2,0 mg/L e a presença de cromo na concentração de 3,56 mg/L, sendo que a máxima permitida pela CETESB é de 0,05 mg/L (Tabela 2).

3.2 Observação dos bioensaios

Durante a execução do primeiro bioensaio, todos os indivíduos da diluição de 10% de vinhaça morreram; no segundo bioensaio a mortalidade dos peixes foi maior, 60% dos indivíduos expostos à diluição de 5% de vinhaça e 100% dos peixes expostos à diluição de 10% morreram.

3.3 Ultramorfologia

As células pavimentosas constituem grande parte da superfície branquial (Figura 1A), sendo sua superfície com aparência semelhante à impressões digitais, devido a disposição circular de suas cristas (Figura 1B). Os resultados obtidos por meio da MEV,

no primeiro bioensaio, não indicaram diferenças entre as brânquias do grupo controle e as dos tratamentos; tanto no controle quanto nos tratamentos, as células pavimentosas se apresentaram com poucas cristas (Tabela 3).

No segundo bioensaio, houve uma redução no número das cristas das células pavimentosas (Figuras 1C, D) para todos os tratamentos em relação ao grupo controle, porém não houve diferença entre os grupos expostos à diluições de vinhaça (Tabela 3). Foi observado também um entumescimento das células pavimentosas nos tratamentos, assim como um aumento no número de células clorídricas na diluição de 2,5% (Tabela 4).

3.4 Análise histológica

O grupo controle apresentou o padrão branquial descrito por Fanta et al. (2002) para peixes teleósteos (Figura 2A). Os animais apresentaram arcos branquiais formados por filamentos primários (lamelas primárias), tendo em cada filamento primário, lamelas respiratórias (lamelas secundárias) alinhadas ao longo de seus dois lados. Os filamentos primários são cobertos por epitélio pavimentoso estratificado e possuem espaços de sangue limitados por células pilares, separada do epitélio por uma grossa membrana basal.

Foram observadas alterações histológicas nos animais expostos a todas as diluições testadas. No primeiro bioensaio, as alterações mais observadas foram desprendimento epitelial (Figura 2B), perda da integridade epitelial (desorganização epitelial), levando a ruptura da mesma, desenvolvendo assim um quadro de hemorragia (Figuras 2C, D). O fator de importância dessas alterações é 1 (Tabela 2). Essas alterações foram mais frequentes com o aumento da quantidade de vinhaça diluída no meio aquático. As análises histológicas revelaram valores significativos para o desprendimento epitelial para todas as diluições de vinhaça testadas, com $p < 0,05$. Para a desorganização epitelial, os valores foram significativos apenas na diluição de 5%, com $p < 0,01$. Para os focos de hemorragia, os valores foram significativos para todas as diluições, assim como no desprendimento epitelial, porém com $p < 0,01$.

No segundo bioensaio, o desprendimento epitelial não foi tão evidente como observado no primeiro, entretanto a desorganização epitelial foi maior e aumentou de forma dose-dependente, sendo significativa na diluição de vinhaça 2,5%. Focos de hemorragia foram observados em todos os tratamentos. A comparação dos resultados de ambos os bioensaios estão sintetizados na tabela 3.

3.5 Análise histoquímica

Com a análise das células mucosas evidenciadas pelo PAS (Figura 3) pode-se verificar que o número dessas células aumentou nos grupos expostos (Figura 3B, C, D, E). Os valores foram significativos para todas as diluições em relação ao controle, em ambos os bioensaios, pelo método estatístico ANOVA, com $p < 0,05$. A diluição de 1% de vinhaça foi a que apresentou o maior número de células mucosas, seguidos da concentração 2,5 e 5%, nos dois bioensaios. Porém, o método estatístico de Tukey revelou que não há uma diferença significativa entre os tratamentos, havendo diferença significativa apenas em relação ao controle (Tabela 4).

4. DISCUSSÃO

O presente estudo objetivou analisar as possíveis alterações histopatológicas nas brânquias de tilápias após exposição a diferentes diluições de vinhaça de cana-de-açúcar. Dado o grande volume produzido, o uso da vinhaça na fertirrigação é uma alternativa para o descarte desse resíduo, porém as grandes quantidades dispostas em campo podem sofrer lixiviação ou percolar nos perfis de solo e acabar contaminando os recursos hídricos.

Em ambos os bioensaios, a diluição de 10% de vinhaça foi letal para os peixes; no segundo bioensaio a letalidade foi maior, uma vez que 60% dos indivíduos da diluição de 5% de vinhaça também morreram. Provavelmente a alta carga orgânica do efluente e sua elevada DBO e DQO, de forma a esgotar o oxigênio na água foi o responsável pela mortalidade dos peixes. Parâmetros como a grande quantidade de potássio e o baixo pH das amostras podem ter contribuído também para os efeitos tóxicos da vinhaça de cana-de-açúcar, uma vez que a influência do pH em um ecossistema pode se dar tanto de modo direto, com efeitos sobre a fisiologia das espécies, como de modo indireto, podendo em determinadas condições contribuir para a precipitação de elementos químicos tóxicos, como metais traço (CETESB, 2013). Vale lembrar que a vinhaça pode apresentar valores de metais traço muito abaixo daqueles detectáveis pelo método analítico empregado (CAMILOTTI et al., 2007). Dessa forma, não é possível mensurar os prováveis danos de todos os elementos, embora possam trazer inúmeras lesões aos peixes caso estejam presentes (ALVARADO et al., 2006; RANDI et al., 1996; SREEDEVI et al., 1992). Segundo Robertiello (1982) a

composição da vinhaça varia em função da planta de cada destilaria para produção de etanol e no próprio processo de destilação.

A amostra de vinhaça bruta utilizada no primeiro bioensaio apresentou concentração de cromo mais alta do que a permitida pela CETESB para corpos hídricos, imaginando que esse metal fosse diluído na mesma proporção que a vinhaça, sua concentração nas diluições de 2,5%, 5% e 10% ainda seria superior ao permitido.

O tecido branquial dos peixes apresenta dois tipos de resposta celular, a de defesa e a compensatória (MALLAT, 1985; TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). Ambas as respostas ajudam a barrar a entrada de substâncias tóxicas, impedindo que essas substâncias alcancem a corrente sanguínea e, em menor proporção, auxiliam na prevenção dos danos causados pela exposição direta (CERQUEIRA; FERNANDES, 2002).

O desprendimento epitelial observado nas brânquias dos peixes submetidos à vinhaça, principalmente no primeiro bioensaio é uma resposta inicial do aparelho branquial caracterizada pelo aumento das funções das células e dos tecidos, provocado pela alteração das atividades fisiológicas destes (SMART, 1976). São mecanismos típicos de defesa das brânquias que promovem o aumento da barreira água-sangue; esta perda da superfície respiratória pode resultar em morte por anóxia (RAND; PETROCELLI, 1985); é uma alteração regressiva, cuja finalidade é reduzir funcionalmente o órgão atingido, e desta forma, diminuir a contaminação do animal pela substância tóxica (BERNET et al., 1999).

A hemorragia observada em todas as concentrações de vinhaça, é classificada como distúrbio circulatório (BERNET et al., 1999). Aparentemente, as células pavimentosas perdem aderência uma com as outras, resultando numa ruptura do tecido, causando a hemorragia, fazendo com que o órgão atingido perca a sua funcionalidade, diminuindo desta forma, a contaminação pelo agente tóxico.

Tan e Lim (1984) relataram que o aumento das células mucosas é o primeiro sintoma visível de toxicidade em *Perna viridis*, exposto ao chumbo. Segundo Takashina e Hibiya (1995), a hipersecreção pode ser o resultado de uma resposta crônica contra infecções parasitárias ou bacterianas ou contra produtos químicos irritantes. O muco é normalmente encontrado nos filamentos, mas pode ser encontrado no epitélio respiratório de peixes expostos a condições de estresse, o que pode sugerir que a camada formada pela produção de muco protege as superfícies lamelares contra os agentes tóxicos, infecciosos e partículas em suspensão (MALLAT, 1985). Devido à

função de proteção do tecido que o muco apresenta (BERNET et al., 1999), o aumento de células mucosas é um indicativo de presença de substâncias tóxicas na água (DAVID; FONTANETTI, 2009; BIAGINI et al., 2009), e, como apresentado nos resultados, o aumento foi observado em todos os tratamentos, sendo significativo em relação ao controle pelo método ANOVA, indicando que a vinhaça se apresenta tóxica nas três diluições utilizadas neste estudo.

As células pavimentosas da brânquia constituem a maior parte da superfície branquial; são caracterizadas por apresentarem cristas em suas superfícies, as quais, segundo Mallat (1985), são importantes na retenção de muco no epitélio branquial, como uma forma de proteção contra alterações ambientais. Desta forma, uma redução dessas cristas, como foi observada neste estudo, no segundo bioensaio realizado, indica a resposta do órgão afetado em relação ao contaminante, sendo essa uma resposta do tipo regressiva, segundo Bernet et al. (1999). Wong e Wong (1999) observaram redução das cristas nas brânquias de *O. mossambicus* submetidas a diferentes concentrações de cádmio. Biagini et al. (2009), também observaram uma redução nas cristas das células pavimentosas em tilápias criadas em água poluídas tratadas por flotação.

Em suma, a vinhaça de cana-de-açúcar, possui poder poluente 100 vezes maior do que o esgoto doméstico (SILVA et al., 2007), sendo largamente reaproveitada em plantações canavieiras para fertirrigação; contudo, através do processo de lixiviação e percolação, este efluente pode atingir os cursos d'água e contaminá-los com seus componentes; por isso é de extrema importância que o potencial tóxico da vinhaça seja levado em consideração.

5. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos por meio da análise histopatológica das brânquias de peixes da espécie *O. niloticus*, expostos a quatro diferentes diluições de vinhaça de cana-de-açúcar, pode-se concluir que esse resíduo apresentou potencial tóxico e citotóxico em meio aquático. Isto foi demonstrado pelas taxas de mortalidade nas maiores diluições, pelas alterações na morfologia do tecido branquial e o aumento significativo de células mucosas para todas as diluições de vinhaça. Dessa forma, a reutilização deste efluente na prática de fertirrigação deve ser avaliada com cautela, uma vez que ao atingir o meio aquático, seu efeito na fauna pode ser extremamente nocivo. Portanto, a disposição desse resíduo em campo deveria ser feito com mais cautela

podendo receber um tratamento prévio antes de ser lançado nas culturas como fertilizante.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processos 2011/0679-8 e 2012/50197-2) pelo suporte financeiro, a Gerson Mello Souza, Antonio Teruyoshi Yabuki, Pablo Henrique Nunes pelo apoio técnico e Nilton Righetto Neto pela ajuda durante os experimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALGUR, O.F.; KADIOGLU, A.; The effects of vinasse on the growth, biomass and primary productivity in pea (*Pisum sativum*) and sunflower (*Helianthus annuus*). **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.39, p.139-144, 1992.
- ALVARADO, N.E.; QUESADA, I.; HYLLAND, K.; MARIGÓMEZ, I.; SOTO, M. Quantitative changes in metallothionein expression in target cell-types in the gills of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu, Zn and after a depuration treatment. **Aquatic Toxicology**, v.77, p.64–77, 2006.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D.; Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.323, p.121-135, 1995.
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of fish diseases**, v.22, p.25-34, 1999.
- BIAGINI, F.R.; DAVID, J.A.O.; FONTANETTI, C.S. The use of histological, histochemical and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted waters. **Micron**, v.40, p.839-844, 2009.
- CAMILOTTI, F.; MARQUES, M.O.; ANDRIOLI, I.; SILVA, A.R.; JUNIOR, L.C.T.; NOBILE, F.O. Acúmulo de metais pesados em cana-de-açúcar mediante a aplicação de lodo de esgoto e vinhaça. **Engenharia Agrícola**, v.27, n.1, p.284-293, 2007.
- CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 52, n. 2, p. 83-91, 2002.
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Variáveis de qualidade das águas. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp#cobre>. Acessado em: 20/01/2013.
- CHRISTOFOLETTI, C.A.; PEDRO-ESCHER, J; CORREIA, J.E.; MARINHO, J.F.U.; FONTANETTI, C.S. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, vol. 33, p.2752-2761, 2013.

CORTEZ, L.; MAGALHÃES, P.; HAPPI, J. Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização. **Revista Brasileira de Energia**, v.2, n.2, p.111-146, 1992.

DAVID, J.A.O.; FONTANETTI, C.S. The role of mucus in *Mytella falcata* (Orbigny, 1842) gills from polluted environments. **Water, Air and Soil Pollution**, v.203, p.261-266, 2009.

ESPAÑA-GAMBOA, E., MIJANGOS-CORTES, J., BARAHONA-PEREZ L., DOMINGUEZ-MALDONADO, J., HERNÁNDEZ-ZARATE, G., ALZATEGAVIRIA, L. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Manag Res.**, v.29, p.1235-1250, 2011.

EVANS, D. H. The fish gill: Site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. **Environmental Health Perspect**, v.71, p.47-58, 1987.

FANTA, E.; RIOS, F.S.; ROMÃO, S.; VIANNA, A.C.C.; FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, p. 119-130, 2002.

FONTANETTI, C.S.; SOUZA, T. S.; CHRISTOFOLETTI, C. A. . The role of biomonitoring in the quality assessment of water resources. In: Bilibio, C.; Hensel, O.; Selbach, J. (Org.). **Sustainable water management in the tropics and subtropics - and cases study in Brazil**. 1ªed.Brasil/Alemanha: UNIPAMPA/UNIKASSEL, 2012, v. 3, p. 975-1005.

HARSHBARGER, J. C.; CLARK, J., B. Epizootiology of neoplasms in bony fish of North-America. **Science of the Total Environment**, v. 94, n. 1-2, p. 1-32, 1990.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983, 123p.

KARNOVSKY, M.J.; A formaldehyde-glutaraldehyde fixative at high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal Cell Biology**, v.11, p.137-140, 1965.

KIKUCHI, M.; WAKABAYASHI, M.; KOJIMA, H.; YOSHIDA, T. Uptake, distribution and elimination of sodium linear alkylbenzene sulfonate and sodium alkyl sulfate in carp. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v.2, p.115-127, 1978.

KUMAR, S.; GOPAL, K. Impact of Distillery Effluent on Physiological Consequences in the Freshwater Teleost *Channa punctatus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.66, p.617-622, 2001.

LAURENT, P.; PERRY, S.F. Effect of cortisol on gill chlorid cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. **Cell and Tissue Research**, v.259, p.429-442, 1990.

MACHADO, M.R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. **Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 1, n. 1, p. 63-76, 1999.

MALLAT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. **Canadian journal of fisheries and aquatic sciences**, v.42, p.630-648, 1985.

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

MCKIM, J. M.; ERICKSON, R. J. Environmental Impacts on the physiological mechanisms controlling xenobiotic transfer across fish gills. **Physiological Zoology**, v. 64, n. 1, p. 39-67, 1991.

ODUM, E.P. Breve descrição dos principais tipos de ecossistema natural na biosfera. **In: Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.367-369, 1988.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. New York: Ed. Washington, Mcgraw Hill, 1985. 666 p.

RANDI, A.S.; MONSERRAT, J.M.; RODRIGUEZ, E.M.; ROMANO, L.A. Histopathological effects of cadmium on the gills of the freshwater fish, *Macropsobrycon uruguayanae* Eigenmann (Pisces, Atherinidae). **Journal of Fish Diseases**, v.19, p.311-322, 1996.

SREEDEVI, P.; SIRAVAMAKRISHNA, B.; SURESH, A.; RADHAKRISHNAIAH, F. Effects of nickel on some aspects of protein metabolism in the gill and kidney of the freshwater fish *Cyprinus carpio*. **Environmental Pollution**, v.77, p.59-63, 1992.

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

ROBERTIELLO, A. Upgrading of agricultural and agroindustrial wastes: the treatment of distillery effluents (vinasses) in Italy. **Agricultural Wastes**, v.4, p.387-395, 1982.

SILVA, M.A.S.; GRIEBELER, N.P.; BORGES, L.C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.11, n.11, p.108-114, 2007.

SMART, G. The effect of ammonia exposure on gill structure of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of Fish Biology**, v. 8, p. 471-475, 1976.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. 2. ed. Tokyo: Kodanska / Stuttgart: Fischer Verlag. 195p, 1995.

TAN, W.H., LIM, L.H. The tolerance to and uptake of lead in the green mussel, *Perna viridis*. **Aquaculture**, v.42, p.317–332, 1984.

UNICA – União da Indústria da cana-de-açúcar do estado de São Paulo. **Produção de álcool do Brasil**. UNICA, 2007. Disponível em: <<http://www.portalunica.com.br/portalunica/index.php?Secao=referência&SubSecao=estatísticas&SubSacao=produção20Brasil&id=%20and%id=9>>. Acesso em: 10/06/12.

VEGA, M.M.; FERNANDEZ, T.B.; TARAZONA, J.V.; CASTAÑO, A. Biological and chemical tools in the toxicological risk assessment of Jarama River, Madrid, Spain. **Environmental Pollution**, v.92, n.2, p.135-139, 1996.

WALISZEWSKI, K.N.; ROMERO, A.; PARDIO, V.T. Use of cane condensed molasses solubles in feeding broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v.67, p.253–258, 1997.

WENDELAAR BONGA, S. E.; LOCK, R. A. C. Toxicants and osmoregulation in fish. **Netherlands Journal of Zoology**, v. 42, n. 2-3, p. 478-493, 1991.

WILKIE, A., RIEDESEL, K., OWENS, J. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, v.19, p.63–102, 2000.

WONG, C. K.; WONG, M. Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 48, n. 4, p. 517-527, 2000.

YESILADA, E. Genotoxic activity of vinasse and its effect on fecundity and longevity of *Drosophila melanogaster*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.63, p.560-566, 1999.

Tabela 1 Principais alterações encontradas em brânquias de *O. niloticus* expostos à vinhaça e seus respectivos fatores de importância

Características Analisadas	Fator de importância (<i>w</i>)
Desprendimento epitelial	1
Desorganização lamelar	1
Hemorragia	1
Perda das cristas	1
Entumecimento das células pavimentosas	1

Tabela 2 – Análises físico-químicas da amostra de vinhaça utilizada

Parâmetro	Coleta 2011	Método
Amônia (mg/L)	<LQ	USEPA 440/5-85-001
Cálcio (mg/L)	671	SM21 3120 B
Condutividade Elétrica (µs/cm)	15110	SM21 2510 B
DBO (mg/L)	7941	SM21 5210 B
DQO (mg/L)	25225	SM21 5220 D
Dureza (mg CaCO₃/L)	276	SM21 2340 B
Fosfato total (mg/L)	-	SM21 4500-P C
Magnésio (mg/L)	264	SM21 3120 B
Nitrato (mg/L)	1,49	SM21 4500- NO ₃ F
Nitrito (mg/L)	0,033	SM21 4500- NO ₂ B
pH	4,37	SM21 4500- H ⁺ B
Potássio (mg/L)	3401	SM21 3120 B
Resíduo não-filtrável (mg/L)	1800	SM21 2540 D
Sódio (mg/L)	114	SM21 3120 B
Sulfato (mg/L)	2993	SM21 4500- SO ₄ ⁻² E
Arsênio	<LQ	SM21 3120B
Bário	<LQ	SM21 3120B
Cádmio	<LQ	SM21 3120B
Cálcio Total	671	SM21 3120B
Carbono Orgânico	-	SSSA Cap40
Chumbo	<LQ	SM21 3120B
Cobre	0,76	SM21 3120B
Condutividade Elétrica (µs/cm)	15110	SM21 3120B
Cromo	3,56	SM21 3120B
Enxofre Total	1681	SM21 3120B
Fósforo Total	207	SM21 3120B
Magnésio Total	264	SM21 3120B
Mercúrio	<LQ	EPA 7470 ^a
Molibdênio	<LQ	SM21 3120B
Níquel	<LQ	SM21 3120B
Nitrato	1,49	SM21 4500-NO ₃ E
Nitrito	0,03	SM21 4500-NO ₂ B
Nitrogênio Amoniacal	-	SM21 4500-NH ₃ E
Nitrogênio Kjeldahl	171	SM21 4500-Norg B
Potássio Total	3401	SM21 3120B
Selênio	<LQ	SM21 3120B
Sódio Total	114	SM21 3120B
Sólidos Totais	-	SM21 2540B
Sólidos Totais Voláteis	-	SM21 2540B
Teor de sólidos	-	SM21 2540B
Umidade	-	SM21 2540B
Zinco	<LQ	SM21 3120B

LQ: Limite de quantificação

Tabela 3: Frequência de ocorrência de alterações significativas encontradas nas brânquias em *O. niloticus* expostos à vinhaça

Alterações	1° Bioensaio				2° Bioensaio			
	CN	V1%	V2,5%	5%	CN	V1%	V2,5%	V5%
Desprendimento epitelial	0,80±0,97	3,20±2,03	3,60±1,49	4,00±1,26*	0,80±1,60	0	0,20±0,40	0
Desorganização lamelar	1,20±0,97	0,80±0,97	2,40±0,8	5,20±0,97**	1,00±1,26	2,40±0,48	3,60±0,80*	4,00
Hemorragia	0	3,20±0,97**	2,00**	2,00**	0,40±0,48	0,20±0,40	2,00±2,09	0
Perda das cristas	5,00±0,70	5,00±0,70	4,80±0,44	4,40±1,14	1,40±1,14	4,20±0,44**	3,40±1,34*	4,00
Entumescimento	1,40±0,54	1,80±0,83	1,20±0,83	4,60±0,54**	1,40±1,14	2,40±1,51	3,80±0,44*	3,50±0,70

Dados apresentados como média ± desvio padrão. CN: Controle negativo; V1%: Vinhaça 1%; V2,5%: Vinhaça 2,5%. V5%: Vinhaça 5%

*: Valor significativo para $p < 0,05$ pelo teste ANOVA em relação ao controle negativo.

**: Valor significativo para $p < 0,01$ pelo teste ANOVA em relação ao controle negativo.

Tabela 4. Média (M) e desvio padrão (DP) de células mucosas e células clorídricas quantificadas entre as lamelas secundárias de *O. niloticus* do grupo controle e expostos às diferentes concentrações de vinhaça.

Tratamento	1º Bioensaio				2º Bioensaio			
	Controle	V 1%	V 2,5%	V 5%	Controle	V 1%	V 2,5%	V 5%
Células Mucosas	392,4±64,04	524,6±34,83*	505,4±30,12*	494,2±30,10*	305,6±64,04	477±74,61*	470,8±55,64*	187±256,74
Células clorídricas	12,00±2,91	13,20±3,96	13,20±1,92	15,80±3,42	9,00±1,58	13,40±2,07**	19,20±1,48**	14,50±0,70

Dados apresentados como valores máximos, mínimos, média e desvio padrão, frequência e células mucosas totais. **CN:** Controle negativo; **V1%:** Vinhaça 1%; **V2,5%:** Vinhaça 2,5%; **V5%:** Vinhaça 5%

*: Valor significativo para $p < 0,05$ pelo teste ANOVA em relação ao controle.

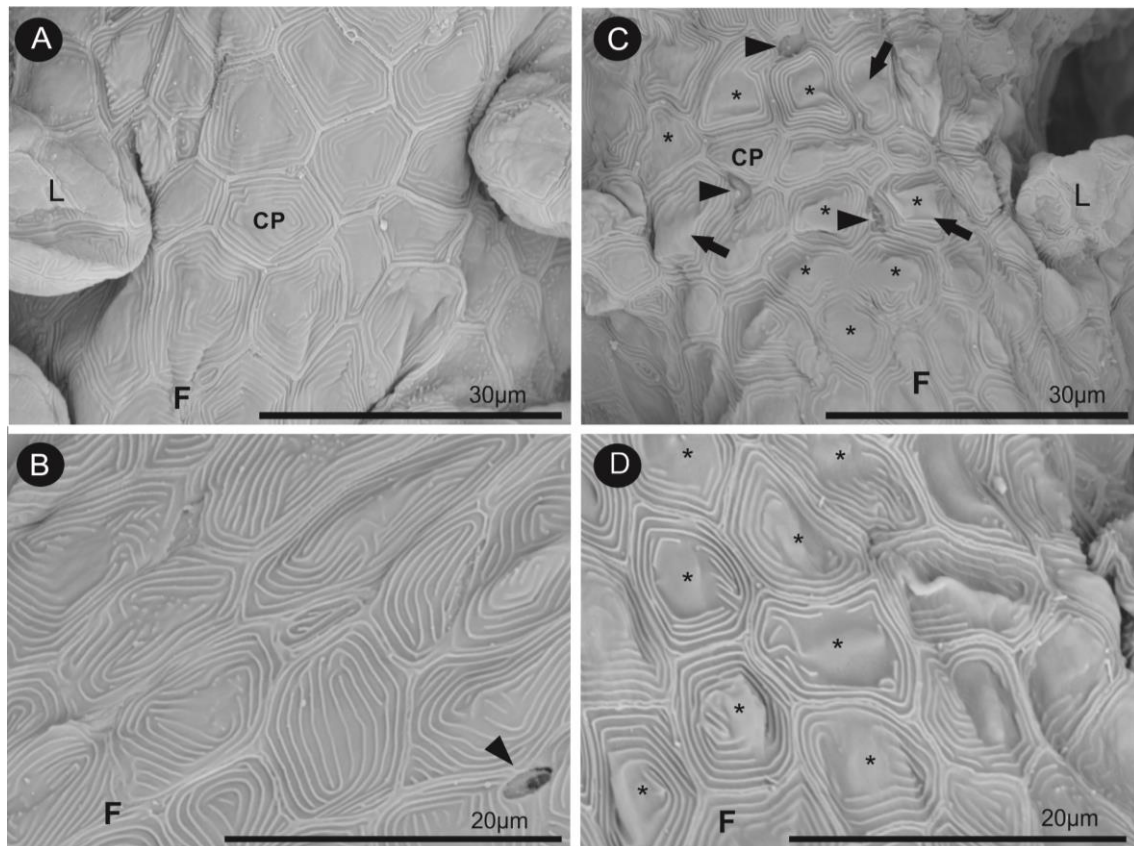


Figura 1: Micrografias eletrônicas de varredura de brânquias de *O. niloticus*. A e B: Grupo controle; C e D: Grupos expostos à vinhaça; F: filamento primário; L: lamela secundária; CP: célula pavimentosa; *: células pavimentosas com perda de cristas; cabeça de seta: células clorídricas; seta: entumescimento das células pavimentosas.

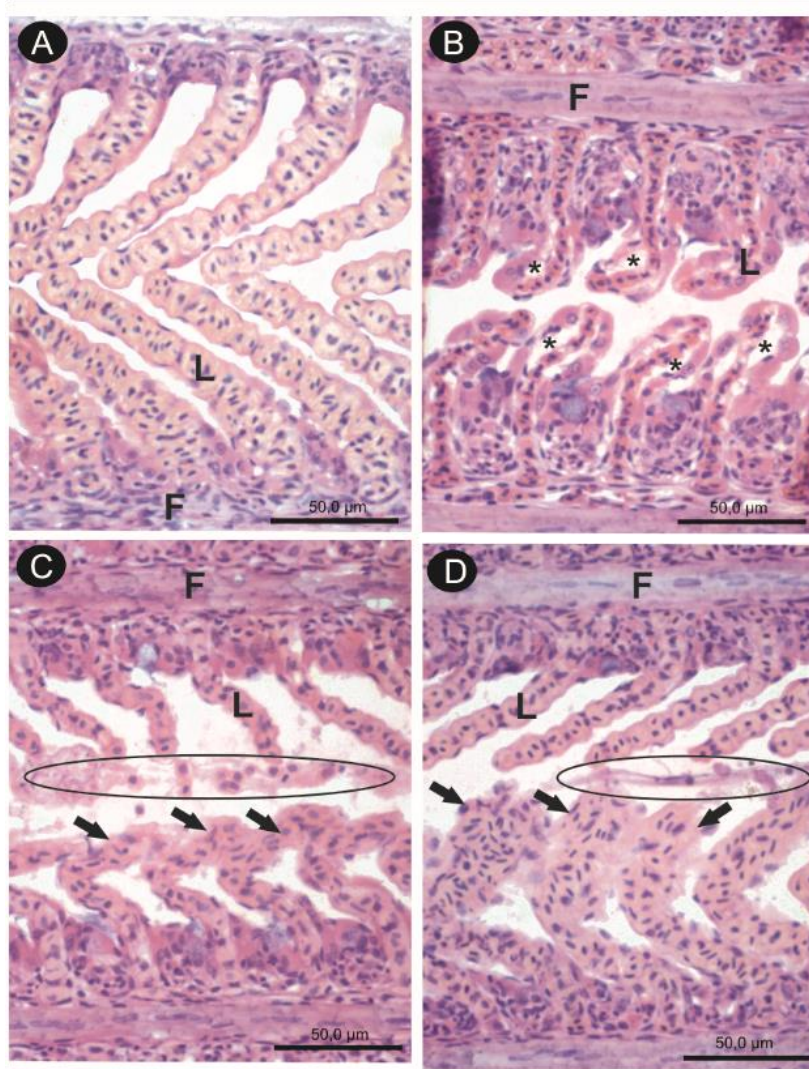


Figura 2. Alterações histológicas observadas em maior frequência em *O. niloticus*. A. Controle; B, C, D: Grupos expostos. F: Filamento primário; L: Lamela secundária; (*) desprendimento epitelial; (setas) desorganização lamelar e perda da integridade das lamelas; (círculo) hemorragia.

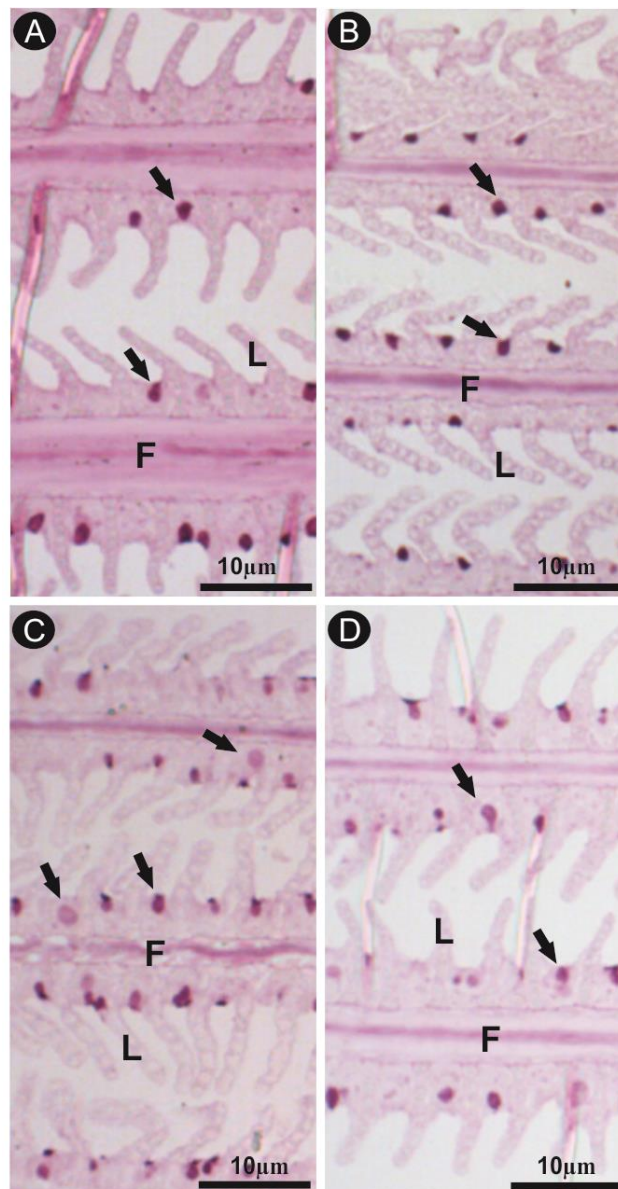


Figura 3: Secções histológicas de brânquias de *O. niloticus* submetidas a técnica de PAS. A: Grupo controle; B: diluição de 1% de vinhaça; C: diluição de 2,5% de vinhaça; D: diluição de 5% de vinhaça. F: filamento primário; L: lamela secundária; Setas: célula mucosa