

RESSALVA

Atendendo solicitação da
autora, o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 16/01/2021.



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

**UTILIZAÇÃO DE UM SISTEMA HÍBRIDO DE TRATAMENTO PARA
BIORREMEDIAÇÃO DA VINHAÇA E AVALIAÇÃO DA SUA TOXICIDADE POR
MEIO DE ANÁLISES HISTOLÓGICAS E MOLECULARES**

ANA CLAUDIA DE CASTRO MARCATO

Março - 2019

ANA CLAUDIA DE CASTRO MARCATO

**UTILIZAÇÃO DE UM SISTEMA HÍBRIDO DE TRATAMENTO PARA
BIORREMEDIAÇÃO DA VINHAÇA E AVALIAÇÃO DA SUA TOXICIDADE
POR MEIO DE ANÁLISES HISTOLÓGICAS E MOLECULARES**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

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

Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Karen Cristiane Martinez de Moraes

Rio Claro - SP

2019

M313u Marcato, Ana Claudia de Castro
Utilização de um Sistema Híbrido de Tratamento para
biorremediação da vinhaça e avaliação da sua toxicidade
por meio de análises histológicas e moleculares / Ana
Claudia de Castro Marcato. -- Rio Claro, 2019
126 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti
Coorientadora: Karen Cristiane Martinez de Moraes

1. Fitorremediação. 2. Aguapé. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: UTILIZAÇÃO DO SISTEMA CONSTRUÍDO DE ÁREAS ALAGADAS (CWS) NO TRATAMENTO DA VINHAÇA E AVALIAÇÃO DA SUA TOXICIDADE POR MEIO DE ANÁLISES HISTOLÓGICAS E MOLECULARES

AUTORA: ANA CLAUDIA DE CASTRO MARCATO

ORIENTADORA: CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

COORIENTADORA: KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI
Departamento de Biologia / IB Rio Claro



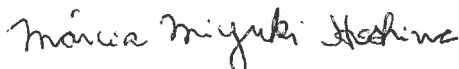
Prof. Dr. RAPHAEL BASTÃO DE SOUZA
x / Pós-Doutorando da UNICAMP



Prof. Dr. AMAURI ANTONIO MENEGARIO
CEA / UNESP



Profa. Dra. CINTYA APARECIDA CHRISTOFOLETTI DE FIGUEIREDO
x / Fundação Hermínio Ometto, UNIARARAS



Profa. Dra. MARCIA MIYUKI HOSHINA
x / x

Rio Claro, 16 de janeiro de 2019

Titulo alterado para: Utilização de um sistema híbrido de tratamento para biorremediação da vinhaça e avaliação da sua toxicidade por meio de análises histológicas e moleculares.

*Para a minha família,
que sempre estiveram
ao meu lado.
A eles, por serem a base de tudo.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por toda as oportunidades que tive durante toda a minha vida.

À minha família, por serem minha base e, mesmo não concordando ou acreditando, me apoiam em todas as decisões.

Agradeço aos amigos que a APG, Primeiros Passos na Ciência, BioCelMol, Junção GAP me permitiu conhecer.

Agradeço às minhas amigas, Clara, Naiara, Larissa, Pamela, Lívia, Manuela, Adna, Annelise, Mayara, Amanda, Natália, Alisson por todos os momentos, alegrias e choros, compartilhados.

Agradeço a todos amigos do CBI 2007 por ainda estarem presente na minha vida.

Agradeço a todos os fofotes, Luiza, Cintya, Raphael, Annelise, Júlia, Jorge, Cristina, Vinícius, Yadira, Cleiton e Thays, por terem sido o melhor grupo de pesquisa deste mundo, vocês são essenciais.

Agradeço os técnicos pela paciência e compreensão nos momentos de trabalho e pela diversão nos momentos de lazer, Gerson, Monika e Antônio.

Agradeço as agências de fomento, CAPES e FAPESP pelo financiamento do projeto. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos nº 2014/23919-2 e nº 2018/06971-1.

Por fim, agradeço à Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti, por ter sido mais do que orientadora, por ter sido amiga e inspiração. Por ter permitido que o meu desenvolvimento não fosse apenas acadêmico, mas pessoal. Obrigada pela amizade, pela dedicação, pelas broncas e pelo carinho.

*“Combati o bom combate, terminei a corrida, guardei a fé.”
2 Timóteo 4:7*

RESUMO

Na tentativa de reduzir o uso de combustíveis fósseis, por razões econômicas, geopolíticas e ambientais, o etanol é apresentado como uma das principais alternativas de energia. A vinhaça é um dos subprodutos da produção de álcool a partir da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) e, devido à sua abundância em matéria orgânica, tem sido utilizada como fertilizante no solo, apresentando bons resultados ao longo dos anos, pois promove melhoria na fertilidade do solo. Porém, esta substância apresenta significativo poder poluente devido à sua alta concentração de matéria orgânica, e pode alcançar recursos hídricos por meio da percolação, atingindo as águas subterrâneas, e/ou escoamento, atingindo as águas superficiais. O uso de sistemas de tratamento, tais como estabilização, filtração e fitorremediação, para tratar efluentes de diferentes fontes tornou-se particularmente interessante, uma vez que são sistemas biogeoquímicos altamente eficazes para reduzir o impacto da poluição das águas residuais. Diante disto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema híbrido de tratamento com a finalidade de biorremediar a vinhaça, alterando suas características físicas e químicas na tentativa de diminuir o impacto ambiental desse resíduo. Para verificar a eficácia do tratamento proposto, foram realizados testes físico-químicos da vinhaça antes e após o tratamento e testes com organismos bioindicadores para análise de sua toxicidade; para tanto foram empregados peixes e anfípodas. Para a análise da toxicidade da vinhaça biorremediada foram utilizados como biomarcadores a análise histopatológica de brânquia e fígado (histologia, histoquímica), a investigação de mecanismos moleculares (qPCR, HSP70, TBARS) que indicassem estresse celular em tilápias, e a análise do comportamento de natação de anfípodas. Os resultados obtidos por meio das análises físico-químicas demonstraram uma melhoria significativa na composição da vinhaça, além de comprovar a eficácia do uso do aguapé na fitorremediação. Estes resultados foram corroborados pelas análises de toxicidade, pois, os órgãos analisados dos peixes expostos a vinhaça biorremediada não apresentaram alterações significativas. A análise do comportamento de natação dos anfípodas indicou que apesar da vinhaça ter sido submetida ao tratamento, ela manteve a capacidade de perturbar o ambiente aquático, porém, ao ser comparada com a vinhaça sem tratamento, *in natura*, observou-se uma redução desta toxicidade. Assim, podemos concluir que o método de tratamento proposto foi eficiente na diminuição do potencial poluente da vinhaça, tornando a utilização deste resíduo mais segura.

Palavras-chave: fitorremediação, aguapé, toxicidade aquática, histopatologia, estresse oxidativo, análise comportamental.

ABSTRACT

In an attempt to reduce the use of fossil fuels, for economic, geopolitical and environmental reasons, ethanol is presented as one of the main energy alternatives. Vinasse is one of the subproducts of alcohol production from sugarcane (*Saccharum* sp.) and due to its abundance in organic matter it has been used as fertilizer in the soil presenting good results over the years, since it promotes improvement in soil fertility by means of availability of some elements for plants. However, this substance presents significant pollutant power due to its high concentration of organic matter and it can reach water resources through percolation, reaching groundwater, and/or runoff, reaching the surface waters. The use of treatment systems, such as stabilization, filtration and phytoremediation to treat wastewater from different sources has become particularly interesting since they are highly effective biogeochemical systems to reduce the impact of wastewater pollution. Therefore, the present study had as aim to develop a hybrid treatment system with the purpose of bioremediating vinasse, changing its physical and chemical characteristics as an attempt to reduce the environmental impact of this residue. To verify the efficacy of the proposed treatment, physicochemical tests of the vinasse were carried out before and after treatment and also tests with bioindicators to analyze their toxicity were applied. In order to analyze the toxicity of bioremediated vinasse, the histopathology of gill and liver, investigation of molecular mechanisms (qPCR, HSP70, TBARS) that indicate cell stress in tilapias and the analysis of amphipods swimming behavior were used as biomarkers. The results obtained through the physicochemical analyzes showed a significant improvement in the composition of the vinasse, besides prove the efficiency of water hyacinth into phytoremediation. These results were corroborated by toxicity analyzes, since the analyzed organs of the fish exposed to bioremediate vinasse did not show significant alterations. In addition, the analyzes of amphipods swimming behavior indicated that although the vinasse was submitted to a hybrid treatment system, it maintained the capacity to disturb the aquatic environment, however, when compared to raw vinasse, *in natura*, it was observed toxicity. Thus, we can conclude that the proposed treatment method was efficient in reducing the pollutant potential of vinasse, making the use of this residue safer.

Keywords: phytoremediation, water hyacinth, aquatic toxicity, histopathology, oxidative stress, behavioral analysis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1. Vinhaça.....	13
2.2. Sistema Híbrido de Tratamento.....	16
2.3. Peixes como bioindicador e seus biomarcadores.....	18
2.3.1. Análise da brânquia como biomarcador.....	20
2.3.2. Análise do fígado como biomarcador.....	21
2.3.3. Estresse oxidativo como biomarcador.....	22
2.4. Anfípodos como bioindicadores e análise comportamental como biomarcador....	26
3. OBJETIVOS.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1. Vinhaça.....	29
4.2. Materiais biológicos.....	29
4.3. Sistema Híbrido de Tratamento.....	30
4.4. Análise físico-química da vinhaça.....	30
4.5. Coleta e avaliação das macrófitas aquáticas.....	31
4.6. Análise físico-química da água e diluições dos biensaos.....	31
4.7. Bioensaio para avaliação da toxicidade da vinhaça nos peixes.....	32
4.7.1. Coleta dos materiais.....	32
4.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das brânquias.....	32
4.9. Histologia.....	33
4.10. Histoquímica.....	33
4.10.1. Polissacarídeos.....	33
4.10.2. Proteínas Totais.....	33
4.10.3. Lipídios.....	33
4.11. Análises moleculares para detecção de estresse oxidativo.....	34
4.11.1. Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real (qPCR).....	34
4.11.2. Determinação de Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	34
4.12. Teste de comportamento animal.....	35
4.13. Análise Estatística dos Resultados.....	35
4.13.1. Análise estatística das diferentes amostras do sistema híbrido de tratamento.....	35
4.13.2. Análise estatística das alterações histopatológicas em peixes.....	35
4.13.3. Análise estatística dos ensaios bioquímicos e moleculares.....	37
4.13.4. Análise estatística do ensaio de comportamento animal.....	37
5. RESULTADOS.....	38
5.1. Artigo 1.....	39
5.2. Artigo 2.....	46
5.3. Artigo 3.....	65
5.4. Artigo 4.....	90
6. CONCLUSÃO.....	109
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	1106
Figura 1.....	124
Figura 2.....	125
Figura 3.....	126

1. INTRODUÇÃO

Com a finalidade de diminuir o uso de combustíveis fósseis, o etanol se apresenta como uma das principais fontes alternativas de energia (FUESS; GARCIA, 2014). O etanol pode ser produzido a partir de diferentes matérias-primas e em diferentes condições climáticas (BNDES; CGEE, 2008), o que o torna atrativo. Além disso, a produção e o uso do etanol ainda resultam em alguns benefícios ambientais, uma vez que, possui caráter renovável por ser produzido a partir de uma fonte biológica (HILL et al., 2006), e colabora no sequestro de carbono pelas lavouras (BNDES; CGEE, 2008; MACEDO et al., 2008; KHATIWADA; SILVEIRA, 2011). Apesar disso, a determinação do etanol como uma fonte de energia autossustentável também depende do gerenciamento adequado da vinhaça, que é o principal resíduo produzido pelas destilarias (FUESS; GARCIA, 2014).

Até a década de 80, por falta de uma legislação ambiental mais rigorosa, muitos resíduos eram destinados aos corpos d'água. Após esta década houve uma maior preocupação com o meio ambiente e valorização da biodiversidade, sendo proibido o lançamento deste resíduo nos rios, caracterizando a fase holística da legislação brasileira (FARIAS, 2009).

A vinhaça, popularmente conhecida por restilo, vinhoto ou garapão, é um dos principais resíduos da transformação da cana-de-açúcar em etanol. Geralmente é ácida (pH 3,5-5), com alto teor de matéria orgânica representada pela alta demanda química de oxigênio (DQO), de coloração castanho-escuro e odor desagradável (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011; HOARAU et al., 2018). Em média, para cada litro de etanol produzido são gerados de 10 a 15 litros de vinhaça como resíduo (KUMAR; GOPAL, 2001; HOARAU et al., 2018).

Porém, a indústria de etanol é muito importante para a economia do país (NOCELLI et al., 2017; MORINI et al., 2017), sendo a monocultura da cana-de-açúcar uma das maiores no Brasil. Entre os anos de 2016 e 2017, a colheita foi estimada em 665,5 milhões de toneladas, representando um aumento de 4,9% em relação aos anos de 2015/2016 (CONAB, 2016). Do total de cana-de-açúcar produzido na safra de 2017/2018 no Brasil, foram produzidos 27,76 bilhões de litros de álcool (CONAB, 2018), gerando um total aproximado de 245 bilhões de litros de vinhaça.

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, elevado poder de corrosão e altos índices de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). Assim, a vinhaça é considerada altamente nociva à fauna, flora, microfauna e microflora das águas doces, além de afugentar a fauna marinha que vem às costas brasileiras para procriação (SILVA et al., 2007).

Atualmente, no Brasil, assim como em outros países, a vinhaça tem sido aplicada nas

lavouras como fertilizantes (MORAES et al., 2015). O que antes era problema ambiental passou a ser componente fundamental do sistema de custos de produção das indústrias sucroalcooleiras. Porém, essa utilização também merece atenção quanto a possíveis problemas de degradação e contaminação do solo e da água (FERREIRA, 2009). 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).

Segundo Maltby (1999), os estudos ecotoxicológicos avaliam o destino e os efeitos dos agentes tóxicos no meio ambiente, com o objetivo de entender como as substâncias afetam a estrutura e o funcionamento das populações, comunidades e ecossistemas. Ainda que o nível máximo de preocupação possa ser populações, comunidades ou ecossistemas, as substâncias químicas afetam organismos individuais e, as consequências do estresse podem ser manifestadas em todos os níveis da organização biológica, sendo os níveis mais baixos considerados preventivos.

Os efeitos tóxicos da vinhaça foram estudados por diversos autores. Yesilada (1999) mostrou que a taxa de fertilidade de fêmeas de drosófilas (*Drosophila melanogaster*) e de fecundidade dos ovos foram reduzidas consideravelmente com o aumento da concentração de vinhaça. Esse mesmo estudo mostrou que a vinhaça altera a longevidade dos indivíduos, sendo muito mais significativo em machos e na concentração de 50%.

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

Em estudos realizados com *Allium 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 à amostra. As autoras inferiram que, provavelmente, houve a liberação dos metais traço adsorvidos na matéria orgânica.

Christofolletti et al. (2013b) testaram a toxicidade em solo, da vinhaça de cana-de-açúcar, de um bio sólido e diferentes combinações de ambos, por meio do teste com *A. cepa*,

antes e depois do bioprocessamento destas amostras por diplópodos. Após o bioprocessamento, as autoras observaram uma redução na toxicidade de ambos os resíduos. Christofolletti et al. (2016) verificaram também a toxicidade da vinhaça em milípedes por meio da histopatologia do intestino médio. Pedro-Escher et al. (2014, 2016) também verificaram o potencial genotóxico da vinhaça *in natura* em solo utilizando dois vegetais, *Tradescantia pallida* e *A. cepa*.

Correia et al. (2017a) testaram os efeitos genotóxicos e mutagênicos de diluições de vinhaça de cana-de-açúcar em água, por meio da avaliação de ensaio do cometa e avaliação de eritrócitos portadores de anormalidades nucleares e micronúcleos (MN) em sangue periférico de tilápias (*O. niloticus*). O estudo demonstrou que a vinhaça apresentou potencial genotóxico e mutagênico. A toxicidade da vinhaça para peixes também foi verificada por meio da histopatologia de brânquias em estudo realizado por Correia et al. (2017b).

Segundo 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 processos físico-químicos normalmente envolvem reagentes para oxidar compostos orgânicos, enquanto que os tratamentos biológicos são classificados como técnicas aeróbicas ou anaeróbicas (BOTELHO et al., 2012).

Monteiro et al. (2011) avaliaram a redução da toxicidade da vinhaça tratada pelo fungo *Pleurotus sajor-caju* utilizando organismos aquáticos, *Pseudokirchneriella subcapitata* (microalga), *Daphnia magna* e *D. similis* (microcrustáceos) e *Hydra attenuata* (cnidário), 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. Botelho et al. (2012) avaliaram a redução da toxicidade da vinhaça por meio da correção do pH com hidróxido de sódio e utilizaram os microcrustáceos *Ceriodaphnia dubia* e *D. magna* como organismos-teste. Segundo estes autores, a CL50 testada após a correção do pH foi maior em todos os organismos, comprovando assim, a redução da toxicidade da vinhaça por meio deste tratamento. Correia et al. (2017a) também verificaram a diminuição do potencial genotóxico da vinhaça após correção do pH utilizando CaO.

Devido os efeitos tóxicos da vinhaça, muitas tecnologias vêm surgindo com o objetivo de reutilizá-la ou tratá-la para a redução de sua toxicidade (RODRIGUES REIS; HU, 2017; CHOWDHARY et al., 2018; HOARAU et al., 2018). Tratamentos que reduzem a DBO e a DQO são essenciais antes da eliminação deste resíduo no solo. Se disponibilizado na terra sem tratamento, pode reduzir a alcalinidade do solo e destruir as plantações (KUMAR; VISWANATHAN, 1991).

A vinhaça pode ser tratada de diversas maneiras, sendo elas: tratamento anaeróbio com produção de biogás, uso do sistema construído de áreas alagadas (Constructed Wetland System - CWS) isolado ou combinado à outros tratamentos, lagoa de estabilização, filtração e fitorremediação. O uso dos CWSs são econômicos em comparação com os métodos de tratamento convencionais e eficazes na redução das concentrações de DBO e DQO nos efluentes finais (CHOWDHARY et al., 2018). A lagoa de estabilização consiste em uma redução da toxicidade por meio do processo natural de estabilização da matéria orgânica, sem intervenção das características físicas (diluição, absorção e precipitação) (von SPERLING; CHERNICHARO, 2005). Devido ao alto valor de sólidos suspensos na vinhaça, a filtragem pode ser usada para impedir a passagem de partículas através do sistema e alcançar as águas subterrâneas. Macrófitas aquáticas podem reduzir significativamente os níveis de nitrato, potássio, nitrogênio, condutividade elétrica, cálcio, sódio, magnésio e fósforo, e acumular metais diretamente em seus tecidos; elas também atuam como catalisadores de reações de purificação que geralmente ocorrem na rizosfera de plantas (TILLEY et al., 2002; MULIDZI, 2010).

Os CWSs são sistemas biogeoquímicos altamente eficazes para tratar águas residuais provenientes de diferentes fontes, bem como setores domésticos, industriais e de mineração (KADLEC; KNIGHT, 1996; VYMAZAL et al., 1998; KADLEC et al., 2000). Do ponto de vista da remoção de poluentes, Kadlec e Knight (1996) relataram que estes sistemas apresentam capacidade de redução da DBO e remoção de organismos patogênicos, material em suspensão, nutrientes, metais e compostos orgânicos tóxicos.

Em virtude do potencial impacto que a vinhaça de cana-de-açúcar pode causar no meio ambiente, estudos que avaliem seus efeitos diretos nos organismos e que proponham possíveis tratamentos para esse efluente se fazem necessários e apresentam grande relevância, uma vez que esta substância é utilizada na fertirrigação da própria cultura da cana, sendo capaz de influenciar nas características físico-químicas do solo e chegar aos corpos hídricos por lixiviação/percolação.

Estudos de biomonitoramento ambiental, com diferentes organismos-teste, têm sido cada vez mais requeridos para avaliar o real impacto de uma substância (ou composto) sobre a saúde dos organismos, uma vez que as análises químicas apenas detectam a presença e quantidade desta substância. Diversas espécies de invertebrados e peixes têm sido empregadas nas avaliações da ecotoxicologia aquática (NOGAROL et al., 2012; 2016; BOTELHO et al., 2012; MARCATO et al., 2014, MARINHO et al., 2014, CORREIA et al., 2017a,b) e têm sido considerados bons modelos para estudo de impacto ambiental (FONTANETTI et al., 2012,

ARANA et al., 2017).

Neste sentido, considerando a importância da água para a vida e a relevância da contaminação dos recursos hídricos por resíduos industriais, dentre eles a vinhaça de cana-de-açúcar, que pode chegar ao ambiente aquático por despejo indiscriminado em campo, lixiviação e/ou percolação, o presente trabalho teve por objetivo verificar a eficácia do tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar por um sistema híbrido de tratamento, analisar as macrófitas aquáticas utilizadas no sistema de tratamento, analisar a toxicidade desta vinhaça biorremediada utilizando a tilápia como modelo para testes ultramorfológico, histológico, histoquímico e molecular e o anfípoda *Gammarus pulex* como modelo para teste comportamental.

6. CONCLUSÃO

A partir das análises realizadas e dos resultados obtidos neste estudo podemos concluir que:

- As análises físico-químicas realizadas durante e após a finalização da biorremediação da vinhaça por meio do sistema híbrido de tratamento comprovaram a alteração da sua composição, diminuindo os índices que conferem toxicidade.

- As análises das macrófitas aquáticas por meio de testes físico-químicos e fitoquímicos possibilitaram elucidar a funcionalidade da fitorremediação dentro do sistema híbrido de tratamento, identificando quais compostos foram absorvidos ou disponibilizados pelas plantas, ressaltando a sua importância dentro do sistema.

- A análise histopatológica da brânquia não demonstrou alterações significativas nos peixes expostos a vinhaça biorremediada, o que permitiu concluir que, em comparação com estudos realizados previamente, a vinhaça após ser submetida ao tratamento proposto teve seu potencial tóxico reduzido.

- As análises histológica, histoquímica, imunohistoquímica e moleculares do fígado comprovaram a diminuição do potencial tóxico da vinhaça pelo sistema híbrido de tratamento, uma vez que, os resultados não demonstraram diferenças significativas entre os grupos expostos e o grupo controle.

- Pela análise comportamental dos anfípodas pode-se concluir que a vinhaça biorremediada ainda atua como agente perturbador do ambiente, alterando o comportamento de natação dos animais, atuando negativamente sobre a capacidade de sobrevivência do indivíduo. Apesar da vinhaça biorremediada ainda ser um agente estressor do comportamento animal, quando comparada com a vinhaça *in natura*, apresentou uma redução na toxicidade, uma vez que a exposição a vinhaça *in natura* resultou em um maior número de mortes.

- Posto isto, pelos resultados apresentados e levando em conta a possibilidade da vinhaça tratada atingir os corpos hídricos, o sistema híbrido de tratamento proposto neste estudo atingiu o objetivo de diminuir a toxicidade da vinhaça, uma vez que, os testes realizados apresentaram resultados excelentes quando comparados aos outros estudos sobre o assunto, tornando, assim, a utilização deste resíduo mais segura. Porém, como sugestão de futuros trabalhos, existe a necessidade de otimização do sistema híbrido de tratamento para que ele se torne mais atrativo às indústrias sucroalcooleiras.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 2005. **NBR ISO/IEC 17025:2005 - Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração**, second ed. São Paulo.

AKIYOSHI, H.; INOUE, A. Comparative histological study of teleost livers in relation to phylogeny. **Zoological Science**, v. 2, n. 8, p. 841–850, 2004.

ALBANEZ, R.; CHIARANDA, B.C.; FERREIRA, R.G.; FRANCA, A.L.P.; HONORIO, C.D.; RODRIQUES, J.A.D.; RATUSZNEI, S.M.; ZAIAT, M. Anaerobic biological treatment of vinasse for environmental compliance and methane production. **Appl Biochem Biotechnol** 178:21–43, 2016. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1856-z>

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 & Management**, Vol. 9, Iss. 4, 2006.

ALBUQUERQUE, C. Uso da acetilcolinesterase e metalotioneína em peixes na avaliação do efeito da contaminação da Baía de Guanabara, RJ. Dissertação de Mestrado submetida à Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), Rio de Janeiro, RJ, 2007.

ALONSO, S.G.; CATALÁ, M.; MAROTO, R.R.; GIL, J.L.R.; DE MIGUEL, Á.G.; VALCÁRCEL, Y. Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain), **Environ Int**, v. 36, p. 195–201, 2010.

ALVES- COSTA, J.R.M. Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por contaminação em chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus*. Unpublished Master Dissertation. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 125 pp, 2001.

ANSOAR-RODRÍGUEZ, Y.; CHRISTOFOLETTI, C.A.; CORREIA, J.E.; SOUZA, R.B.; MOREIRA-DE-SOUSA, C.; MARCATO, A.C.C.; BUENO, O.C.; MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; FONTANETTI, C.S. Liver alterations in *Oreochromis niloticus* (Pisces) induced by insecticide imidacloprid: histopathology and heat shock protein in situ localisation. **Journal of Environmental Science and Health**, Part B, v. 0, n. 0, p. 1–7, 2016.

AQUINO, G. S.; DE CONTI MEDINA, C.; JUNIOR, A. L. P.; SANTOS, L. O.; CUNHA, A. C. B.; KUSSABA, D. A. O.; DOS SANTOS JÚNIOR, J. H.; ALMEIDA, L. F.; SANTIAGO, A. D. Sistema radicular e produtividade de soqueiras de cana-de-açúcar sob diferentes quantidades de palhada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 12, p. 1150–1159, 2015.

ARANA, S.; ANSOAR-RODRÍGUEZ, Y.; GUEDES, T.A., MARCATO, A.C.C., FONTANETTI, C.S. **Peixes como bioindicadores do impacto no ambiente aquático induzido por agrotóxicos empregados no cultivo de cana-de-açúcar**. in: Fontanetti, C.S.; Bueno, O.C. (Org). Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica. Bauru, SP: Canal 6, 229-250, 2017.

ARCE FUNCK, J., DANGER, M., GISMONDI, E., COSSU-LEGUILLE, C., GUÉROLD, F., FELTEN, V. Behavioural and physiological responses of *Gammarus fossarum* (Crustacea

- Amphipoda) exposed to silver. **Aquatic Toxicology**, v. 142-143, p. 73–84, 2013.
- ARORA, A.; SETH, A.; DIEN, B.S.; BELYEA, R.L.; SINGH, V.; TUMBLESON, M.E.; RAUSCH, K.D. Microfiltration of thin stillage: Process simulation and economic analyses. **Biomass and Bioenergy**, n. 35, p. 113–120, 2011.
- ATEEQ, B.; ABUL FARAH, M.; NIAMAT ALI, M.; WASEEM, A. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. v. 518, p. 135–144, 2002.
- BAILLY Y.; DUNEL-ER S.; LAURENT P. The neuroepithelial cells of the fish gill filament indolamine immunocyto chemistry and innervation. **Anatomical Record**, v. 233, p. 143–61, 1992.
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHANDT-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.
- BERNET, D.; SCHMIDT-POSTHAUS, H.; WAHLI T.; BURKHARDT-HOLM, P. Evaluation of two monitoring approaches to assess effects of waste water disposal on histological alterations in fish. **Hydrobiologia**, v.524, p.53–66, 2004.
- BEZBARUAH, A.N.; ZHANG, T.C. pH, redox, and oxygen microprofiles in rhizosphere of bulrush (*Scirpus validus*) in a constructed wetland treating municipal wastewater. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 60–70, 2004.
- BIDOIA, E.D.; CORREIA, J.E.; PRACHNOU, E.L.S.; AZEVEDO, G.O.; SHIMIZU, F.L. **Tratamentos de águas de abastecimento e residuárias**. Joinville: Clube de Autores Publicações S/A. 2016.
- BIRNIE-GAUVIN, K.; CONSTANTINI, D.; COOKE, S. J.; WILLMORE, W. G. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. **Fish and Fisheries**, n. August 2016, p. 1–15, 2017.
- BITAR, A.L. Utilização de protótipos para simulação de sistema construído de áreas alagadas (constructed wetland) para tratamento de efluentes de pesque- pague. 2006. 125f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.
- BLANCHETTE, B., FENG, X., SINGH, B.R. Marine glutathione S-transferases. **Marine Biotechnology**, v. 9, p. 513–542, 2007.
- BNDES – Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social e CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro, Brasil: BNDES; 2008.
- BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M.F. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: Comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 52, p. 5195–5200, 2004.

BOSSUS, M. C. et al. Behavioural and transcriptional changes in the amphipod *Echinogammarus marinus* exposed to two antidepressants, fluoxetine and sertraline. **Aquatic Toxicology**, v. 151, p. 46–56, 2014.

BOTELHO, R.G.; TORNISIELO, V.L.; OLINDA, R.A.; MARANHO, L.A.; MACHADO-NETO, L. Acute toxicity of sugarcane vinasse to aquatic organisms before and after pH adjustment. **Toxicological & Environmental Chemistry**, n. 94, 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.

BROOKES, P. S. Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: An odd couple. **Free Radical Biology and Medicine**, 38, 12–23, 2005.

BRUSLÉ, J., GONZALEZ, I., ANADON, G. **The structure and function of fish liver**. In: Munshi, J.S.D., Dutta, H.M. (Eds.), Fish Morphology. Science Publishers Inc., New York, 1996.

BUEGE, J.A., AUST, S.D. Microsomal Lipid Peroxidation. **Methods in Enzymology**, vol. 52, pp. 302–310, 1978.

CALABRESE, V.; LODI, R.; TONON, C.; AGATA, V.D.; SAPIENZA, M.; SCAPAGNINI, G.; MANGIAMELI, A.; PENNISI, G.; STELLA, A.M.G.; BUTTERFIELD, D.A. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. **Journal of the Neurological Sciences**, v.233, p. 145-162, 2005.

CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V.; VELOSO, C.M. et al. Silagem de resíduo de peixes em dietas para alevinos de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, p. 126-130, 2006.

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

CETESB. Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Vinhaça – critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. **Norma Técnica P. 4.231**. São Paulo, 2015.

CHOWDHARY, P.; RAJ, A.; BHARAGAVA, R.N. Environmental pollution and health hazards from distillery wastewater and treatment approaches to combat the environmental threats: A review. **Chemosphere**, n. 194, p. 229–246, 2018.

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

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**. 224, 1523–1536, 2013b.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; FRANCISCO, A. ; PEDRO-ESCHER, J. ; GASTALDI, V. D. ; FONTANETTI, C. S. . Diplopods as Soil Bioindicators of Toxicity After Application of

Residues From Sewage Treatment Plants and Ethanol Industry. **Microscopy and Microanalysis** (Print), n. 22, p. 1098-1110, 2016.

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

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento de safra brasileira: Cana-de-açúcar, primeiro levantamento.** 2016. <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_14_09_06_31_boletim_cana_portugues_-_4o_lev_-_15-16.pdf> Acesso em: 18 abril 2016.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento de safra brasileira: Cana-de-açúcar, primeiro levantamento.** 2018. <https://www.conab.gov.br/component/k2/item/download/22956_506e8f00170422c62a452d3e319a6d6f> Acesso em: 18 Agosto 2018.

CONAMA. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução No 002, de 5 de junho de 1984.

CORREIA, J.E.; CHRISTOFOLETTI, C.A.; MARCATO, A.C.C.; MARINHO, J.F.U.; FONTANETTI, C.S. Histopathological analysis of tilapia gills (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) exposed to sugarcane vinasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, n. October 2016, p. 319–326, 2017a.

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

DAVID, J. A. O.; FONTANETTI, C. S. The Role of Mucus in *Mytella falcate* (Orbigny 1842) Gills from Polluted Environments. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 203, p. 261–266, 2009.

Di GIULIO, R. T.; WASHBURN, P.C.; WENNING, R.J. Biochemicals responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. **Environ.Toxicol.Chem.**, v. 8, p. 1103–1123, 1989.

Di GIULIO, R.T; MEYER J. N. **Reactive oxygen species and oxidative stress**. In: Di Giulio RT, Hinton DE (eds.): *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, Taylor and Francis Group. 273–324, 2008.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, 82, 47–95, 2002.

ESPAÑA-GAMBOA,E., MIJANGOS-CORTES,J., BARAHONA-PEREZ,L., DOMINGUEZ- MALDONADO,J., HERNÁNDEZ-ZARATE,G., ALZATE-GAVIRIA,L. Vinasse: characterization and treatments. **Waste Manage**, n. 29, p. 1235–1250. 2011.

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

FASULO, A. M.; MAISANO, M.; GIANNETTO, A.; PARRINO, V.; GENNUSO, F.; D'AGATA, A. Immunohistochemical and molecular biomarkers in *Coris julis* exposed to environmental contaminants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 873- 882, 2010.

FBA (Freshwater Biological Association). Collecting freshwater macroinvertebrate samples, 2005. <<https://www.fba.org.uk/sites/default/files/CourseInvertSamplingProtocol.pdf>>

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Reviews of Physiology**, v. 61, p. 243- 282, 1999.

FELTEN, V. et al. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. **Aquatic Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 413–425, 2008.

FERET, F.; SERAFIM, A.; BEBIANNO; M. Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidant as biomarker in *Ruditapes decussates*. **Ecotoxicology**, v.12, p. 417–426, 2003.

FERRAZ, A.D.N.; KOYAMA, M.H.; DE ARAUJO, M.M.; ZAIAT, M. Thermophilic digestion of raw sugarcane vinasse. **Renew Energy**, v. 89, p. 245–252, 2016.

FERREIRA, L.F.R. **Fungi biodegradation of vinasse from industrial sugarcane processing**. Thesis, University of São Paulo—ESALQ, 2009.

FIGUEIREDO-FERNANDES A.; FERREIRA-CARDOSO J.V.; GARCIA-SANTOS S.; MONTEIRO S.M.; CARROLA J.; MATOS P.; FONTAINHAS-FERNANDES A. Histopathological changes in liver and Gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 103-109, 2007.

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. Brasil/Alemanha: UNIPAMPA/UNIKASSEL, v. 3, p. 975-1005, 2012.

FREIRE, W.J.; CORTEZ, L.A. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. ESALQ: Piracicaba. 2000.

FROVA, C. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives, **Biomolecular Engineering**, v. 23, p. 149–169, 2006.

FUESS, L.T.; GARCIA, M.L. Anaerobic digestion of stillage to produce bioenergy in the sugarcane-to-ethanol industry. **Environmental Technology** (United Kingdom), n. 35, p. 333–339. 2014.

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

GARCÍA-BERNET, D.; BUFFIÈRE, P.; ELMALEH, S.; MOLETTA, R. Application of the down-flow fluidized bed to the anaerobic treatment of wine distillery wastewater. **Water Sci Technol**, v. 38, p. 393–399, 1998.

GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A. **Atlas of Fish Histology**. Enfi eld, New Hampshire 03748 United States of America General: [s.n.], 2008.

GERHARDT, A. Monitoring behavioural responses to metals in *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea) with impedance conversion. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 2, n. 1990, p. 15–23, 1995.

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, p. 760-769, 2007.

GRAF F. Zoom sur... Les Amphipodes de Bourgogne, Revue scientifique, **Rev. Sci. Bourgogne-Nature**, 6, p. 14-23, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**, 5th edn. Oxford: Clarendon Press, 2015.

HAMER, B.; HAMER, D.P.; MÜLLER, W.E.G.; BATEL, R. Stress-70 proteins in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarker of environmental pollution: a field study. **Environment International**.v.30, p. 873-882, 2004.

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

HEALTH, A.G. **Water Pollution and Fish Physiology**. 2a ed. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, FL. p.125–140. 1995.

HENARES, M.N.P.; CAMARGO, A.F.M. Estimating nitrogen and phosphorus saturation point for *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms and *Salvinia molesta* Mitchell in mesocosms used to treating aquaculture effluent. **Acta Limnologica Brasiliensia**, n. 26, p. 420–428. 2014.

HIBIYA, T. **An atlas of fish histology, normal and pathological features**. New York: Gustav Fischer Verlag, 1982.

HILL, J.; NELSON, E.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 30, p. 11206–11210, 2006.

HINTON, D.E.; LAURÉN, D.J. **Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potencial biomarkers of exposure**. In: J.F. MCCARTHY AND L.R. SHUGGART (Eds.). *Biom. Of Environ. Contamin.* Lewis Publisher, Boca Raton, Florida, p.17-57, 1990.

HOARAU, J.; CARO, Y.; GRONDIN, I.; PETIT, T. Sugarcane vinasse processing: Toward a status shift from waste to valuable resource. A review. **Journal of Water Process Engineering**, n. 24, p. 11–25. 2018.

HORAN, N. J. **Biological wastewater treatment systems**. Theory and operation. John Wiley & Sons, Chichester. 310 p., 1990.

INPE (National Institute for Space Research). 2016. <<http://clima1.cptec.inpe.br/monitoramentobrasil/pt>> Acesso em: 22 novem. 2018.

JAGOE, C.H.; FAIVRE, A.; NEWMAN, M.C. Morphological and morphometric changes in the gills of mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) after exposure to mercury (II). **Aquatic toxicology**, v. 34, p. 163–183, 1997.

JAGOE, C.H.; HAINES; T.A. Changes in gill morphology of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts due to addition of acid and aluminum to stream water. **Environ Pollut**, v. 97, p. 137–146, 1997.

JAMIESON, D.; CHANCE, B.; CADENAS, E.; BOVERIS, A. The relation of free radical production to hyperoxia. **Annual Reviews in Physiology**, 48, 703–719, 1986.

JARDIM, W.F.; CANELA, M.C. **Fundamentos da oxidação química no tratamento de efluentes e remediação de solos**. Cad. Temático, v. 1, p. 1–10. 2004.

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

KADLEC, R.H.; KNIGHT, R.L. Treatment wetlands. Boca Raton: Lewis Publishers, 893 f, 1996.

KADLEC, R.H., KNIGHT, R.L., VYMAZAL, J., BRIX, H., COOPER, P., HABERL, R. **Constructed Wetlands for Pollution Control: Processes, Performance, Design and Operation**. IWA Specialist Group on use of Macrophytes in Water Pollution Control. IWA Publishing, p. 156, 2000.

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

KHATIWADA, D.; SILVEIRA, S. Greenhouse gas balances of molasses based ethanol in Nepal. *J. Clean. Prod.* 19, p. 1471-1485, 2011.

KIANG, J.G.; TSOKOS, G.C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, bio- chemistry, and physiology. *Pharmacol. Ther.*, v. 80, p. 183–201, 1998.

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, S.; VISWANATHAN, L. Production of biomass, carbon dioxide, volatile acids, and their interrelationship with decrease in chemical oxygen demand, during distillery waste treatment by bacterial strains. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 13, p. 179–187, 1991.

LAGADIC, L.; CAQUET, T.; RAMADE, F. The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology*, v. 3, n. 3, p. 193–208, 1994.

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

LEE, S. M.; LEE, S. B.; PARK, C. H.; CHOI, J. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. **Chemosphere**, v. 65, p. 1074-1081, 2006.

LI, Y.; ZHU, G.; NG, W.J.; TAN, S.K. A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: Design, performance and mechanism. **Science of the Total Environment**, v. 468–469, p. 908–932, 2014.

LIESACK, W.; SCHNELL, S.; REVSBECH, N.P. Microbiology of flooded rice paddies. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 625–645, 2000.

LIVINGSTONE, D.R. Oxidative stress in aquatic organism in relation to pollution and agriculture. **Revue de Medecine Veterinaire** 154, 427–430, 2003.

LUDOVICE, M.T.F. **Estudo do efeito poluente da vinhaça infiltrada em canal condutor de terra sobre lençol freático**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Civil – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 1997.

LUSHCHAK, V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**. 101, 13-30, 2011.

MACEDO, I.C.; SEABRA, J.E.A.; SILVA, J.E.A.R. 2008. Greenhouse gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: the 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**, v. 9, p. 582–595, 2008.

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.

MALTBY, L. Studying stress: The importance of organism-level responses. **Ecol. Appl.**, v. 9, p. 431–440, 1999.

MARCATO, A. C. C.; YABUKI, A. T.; FONTANETTI, C. S. Nickel exposure promotes osmoregulatory disturbances in *Oreochromis niloticus* gills: histopathological and energy

dispersive spectrometry analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 13095 – 13102. 2014.

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. 110C, p. 239–245. 2014.

MARÔCO, J. **Análise Estatística com o SPSS Statistics**. Report Number: Perô Pinheiro. 2014.

MELO, S.; NIPPER, M. Sediment toxicity tests using the burrowing amphipod *Tiburonella viscana* (Amphipoda: Platyischnopidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 412–20, 2007.

MINGUEZ, L.; BRULÉ, N.; SOHM, B.; DEVIN, S.; GIAMBÉRINI, L. Involvement of Apoptosis in Host-Parasite Interactions in the Zebra Mussel. **Plos One**, v. 8, p. 1-7, 2013.

MISHRA, A.K.; MOHANTY, B. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.26, p.136–141. 2008.

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**, n.44, p.132-137. 2011.

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

MORAES, A.R. Estimativa de estoque de elementos químicos em macrófitas aquáticas do reservatório de Sato Grande (Americana – SP). 1999. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.

MORAGA, D.; MEISTERTZHEIM, A. L.; TANGUY-ROYER, S.; BOUTET, I.; TANGUY, A.; DONVAL, A. Stress response in Cu²⁺ and Cd²⁺ exposed oysters (*Crassostrea gigas*): An immunohistochemical approach. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 141, p. 151-156, 2005.

MOREIRA-DE-SOUSA, C.; SOUZA, R. B. DE; FONTANETTI, C. S. HSP70 as a Biomarker: an Excellent Tool in Environmental Contamination Analysis — a Review. **Water Air Soil Pollut**, v. 229, 2018.

MORINI, M.S.C.; SILVA, O.G.M.; ZAMBON, V.; NOCELLI, R.C.F. **Cultura de cana-de-açúcar no Brasil: manejo, impactos econômicos, sociais e ambientais**. in: Fontanetti, C.S.; Bueno, O.C. (Org). Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica. Bauru, SP: Canal 6, 31-50, 2017.

MORTENSEN, A.S.; ARUKWE, A. Effects of alpha-ethynylestradiol on hormonal responses

and xenobiotic biotransformation system of Atlantic salmon (*Salmo salar*), **Aquat. Toxicol**, v. 85, p. 113–123, 2007.

MOTA, V.T.; SANTOS, F.S.; AMARAL, M.C.S. Two-stage anaerobic membrane bioreactor for the treatment of sugarcane vinasse: assessment on biological activity and filtration performance, **Bioresour. Technol**, v. 146, p. 494–503, 2013.

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.

MULIDZI, A.R. Winery and distillery wastewater treatment by constructed wetland with shorter retention time. **Water Science & Technology**, n. 61, p. 2611–2615. 2010.

MUPOSHI, V. K.; UTETE, B.; SITHOLE-NIANG, I.; MUKANGENYAMA, S. Active biomonitoring of a subtropical river using glutathione-s-transferase (GST) and heat shock proteins (HSP 70) in *Oreochromis niloticus* as surrogate biomarkers of metal contamination. **Water SA**, v. 41, n. 3, p. 425–431, 2015.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extractions and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, n. 1054, p. 95- 111. 2004.

NISHIDA, Y. The chemical process of oxidative stress by copper (II) and iron (III) ions in several neurodegenerative disorders. **Monatshefte fur Chemie**, v. 142, p. 375–384, 2011.

NOCELLI, R.C.F.; ZAMBON, V.; SILVA, O.G.M.; MORINI, M.S.C. **Histórico da cana-de-açúcar no Brasil: Contribuições e importância Econômica**. in: Fontanetti, C.S.; Bueno, O.C. (Org). *Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica*. Bauru, SP: Canal 6, 13-30, 2017.

NOGAROL, L. R.; BROSSI-GARCIA, A. L.; FONTANETTI, C. S. Surface morphology of *Diplodon expansus* (Kuster, 1856; Mollusca, Bivalvia, Hyriidae) gill filaments after exposure to environmentally relevant concentrations of atrazine herbicide. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 807-813, 2012.

NOGAROL, L.R.; BROSSI-GARCIA, A.L.; SOUZA, R.B.; FONTANETTI, C.S. Histopathological effects of the herbicide atrazine on gills of the Brazilian endemic bivalve. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, p. 1-17, 2016.

NOGUEIRA, S.F. **Balço de nutrientes e avaliação de parâmetros biogeoquímicos em áreas alagadas construídas para o tratamento de esgoto**. 2003. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – área de concentração: Energia Nuclear na Agricultura), Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA/USP, Piracicaba, 2003.

NCR: Committee on Biological Markers of the National Research Council. Biological markers in environmental health research. **Environmental Health Perspectives**, v. 74, p. 3-9, 1987.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application**. OECD Publishing: Paris. 2006.

OLIVEIRA, M.; MARIA, V.L.; AHMAD, I.; SERAFIM, A.; BEBIANNO, M.J.; PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Contamination assessment of a coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal) using defence and damage biochemical indicators in gill of *Liza aurata* - an integrated biomarker approach. **Environ Pollut** 157(3), 959–967, 2009.

OHKAWA, H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.** 95, 351–358, 1979.

PADMINI, E.; RANI, M.U. Impact of seasonal variation on HSP70 expression quantitated in stressed fish hepatocytes, **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol**, v. 151, p. 278–285, 2008.

PAUL, D.; PANDEY, G.; PANDEY, J.; JAIN, K.R. Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. **Trends in Biotechnology**, v.23, p. 135–114, 2005.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: theoretical and applied**. 2 o edição. Churchill: Livingstone, 449p., 1985.

PEDRO-ESCHER, J. ; MAZIVIERO, G. ; FONTANETTI, C.S. . Mutagenic action of sugarcane vinasse in the *Tradescantia pallida* test system. **Journal of Ecosystem & Ecography**, v. 4, 2014.

PEDRO-ESCHER, J.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; ANSOAR-RODRÍGUEZ, Y.; FONTANETTI, C. S. Sugarcane Vinasse, a Residue of Ethanol Industry: Toxic, Cytotoxic and Genotoxic Potential Using the *Allium cepa* Test. **Journal of Environmental Protection**, v. 07, p. 602-612, 2016.

PERRY, S. F.; LAURENT. P. **Environmental effects on fish gill structure and function**. Pp. 231-264. In: Fish Ecophysiology. J. C. Rakin & F. B. Jensen (Eds.). London, Chapman and Hall, 421p, 1993.

PISAM, M.; RAMBOURG, A. Mitochondria rich cells in the gill epithelium of teleost fishes: an ultrastructural approach. **International Review of Cytology**, v.130, p. 191–232, 1991.

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.

POWERS, D. A. Fish as model systems. **Science**, Washington, v. 246, p. 352-358, 1989.

QUITERIO, G. M. **Avaliação do processo de biodegradação da vinhaça no solo mediante adição do biofertilizante**. 2013. 56 f. Dissertação de Mestrado, Tecnologia e Inovação, Unicamp, Limeira-SP.

RAJESHKUMAR, S., MUNUSWAMY, N., 2011. Impact of metals on histopathology and

expression of HSP70 in different tissues of Milk fish (*Chanos chanos*) of Kaatuppalli Island, South East Coast, India. **Chemosphere**, v. 83, p. 415–421, 2011.

RAMOS-VAQUERIZO, F.; CRUZ-SALOMÓN, A.; RÍOS-VALDOVINOS, E.; POLA-ALBORES, F.; LAGUNAS-RIVERA, S.; MEZA-GORDILLO, R.; RUÍZ-VALDIVIEZO, V. M.; SIMUTA-CHAMPO, R.; MOREIRA-ACOSTA, J. Anaerobic Treatment of Vinasse from Sugarcane Ethanol Production in Expanded Granular Sludge Bed Bioreactor. **Journal of Earth Science and Climate Change**, v. 9, n. 1, 2018.

RESENDE, A.S.; SANTOS, A.; XAVIER, R.P.; COELHO, C.H.; GONDIM, A.; OLIVEIRA, O.C.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. Efeito da queima da palhada da cana-de-açúcar e de aplicações de vinhaça e adubo nitrogenado em características tecnológicas da cultura. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, Viçosa, v. 30, p. 937-941, 2006.

RODRIGUES REIS, C.E.; HU, B. Vinasse from Sugarcane Ethanol Production: Better Treatment or Better Utilization? **Frontiers in Energy Research**, n. 5, p. 1–7. 2017.

ROSETY-RODRÍGUEZ, M.; ORDOÑEZ, F. J.; ROSETY M.; ROSETY, J. M.; ROSETY, I.; 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.

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

SATYAWALI, Y.; BALAKRISHNAN, M. Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: a review. **J. Environ. Manage**, v. 86, p. 481–497, 2008.

SAYEED, I.; PARVAEZ, S.; PANDEY, S.; BIN-HAFEEZ, B.; HAQUE, R.; RAISUDDIN, S. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicol. Environ. Safe**, v. 56, p. 295–301, 2003.

SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**, v. 68, n. 4, p. 369– 392, 2004.

SHEPHERD, H. L.; TCHOBANOGLOUS, G.; GRISMER, M. E. Time-dependent retardation model for chemical oxygen demand removal in a subsurface-flow constructed wetland for winery wastewater treatment. **Water Environment Research : A Research Publication of the Water Environment Federation**, v. 73, n. 5, p. 597–606, 2001.

SHUTES, R.B.E. Artificial wetlands and water quality improvement. **Environment International**, n. 26, p. 447. 2001.

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**, n. 11, p. 108–114. 2007.

SLANINOVA ,A.; SMUTNA, M.; MODRA, H.; SVOBODOVA, Z. A review: Oxidative

stress in fish induced by pesticides. **Neuroendocrinology Letters**, v. 30, p. 2–12, 2009.

SOUZA, T. S.; HENCKLEIN, F.; 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.

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

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology**: normal and pathological features. 2a edição, 1995.

TILLEY, D.R.; BADRINARAYANAN, H.; ROSATI, R.; SON, J. Constructed wetland as recirculation filters in large-scale shrimp aquaculture. **Aquacultural Engineering**, n. 26, p. 81-109. 2002.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). **National Recommended Water Quality Criteria**. 2005. <http://www.epa.gov/waterscience/criteria/wqctable/>

UYEDA, C. A. Influência da aplicação de vinhaça na condutividade hidráulica do solo saturado e no escoamento superficial. Tese de Doutorado – Escola Superior de Agricultura –Luiz de Queiroz, p. 67, 2009.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1161–1208, 2005.

VAN der OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, 2003.

VAN DICK, J.C. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. Dissertação (Magister Scientiae in Aquatic Health) – Rand Afrikans University. 2003.

VELLINGER, C. et al. Behavioural and physiological responses of *Gammarus pulex* exposed to cadmium and arsenate at three temperatures: Individual and combined effects. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

VIDALI, M. Bioremediation: an overview. **Pure and Applied Chemistry**, v.73, p. 1163–1172, 2001.

VIJAYARAGHAVAN, K.; RAMANUJAM, T.K. Performance of anaerobic contact filters in series for treating distillery spentwash, *Bioprocess Eng.*, v. 22, p. 109–114, 2000.

von SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**: Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. DESA-UFMG: Belo Horizonte. 2005.

von SPERLING, M.; CHERNICHARO, C.A.L. **Biological Wastewater Treatment in Warm Climate Regions**. IWA: London. 2005.

VYMAZAL, J., BRIX, H., COOPER, P.F., GREEN, M.B., HABERL, R. (Eds.) **Removal Mechanisms and Types of Constructed Wetlands**. Constructed Wetlands for Wastewater Treatment in Europe. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 17–66, 1998.

WADT, L.C. Cultivo de *Pleurotus* spp. em vinhaca visando a produção de biomassa e exopolissacarídeos. Dissertação. Universidade de São Paulo—CENA, 2008.

WALLACE, W. G.; ESTEPHAN, A. Differential susceptibility of horizontal and vertical swimming activity to cadmium exposure in a gammaridean amphipod (*Gammarus lawrencianus*). **Aquatic Toxicology**, v. 69, n. 3, p. 289–297, 2004.

WEI, S.; ZHAO, Q.; ZHANG, K.; LIANG, J. Roles of rhizosphere in remediation of contaminated soils and its mechanisms. **Chin. J. App. Ecol.** 14, 143–147, 2003.

WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. **Environmental Health Criteria** 155, World Health Organization, Geneva, 1993.

WIESSNER, A.; KAPPELMEYER, U. KUSCHK, P.; KASTNER, M. Sulphate reduction and the removal of carbon and ammonia in a laboratory-scale constructed wetland. **Water Res.**, 39, 4643–4650, 2005.

WIESSNER, A.; GONZALIAS, A.E.; KASTNER, M.; KUSCHK, P. Effects of sulphur cycle processes on ammonia removal in a laboratory-scale constructed wetland planted with **Juncus effusus**. **Ecol. Eng.** 34, 162–167, 2008.

WU, S.; KUSCHK, P.; WIESSNER, A.; MÜLLER, J.; SAAD, R. A. B.; DONG, R. Sulphur transformations in constructed wetlands for wastewater treatment: A review. **Ecological Engineering**, 52, 278–289, 2013.

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

YU, I. T.; RHEE, J. S.; RAISUDDIN, S.; LEE, J. S. Characterization of the glutathione S-transferase-Mu (GSTM) gene sequence and its expression in the hermaphroditic fish, *Kryptolebias marmoratus* as a function of development, gender type and chemical exposure. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 174, n. 2, p. 118–125, 2008.