



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



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

HISTÓRICO DA APLICAÇÃO DE VINHAÇA EM CANAVIAIS: BIOENSAIOS DE
TOXICIDADE TERRESTRE E AQUÁTICA

JORGE EVANGELISTA CORREIA

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

**HISTÓRICO DA APLICAÇÃO DE VINHAÇA EM CANAVIAIS: BIOENSAIOS DE
TOXICIDADE TERRESTRE E AQUÁTICA**

JORGE EVANGELISTA CORREIA

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

Co-orientador: Prof. Dr. Jarbas Honorio de Miranda

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 ciências biológicas (biologia celular e molecular)

C824h	<p>Correia, Jorge Evangelista</p> <p>Histórico da aplicação de vinhaça em canaviais: bioensaios de toxicidade terrestre e aquática / Jorge Evangelista Correia. -- Rio Claro, 2019</p> <p>123 p. : tabs., fotos</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro</p> <p>Orientadora: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti</p> <p>Coorientadora: Jarbas Honorio de Miranda</p> <p>1. Monitoramento Ambiental. 2. Física do solo. 3. Histologia. 4. Toxicologia genética. 5. Estresse oxidativo. I. Título.</p>
-------	--

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: RELAÇÃO ENTRE TOXICIDADE DA VINHAÇA E TEMPO DE APLICAÇÃO NAS CULTURAS CANAVIEIRAS: BIOENSAIOS DE TOXICIDADE TERRESTRE E AQUÁTICA

AUTOR: JORGE EVANGELISTA CORREIA

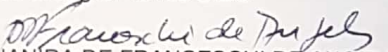
ORIENTADORA: CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

COORIENTADOR: JARBAS HONORIO DE MIRANDA

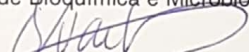
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



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




Profa. Dra. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Prof. Dr. QUIRIJIN DE JONG VAN LIER
Divisão de Funcionamento de Ecossistemas Tropicais / CENA - USP



Profa. Dra. CRISTINA MOREIRA DE SOUSA
x / x



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

Rio Claro, 29 de novembro de 2019

Título alterado para: "Histórico da aplicação de vinhaça em canaviais: bioensaios de toxicidade terrestre e aquática"

Dedico esse trabalho as
pessoas mais importantes da
minha vida: meus pais
Irineu e Suely meu irmão
Gabriel e minha namorada
Rafaella 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.

A minha namorada Rafaella que sempre me apoiou e me ajudou no que podia durante os experimentos dessa tese. Seu amor me dá forças para continuar a ser um homem melhor.

Aos meus amigos Gustavo, Danielle, Bruno, Felipe, 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.

Ao meu afilhado Felipe que trouxe luz e mudou a minha perspectiva da vida.

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

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

Faço agradecimento também ao meu co-orientador, Jarbas, que me recebeu de portas abertas e com toda disposição e entusiasmo para desenvolver um trabalho de alta complexidade em tão pouco tempo. Seu entusiasmo me motiva cada vez mais a continuar nossa parceria.

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. Muito obrigado também pela amizade, pois sei que posso contar com seus conselhos para quaisquer problemas. Me sinto honrado por ser seu último orientado, encerrando sua brilhante carreira acadêmica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço por fim a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos concedida (processo: 2015/26157-9). 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 produzido 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. Desde a proibição do descarte da vinhaça em água na década de 80, começou-se a utilizar esse resíduo como fertilizante nas culturas canavieiras. Atualmente, essa prática irá completar 40 anos e apenas em 2006 entrou em vigor uma legislação regulamentando a fertirrigação pela vinhaça. O potencial tóxico da vinhaça, tanto no solo como na água, vindo sendo comprovado por diversos estudos na última década, porém estudos que relacionem o tempo de seu em solo com a toxicidade se fazem necessários. Tendo isso em vista, esse estudo objetivou entender se os anos de fertirrigação de vinhaça altera a toxicidade no solo, a dinâmica do íon potássio no solo e a toxicidade do lixiviado da vinhaça que podem atingir as águas subterrâneas. Para isso, solos de culturas canavieiras fertirrigadas com vinhaça por 5, 15 e 30 anos foram coletados para realização do bioensaio de toxicidade terrestre e estudos de física de solo. O bioensaio de toxicidade terrestre foi realizado em triplicata expondo diplópodos da espécie *Rinochricus padbergi* por 21 e 42 dias. Após a exposição, três indivíduos de cada terrário foram anestesiados e dissecados para remoção do intestino médio para análise histopatológica e marcação de HSP70. Os solos apresentaram concentrações variadas de componentes orgânicos e metais. Após 21 dias, apenas três indivíduos sobreviveram ao solo S30 e após 42 dias também foi observada alta mortalidade, no tratamento com solo S15. A análise histopatológica mostrou espessamento do bordo em escova das células epiteliais, sendo esta alteração estatisticamente significativa para indivíduos expostos aos solos S5 e S15 por 21 dias. A perda de adesão das células epiteliais foi estatisticamente significativa nos indivíduos expostos a S15 por 21 dias e S5 por 42 dias. A dinâmica do íon potássio foi investigada mediante a análise de seus parâmetros de transporte, obtidos pelo ajuste numérico das curvas de distribuição de efluentes (Breakthrough Curves, BTC) aplicando o código CFITIM dentro do software STANMOD (STudio of ANalytical MODels) e pelo modelo HYDRUS -1D. Nos ensaios em coluna segmentada a diferença entre o solo referência e os solos fertirrigados se deu na concentração de potássio nos anéis inferiores, sendo maior nos solos fertirrigados, indicando uma maior mobilidade do potássio nesses solos. Nos ensaios de BTCs, observou-se nas curvas das simulações que a concentração de potássio chegou a 100% dos valores de entrada para quase todas as triplicatas de todos os solos. O equilíbrio foi atingido mais rápido no solo S5 em relação ao solo referência e mais rápido ainda

no S15. Em contrapartida, o solo S30 foi o que apresentou maior interação do íon potássio com o solo, confirmados por apresentar os maiores valores de coeficiente de retardamento (R) e coeficiente de distribuição, sendo estatisticamente significativos quando comparados entre eles. Após os ensaios de física de solo, o lixiviado obtido nas colunas BTCs foi testado em diluição de 5 %, em biosaio de toxicidade aquática utilizando *Oreochromis niloticus* (Pisces) como bioindicador e incidência de eritrócitos micronucleados e alterações histológicas e quantificação de proteínas de estresse no fígado com biomarcadores. Os resultados mostraram ação genotóxica do lixiviado de vinhaça após passagem nos solos de 5 e 15 anos, demonstrado pela maior incidência de eritrócitos micronucleados, estatisticamente significativa quando comparados ao controle. Os micronúcleos foram formados possivelmente por ação aneugênica, uma vez que não houve ação clastogênica confirmada pelo ensaio do cometa. Os peixes expostos ao lixiviado do solo de 15 anos apresentaram índices de alterações estatisticamente significativos para perda de limite celular e aumento de vacúolos citoplasmáticos quando comparados ao controle. Todos os tratamentos apresentaram aumento de volume dos núcleos dos hepatócitos, sendo esta alteração estatisticamente significativa em relação ao controle. Não houve diferença na marcação de polissacarídeos neutros evidenciados pela técnica de PAS. Mesmo não sendo estatisticamente significativos, observou-se um padrão de atividade para todas as enzimas presentes nesse estudo. A atividade das enzimas foi maior no tratamento com lixiviado de vinhaça do solo de 15 anos e os menores valores no tratamento do lixiviado proveniente do solo de 30 anos. Analisando os resultados de forma holística, podemos inferir que ao longo dos anos de aplicação de vinhaça, o potencial tóxico no solo aumenta a medida dos anos de aplicação de vinhaça. Inversamente, a toxicidade para as águas subterrâneas diminuiu no lixiviado do solo de 30 anos, uma vez que a tendência é que cada vez mais, parte dos componentes da vinhaça, possam ficar mais retidos no solo devido ao acúmulo de matéria orgânica e de íons com cargas positivas como potássio e cálcio. Esse comportamento também levanta o alerta para a salinização do solo com o tempo, podendo a longo prazo, afetar a própria produção de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Fertirrigação; diplópodos; potássio; ensaio do cometa; teste do micronúcleo; histopatologia; proteínas de estresse.

ABSTRACT

Vinasse, one of the main residues generated in the transformation of sugarcane into ethanol, has a pollution potential, given its high byproduct volume and its physicochemical characteristics. The contamination of lakes and rivers, by infiltration of waste disposed in the soil, such as vinasse and fertilizers, for example, deserves attention. Since the prohibition on the disposal of vinasse in water in the 1980s, this residue has been used as fertilizer in sugarcane crops. Currently this practice will complete 40 years and only in 2006 legislation regulating the fertigation of vinasse was created. The toxic potential of vinasse, both in soil and water, has been proven by several studies in the last decade, but studies that relate time to toxicity are necessary. In view of this, this study aimed to understand this study aimed to understand if the years vinasse fertigation alter the toxicity in the soil, the potassium ion dynamics in the soil and the toxicity of the vinasse leachate that can reach groundwater. For this, soils of sugarcane crops fertigated with vinasse for 5, 15 and 30 years were collected to perform the terrestrial toxicity bioassay and soil physics studies. control area (SC). Physical-chemical analysis of the different soil samples were performed. The bioassays were carried out in triplicate, with exposure for 21 and 42 days. After exposure, three individuals from each terrarium were anesthetized and dissected for midgut removal for histopathological analysis and marking of HSP70. The soils presented varied concentrations of organic components and metals. After 21 days only three individuals survived to soil S30 and after 42 days high mortality there was also observed in the treatment with soil S15. Histopathological analysis showed thickening of the brush border of epithelial cells statistically significant for individuals exposed to the S5 and S15 soils for 21 days. Loss of epithelial cell adhesion was statistically significant in individuals exposed to S15 for 21 days and S5 for 42 days. Potassium ion dynamics was investigated by analyzing its transport parameters, obtained by numerical adjustment of the Breakthrough Curves (BTC) by applying the CFITIM code within the STANMOD (STudio of ANalytical MODels) software and the HYDRUS-1D model. In the segmented column assays the difference between the reference soil and the fertigated soils was in the potassium concentration in the inferior rings, being higher in the fertigated soils, indicating a higher potassium mobility in these soils. In the BTC's assays, it was observed in the simulation curves that potassium concentration reached 100% of the input values for almost all triplicates of all soils. Equilibrium was reached faster in S5 than in reference soil and even faster in S15. In

contrast, the soil S30 presented the highest interaction of potassium ion with the soil, confirmed by presenting the highest values of retardation coefficient (R) and distribution coefficient being statistically significant when compared between them. After the soil physics tests, the leachate obtained in the BTC's columns was tested on 5% dilution in aquatic toxicity bioassay using *Oreochromis niloticus* as a bioindicator and incidence of micronucleated erythrocytes and histological changes and quantification of stress proteins in liver as biomarkers. The results showed genotoxic action of vinasse leachate after passage in soils of 5 and 15 years, demonstrated by the higher incidence of micronucleated erythrocytes, statistically significant when compared to the control. The micronuclei were possibly formed by aneugenic action, since there was no clastogenic action confirmed by the comet assay. Fish exposed to leachate from 15-year-old soil showed a statistically significant change rate for cell boundary loss and increased cytoplasmic vacuoles when compared to control. All treatments showed statistically significant increase in nuclei of hepatocytes compared to control. There was no difference in the marking of neutral polysaccharides evidenced by the PAS technique. Although not statistically significant, an activity pattern was observed for all enzymes present in this study. Enzyme activity was higher in the treatment with 15-year-old soil vinasse leachate and the lowest values in the 30-year-old soil leachate treatment. Looking at the results holistically, we can infer that over the years of vinasse application, the toxic potential in soil is inversely of groundwater toxicity, since the trend is that more and more of the vinasse components may become more retained in the soil due to the accumulation of organic matter and positively charged ions such as potassium and calcium. This behavior also raises the alert for soil salinization over time, and may in the longer term affect sugarcane production itself.

Keywords: Fertigation; diplopods; potassium; comet assay; micronucleus test; histopathology; stress proteins.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Histórico de produção e projeções econômicas do etanol.....	04
2.2. Vinhaça de cana-de-açúcar em solos.....	07
2.3. Diplópodos como bioindicadores de solo.....	09
2.4. <i>Oreochromis niloticus</i> como bioindicador aquático.....	12
2.5. Teste do micronúcleo e ensaio do cometa como ferramentas no monitoramento ambiental.....	14
2.6. Estresse Oxidativo na investigação do impacto ambiental.....	16
3. OBJETIVOS	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1 Área de estudo.....	22
4.2 Materiais biológicos.....	22
4.3 Amostras de solo.....	22
4.4 Curva de retenção de água no solo.....	23
4.5 Ensaio experimental em coluna segmentada.....	23
4.6 Análise de metais no lixiviado da vinhaça.....	25
4.7 Análise de concentração de potássio.....	25
4.8 Ensaio de colunas para BTC (Breakthrough Curve).....	25
4.9 Montagem dos bioensaios.....	26
4.9.1. Bioensaio de toxicidade terrestre utilizando <i>R. padbergi</i>	26
4.9.2. Bioensaio de toxicidade aquática utilizando <i>O. niloticus</i>	27
4.10. Técnicas aplicadas nas amostras coletadas nos bioensaios.....	27
4.10.1. Histologia e histoquímica do intestino médio de <i>R. padbergi</i> e fígado de <i>O. niloticus</i>	27
4.10.2. Ensaio do cometa utilizando sangue periférico de <i>O. niloticus</i>	28
4.10.3. Teste do micronúcleo associado à anormalidades nucleares.....	29
4.10.4. Imunomarcagem da proteína HSP70.....	29

4.10.5. Estresse oxidativo.....	30
4.10.5.1. Análise de proteínas totais.....	30
4.10.5.2. Peroxidação lipídica TBARS.....	30
4.10.5.3. Superóxido Dismutase (SOD).....	30
4.10.5. 4. Glutathiona S Transferase.....	31
5. RESULTADOS.....	32
5.1 Artigo 1: Fertirrigated soils with vinasse for extensive period causes cellular damage to soil bioindicators.....	33
5.2 Artigo 2: Mobilidade do íon potássio em solos sob diferentes tempos de aplicação de vinhaça.....	63
5.3. Artigo 3: Potencial genotóxico do lixiviado da vinhaça de cana-de-açúcar após percolação em solos com diferentes períodos de fertirrigação.....	82
5.4. Artigo 4: Histopatologia e quantificação de proteínas de estresse oxidativo em fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> expostos ao lixiviado de vinhaça.....	95
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	111
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112

1. INTRODUÇÃO

O Brasil, devido às características da nossa colonização, sempre teve natureza exportadora, utilizando seu vasto território para implementação de várias monoculturas, sendo até os dias de hoje, um dos maiores produtores de recursos agrícolas do mundo. Dado o seu papel fundamental na economia, essas monoculturas fazem uso excessivo de agrotóxicos e pesticidas para assegurar a produção, além de gerar quantidades altíssimas de resíduos que podem conter substâncias potencialmente poluidoras (RIBEIRO et al., 2007); conseqüentemente, o agronegócio tem se tornado um dos setores da economia que mais causam impacto ambiental.

No final da década de 70, devido à crise do petróleo, o governo brasileiro instituiu o Programa Nacional do Alcool (Proálcool), com o intuito de estimular o consumo de etanol como combustível. Esse incentivo perdurou por muitos anos e foi um dos principais responsáveis pelo crescimento exponencial do setor sulcraolcooleiro na economia nacional. Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo; na safra 2018/2019, a produção chegou a 33,103 bilhões de litros e a área cultivada de cana-de-açúcar foi de aproximadamente 10 milhões de hectares; 52% dessa área é localizada no estado de São Paulo, o qual é responsável por 48,47% da produção de etanol do país (CONAB, 2014; UNICA, 2019).

Para a produção de etanol, o caldo da cana é aquecido, fermentado e destilado; ao longo de todo o processo são gerados diferentes resíduos, sendo a vinhaça o principal deles, um resíduo líquido da destilação, em uma proporção 10 a 15 vezes maior do que a de etanol (CHRISTOFOLETTI et al., 2013a).

Desde o final da década de 80 houve uma crescente preocupação com relação ao descarte desses resíduos e questões ambientais. A partir daí, houve a criação de legislações mais rigorosas com o intuito de preservar os recursos naturais. Assim, resíduos que antes eram descartados diretamente nos rios, precisaram ter outro destino. A vinhaça é um exemplo disso.

A vinhaça possui alta carga orgânica e altas concentrações de potássio, nitrogênio e fósforo, apresentando grande potencial para utilização em solos agrícolas, principalmente na forma de fertirrigação (CHRISTOFOLETTI et al., 2013a). A adoção da prática de fertirrigação consiste na infiltração da vinhaça bruta no solo, por meio da irrigação das culturas de cana-de-açúcar, sendo o principal destino desde a proibição de seu descarte em água na década de 80 (CAMARGO et al., 2009). Diversos autores, como Resende (1979), Ball-Coelho et al. (1993), Lyra et al. (2003) e Silva e Cabeda (2005)

constatarem efeitos benéficos da vinhaça sobre o solo, frente ao aumento na retenção de umidade, porosidade, nível de potássio e condutividade elétrica observados.

Entretanto, passaram-se 15 anos de fertirrigação de vinhaça nas culturas canavieiras sem que houvesse nenhuma regulamentação sobre essa prática. Apenas em 2005, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) lançou a norma técnica P 4.231/2005 a qual estabelece os critérios e procedimentos para o armazenamento, transporte e aplicação da vinhaça, gerada pela atividade sucroalcooleira no processamento de cana-de-açúcar; essa norma teve uma atualização em 2015. Contudo, essa norma se limita apenas ao estado de São Paulo, não havendo uma legislação federal sobre essa temática; mesmo assim, em São Paulo, a fiscalização ainda é limitada.

Evidências a partir da literatura indicam que a vinhaça de cana pode modificar várias propriedades físicas e químicas do solo, como pH, capacidade de troca catiônica do solo (CTC), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), tamanho das partículas e geometria dos poros, podendo até facilitar a contaminação de águas subterrâneas pelo aumento da porosidade do solo ou facilitar o escoamento diminuindo a porosidade, dependendo do solo em que é aplicada (ROLLING, FREIRE, 1997; SILVA et al., 2007, CHRISTOFOLETTI et al; 2013b).

O tempo é um fator de extrema importância em relação a contaminantes ambientais, uma vez que esses podem não apresentar toxicidade por si só, mas ao longo de vários anos podem promover modificações físicas e químicas no ambiente favorecendo assim, sua contaminação. Ao mudar as características do solo e por apresentar metais traço, mesmo que em pequenas concentrações, a vinhaça lançada no solo como fertilizante, ao longo do tempo pode levar à consequências severas ao solo, e às águas subterrâneas, favorecendo a salinização dos mesmos.

Conseguir mensurar os efeitos de alguma substância no meio ambiente ao longo de anos é uma tarefa complicada. Contudo, a modelagem matemática nos ajuda a prever esses efeitos para que assim sejam realizadas ações preventivas. Modelos de simulação numérica são atualmente muito utilizados para auxiliar no entendimento dos complexos processos de deslocamento de solutos em perfis de solos saturados e não saturados, sendo importantes ferramentas para o gerenciamento de tomadas de decisão e redução de impactos ao meio ambiente (SOTO et al., 2015).

Soto et al. (2015) simularam fluxo e transporte de íons de vinhaça aplicado a um corte bidimensional de solo de Ajapí (Rio Claro – SP). As simulações tiveram a finalidade de avaliar a potencial contaminação das águas subterrâneas e de um córrego localizado

próximo às fontes de infiltração. Os resultados obtidos apontaram que para os cenários hipotéticos do estudo, íons provenientes da vinhaça podem alcançar o nível freático em pouco tempo de percolação (1 a 3 anos), dependendo de sua profundidade (6m a 20m). Adicionalmente, concentrações entre 31% e 44% da concentração inicial do soluto podem ser atingidas em períodos de tempo de 10 a 30 anos.

Vários estudos demonstraram a toxicidade da vinhaça em diversos organismos. Em drosófilas (*Drosophila melanogaster*) foi observado 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).

Christofoletti et al. (2013b) testaram a toxicidade em solo, da vinhaça, de um biosólido 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.

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, sendo estas alterações dose dependentes.

Correia et al. (2017a; 2017b) avaliou a eficácia do tratamento da vinhaça após a correção de seu pH com cal a partir de bioensaios com *O. niloticus*. A mortalidade, incidência de micronúcleo e incidência de alterações no tecido branquial obtiveram valores menores em comparação a estudos anteriores com a vinhaça *in natura*.

Tendo em vista o grande uso da vinhaça como fertilizante ao longo das últimas décadas e o potencial contaminante da vinhaça em solo, para águas subterrâneas e corpos hídricos, torna-se de extrema importância mensurar e prever seus efeitos ao longo dos anos. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar se o tempo é um fator que influencia na toxicidade, tanto dos solos que recebem vinhaça como fertilizante por diferentes períodos como do lixiviado que passa por esses solos, assim como entender como se dá a movimentação do seu principal soluto, o potássio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico de produção e projeções econômicas do etanol

O aumento e a volatilidade dos preços do petróleo, juntamente aos esforços mundiais para a redução de gases de efeito estufa, levaram inúmeros países a buscarem alternativas para suas matrizes energéticas. No ano de 1973, ocorreu a primeira crise do petróleo, resultado de um conflito entre Israel, Egito e Síria, o qual teve perturbações de alcance internacional, uma vez que esses países fazem fronteiras com os maiores produtores de petróleo no mundo.

Nessa época, o Brasil importava 80% do petróleo utilizado no país; diante desse quadro, o governo lançou em 1975 o programa Proálcool que tinha como metas garantir o abastecimento de combustível para o país, fazer a substituição da gasolina por um combustível renovável e desenvolver tecnologicamente a indústria da cana-de-açúcar e do álcool (HOLANDA, 2004). A produção de álcool proveniente da cana-de-açúcar, ou de qualquer outro insumo, deveria ser incentivada por intermédio do aumento da oferta de matérias-primas, enfatizando a expansão da produção agrícola, com o estabelecimento de novas unidades produtoras e a modernização e ampliação das já existentes. O investimento público chegou a 90% para se construir uma nova destilaria e 100% para se aumentar a área cultivada de cana-de-açúcar (MENDONÇA, 2008).

Na fase inicial do programa foi intensificada a produção de álcool anidro para ser utilizado como aditivo à gasolina, reduzindo a importação de petróleo e, conseqüentemente, diminuindo o déficit no balanço de pagamentos (MICHELLON; SANTOS; RODRIGUES, 2008). Entre as condições, extremamente propícias para o produtor, podem-se destacar: taxas de juros negativas; carência de três anos para o pagamento dos empréstimos; e doze anos para o pagamento total dos empréstimos.

Em 1979, houve novo conflito no Oriente Médio entre Irã e Iraque, que fez com que o petróleo atingisse preços muito mais elevados, eclodindo o segundo choque do petróleo e marcando a segunda fase do Proálcool (MICHELLON; SANTOS; RODRIGUES, 2008). Segundo os mesmos autores, o governo passou a estimular, além da produção de álcool anidro, a produção de álcool hidratado para ser utilizado no consumo de veículos movidos exclusivamente a álcool e para utilização do combustível nos setores químicos; houve fixação de 20% de mistura de álcool à gasolina, aumento da venda de álcool hidratado com preço estipulado em, no máximo, 65% do preço da gasolina, diminuição de alíquotas de Imposto sobre Produtos Industrializados (IPI) e Propriedade de Veículos Automotores (IPVA) para veículos a álcool, isenção de IPI para

táxis a álcool e redução na paridade de 60kg de açúcar por 44 litros de álcool, para 60kg de açúcar por 38 litros de álcool, tornando mais vantajoso, para as usinas, produzir álcool.

No começo da década de 90, o setor sucroenergético começou a enfrentar uma crise ocasionada pela diminuição do preço do barril de petróleo, valorização do açúcar no mercado internacional e pela crise econômica e política do país. Os subsídios ao etanol foram retirados aos poucos e o ritmo de produção de etanol caiu pela primeira vez (MICHELLON; SANTOS; RODRIGUES, 2008).

No início dos anos 2000 as questões ambientais, que já vinham surgindo timidamente nas décadas anteriores, ganharam força e importância não apenas na academia, mas nos setores políticos e econômicos; o Protocolo de Kyoto foi o grande marco da mudança de mentalidade frente aos efeitos ambientais causados pela expansão econômica. O comprometimento das nações mais poderosas do mundo em reduzir suas emissões de gases do efeito estufa teve grandes impactos no preço do petróleo. Essa nova crise abriu novo espaço para o etanol como biocombustível de fonte renovável na economia. A chegada da tecnologia *flexfuel* no setor automobilístico deu grande impulso na retomada do consumo de etanol como combustível, uma vez que deu ao consumidor o direito de escolha, escolha essa, que pesou para o lado do etanol atrelando apelo econômico e ambiental.

Levando em consideração o histórico da produção de etanol e seus ciclos de ascensão e decadência pode-se perceber que embora ele seja uma alternativa ao uso de combustíveis fósseis, este é totalmente dependente do preço do petróleo. Levando em consideração o aumento atual do preço do barril de petróleo, somado ao fato de que a mentalidade sustentável nunca esteve tão popularizada, é de se imaginar que o setor sucroalcooleiro e o etanol enfrentem mais um ciclo de ascensão. Contraditoriamente não é isso que vem acontecendo; nos períodos favoráveis ao etanol o incentivo estatal foi maciço e garantiu a expansão do setor. Entretanto, como o país está enfrentando uma grande crise política com reflexos na economia, o pessimismo dos investidores vem aumentando.

Atualmente a crise no setor é não dependente do petróleo. Segundo Dos Santos et al. (2016) a baixa rentabilidade e as baixas margens econômicas, a interrupção do funcionamento ou o fechamento de indústrias, a redução do investimento e o alto grau de endividamento têm sido apontados como indicativos da crise em distintos levantamentos realizados (NOVACANA, 2019; UNICA, 2019). No mesmo sentido, a União da Indústria de Cana de Açúcar (UNICA) aponta aumento do custo de produção em 70%, entre 2007

e 2012, em termos nominais, sendo este o fator central da crise (Dos SANTOS et al., 2016).

Santos, Garcia e Shikida (2015) destacam que, embora tenham sido instaladas 116 novas indústrias em todo o país, entre as 58 com atividades paralisadas até a o final de 2014, 21 localizam-se em regiões de baixa produtividade da cana – rendimento agrícola médio de 40 t/ha a 70 t/ha, historicamente dependentes de subsídios à produção (região Nordeste, estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato Grosso e parte de Minas Gerais). Contudo, apontam que as dificuldades econômicas estão em todas as regiões, sendo que 37 plantas paralisadas (64%) encontram-se no Centro-Sul, inclusive 22 em São Paulo, onde a atividade produtiva é mais dinâmica e com maiores investimentos.

Compilando os dados de produtividade do etanol por safra fornecidos pelo portal da UNICA é possível ver os períodos de crise e expansão do setor (Figura 1). Nota-se que os períodos de recuo no setor nos últimos tempos estão relacionados aos períodos de crise política do país, refletindo na safra 2011/2012 e 2016/17. Embora a situação econômica do Brasil ainda esteja variando, a mentalidade do novo governo em relação as questões ambientais a partir de flexibilização da legislação ambiental e da aprovação de muitos defensivos agrícolas pode corroborar para um crescimento ainda maior da produção de etanol.



Figura 1: Produtividade de etanol no período de 1980 a 2015. Unidade: Mil m³.

Fonte: Autoria própria a partir de dados fornecidos pela UNICA.

Hoje em dia o setor sucroalcooleiro tornou-se o reflexo de uma ambiguidade ideológica; ao mesmo tempo em que o etanol ganha força novamente no cenário mundial, após o acordo de Paris em 2015 para redução de emissão de gases causadores de efeito estufa, o impacto ambiental causado pelo setor aumenta devido a flexibilização da legislação ambiental e maior uso de defensivos agrícolas. Contraditoriamente, investimentos tecnológicos e a redução dos impactos ambientais são os fatores que impediram o colapso do setor no futuro. Estudos sobre o uso da vinhaça é um exemplo, um manejo mais adequado desse resíduo e previsões sobre o impacto do atual uso pode ajudar as usinas, a longo prazo, reduzir custos.

2.2. Vinhaça de cana-de-açúcar em solos

Após a proibição do descarte da vinhaça em águas, muitos produtores de cana passaram a utilizar a vinhaça como uma alternativa mais barata para fertilizar seus solos. Esta estratégia obteve relativo sucesso, visto que a vinhaça apresenta grande potencial para utilização em solos agrícolas, principalmente na forma de fertirrigação das lavouras, devido ao seu alto teor de matéria orgânica, potássio, cálcio, magnésio e sódio, gerando assim bons resultados na produtividade agrícola e, conseqüentemente, retorno econômico (BEBÉ et al., 2009; DE MENDONÇA-CASADEI et al., 2015; PEDROSA et al., 2005).

Evidências a partir da literatura indicam que a vinhaça de cana pode modificar várias propriedades químicas do solo, tais como: pH do solo, potencial redox (Eh) da solução intersticial, teores de sais, concentração de matéria orgânica (Demanda Biológica de Oxigênio – DBO e Demanda Química de Oxigênio – DQO), capacidade de troca catiônica (CTC), concentração de metais tóxicos como cádmio, chumbo, cobre, cromo e níquel, concentração de amônia, entre outros (CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

A contribuição da matéria orgânica para a troca catiônica do solo reside principalmente na carga negativa originada da dissociação do H dos grupos COOH, as reações de troca catiônica e o complexo esfera externa pelo mecanismo da interação eletrostática (DICK et al., 2009). A participação de cada um desses mecanismos de reação na interação de compostos orgânicos com os minerais depende da mineralogia, das condições de pH, força iônica e cátions presentes na solução do solo e no complexo sortivo; bem como da composição, estrutura e conformação do composto orgânico (DICK et al., 2009)

Em relação às propriedades físicas do solo, a vinhaça tem comportamentos diferentes. Rolling e Freire (1997) observaram modificação da distribuição de tamanho

das partículas em solos arenoso e argiloso depois da aplicação de vinhaça em porcentagens de 12, 16 e 20% da massa do solo. Porém, a agregação das partículas também sugere modificações na geometria dos poros e, conseqüentemente, nas propriedades físicas dos solos. Já Camargo et al. (1983) e Andrioli (1986) não observaram alterações em relação à porosidade e densidade dos solos que receberam vinhaça.

Silva et al. (2007) confirmaram essa ambigüidade de ações na vinhaça afirmando que ao promover modificações nas propriedades físicas do solo, a vinhaça pode tanto elevar a capacidade de infiltração da terra, aumentando a porosidade, contaminando as águas subterrâneas, como diminuí-la, promovendo o aumento do escoamento, com possível contaminação de águas superficiais.

Estudos de Zolin et al. (2011) avaliaram as modificações da densidade do solo, densidade de partícula, porosidade total, armazenamento e disponibilidade de água para a cultura de cana-de-açúcar, entre outros fatores, pela aplicação de vinhaça ao longo dos anos em uma área experimental. Os autores não observaram nenhuma mudança significativa.

Essa dualidade de efeitos da vinhaça também se dá nas propriedades hidráulicas do solo. RIBEIRO et al. (1983) e UYEDA et al. (2013) observaram que, em geral, o acréscimo da vinhaça em solos de textura média pode ocasionar o aumento da condutividade hidráulica, enquanto que em solos de textura fina pode ocasionar o efeito contrário.

De maneira geral, vários estudos afirmaram que elevadas doses de vinhaça aplicadas aos solos contribuem para o aumento da capacidade de troca catiônica, da porcentagem de saturação de bases e para a elevação do índice de pH do solo, promovendo melhoria em sua fertilidade (SANTOS et al., 1981; BIANCHI et al., 2008; BARROS et al., 2010).

Contudo sabe-se que o pH ácido da vinhaça se dá pela adição de ácido sulfúrico (H_2SO_4) para evitar contaminação nos fermentadores nas usinas. A acidificação do pH do solo foi observada por Basso et al. (2016) em ensaios com percolação da vinhaça *in natura* em colunas contendo solos arenosos da Formação Rio Claro; os experimentos foram iniciados com valores de pH do solo levemente ácidos (5,7) percolado por água; após a adição de vinhaça, os valores de pH do efluente diminuíram ao longo do ensaio, até atingir valores próximos ao pH da vinhaça inicial (4,1). Segundo os autores não houve biodegradação da matéria orgânica, possivelmente devido ao curto tempo de ensaio e às condições controladas de temperatura, em torno de 20°C.

Como a vinhaça tem alto teor orgânico, sua decomposição pelos micro-organismos do solo aumenta gradualmente o pH do solo. Entretanto, uma pergunta que deve ser levada em consideração é se esse tempo de degradação existe na realidade, devido às altíssimas quantidades de vinhaça que são lançadas diariamente nas culturas. Outra preocupação que deve ser levada em conta são os processos de salinização do solo que pode levar a uma desertificação ao longo dos anos, além de uma perda na produtividade. Na norma técnica P 4.231/3^a ed., 2015 da CETESB, observa-se essa preocupação, uma vez que regulamenta a aplicação de vinhaça pelo teor de potássio nesse resíduo e no solo no qual será lançada. Infelizmente a fiscalização é baixa e muito difícil de cobrir as extensas áreas utilizadas por essa monocultura.

O íon potássio é um íon móvel nos solos e, como tal, quantidades significativas podem ser perdidas por lixiviação, afetando a eficiência dos fertilizantes aplicados (ALFARO et al., 2004b). O aumento dos custos com fertilizantes e questões relacionadas à qualidade das águas subterrâneas estão trazendo impactos econômicos e ambientais (SHARMA; SHARMA, 2013). O íon tem recebido pouca atenção, pois sua lixiviação não resulta diretamente em eutrofização (ALFARO et al., 2004a). A fração solúvel em água de K^+ está prontamente disponível para as plantas e é propensa à lixiviação, especialmente em solos de textura grossa (SHARMA; SHARMA, 2013). Pieri e Oliver (1986) concluíram que o risco de perdas por lixiviação de potássio sob condições tropicais úmidas era muito alto, especialmente quando doses elevadas de fertilizantes eram aplicadas em solos com drenagem livre e com baixa capacidade de troca de cátions. Para Kolahchi e Jalali (2006), uma das justificativas para se estudar a movimentação do potássio no solo está na sua implicação em relação à eficiência do uso do fertilizante, além disso, as concentrações do elemento podem aumentar substancialmente nas águas subterrâneas pelo processo de lixiviação em áreas usadas para fins agrícolas.

Portanto, estudos que avaliem o comportamento da vinhaça e seus efeitos no solo ao longo dos anos de aplicação são de extrema importância.

2.3. Diplópodos como bioindicadores de solo

Os Myriapoda compreendem os táxons traqueados Chilopoda, Symphyla, Pauropoda e Diplopoda. De forma geral, esses animais possuem um corpo constituído por uma cabeça dotada de um par de antenas e olhos laterais simples e um tronco alongado composto por muitos segmentos portadores de pernas (RUPPERT et al., 2005). Dentro desse grupo, destaca-se a classe Diplopoda, a qual se configura como a terceira maior

classe de artrópodes terrestres, com 11.000 espécies descritas e uma estimativa de 80.000 espécies viventes, sendo que a maior parte dessa diversidade estimada está contida em países tropicais (RUPPERT et al., 2005; GOLOVATCH; KIME, 2009). Tais animais são denominados diplópodos ou milípedes, devido ao grande número de pernas que possuem, mas também recebem designações regionais como “piolhos-de-cobra”, “embuás” e “gongolôs”.

Quanto ao hábito alimentar, os diplópodos são majoritariamente saprófagos, se alimentando de detritos, matéria orgânica em decomposição, frutas, musgos e relativa quantidade de matéria mineral do solo (HOPKIN; READ, 1992). Sendo assim, são animais importantes da macrofauna do solo, pois ocupam o nível trófico de decompositores, participando da ciclagem e disposição de nutrientes presentes na matéria orgânica em decomposição, auxiliando no processo de humificação do solo (PETERSEN; LUXTON, 1982). Por meio de suas fezes, eles promovem a mineralização, uma vez que secretam amônia e ácido úrico, que quando degradados, enriquecem o solo com nitratos (SCHUBART, 1942; GODOY; FONTANETTI, 2010). Desse modo, estimulam o metabolismo microbiano, essencial para a ciclagem de 10 nutrientes, como carbono, nitrogênio e fósforo, além de promoverem a aeração ativa do solo (HOPKIN; READ, 1992).

Nos últimos 20 anos os diplópodos vem ganhando destaque em pesquisas de ecotoxicologia de solo por uma série de razões: (a) são componentes da fauna edáfica e estão continuamente expostos a contaminantes do solo; (b) há um grande número de representantes distribuídos em todo o mundo; c) a maioria das espécies de diplópodos é relativamente grande e, portanto, de fácil manuseio, permitindo assim, serem usados tanto em condições laboratoriais como de campo para biomonitoramento; e (d) os efeitos biológicos de contaminantes ambientais podem ser mensuráveis em vários níveis de organização biológica (SOUZA et al., 2014).

Devido ao seu hábito alimentar e seu comportamento, o solo e seus componentes entram em contato direto com o intestino e devido à essa interação, o intestino é um dos principais órgãos de investigação da toxicidade. O trato digestório de diplópodos é descrito como um tubo reto e cilíndrico que se estende da boca até o ânus, não acompanhando a segmentação corporal. É dividido em três regiões: anterior, média e posterior. A porção média é a que possui maior atividade, participando nos processos de detoxicação e excreção de xenobióticos (FONTANETTI et al., 2015), pois funciona como uma barreira, impedindo que compostos tóxicos ou não essenciais, alcancem o restante

do corpo (FONTANETTI, et al., 2015). Entretanto ao ingerirem solo contaminados, compostos indesejáveis podem ultrapassar a barreira criada pelo epitélio, promovendo diversas alterações.

Foram estudados por Godoy e Fontanetti (2010), Perez e Fontanetti (2011), Nogarol e Fontanetti (2010; 2011) e Bozzatto e Fontanetti (2012) alterações teciduais no intestino médio do diplópodo *Rhinochricus padbergi*, decorrentes da sua exposição a solo contaminado com diferentes proporções de lodo de esgoto. Souza e Fontanetti (2011) também avaliaram as alterações após exposição a solo contaminado com landfarming, um resíduo oriundo das refinarias de petróleo. Merlini et al. (2012) avaliou a toxicidade do herbicida trifluralina, utilizando *R. padbergi* como biondicador, por meio de alterações histopatológicas do intestino médio. As respostas mais significativas observadas nestes trabalhos foi aumento na taxa de renovação epitelial, aumento na liberação de vesículas de secreção para o lúmen, acúmulo de grânulos intracitoplasmáticos nas células hepáticas e aumento na ocorrência de hemócitos por entre as células hepáticas.

Christofoletti et al. (2016) expuseram diplópodos *R. padbergi* a combinações de solo com adições de vinhaça e biossólido e observou intensas reações no intestino médio como espessamento do bordo em escova, aumento na renovação epitelial, nos grânulos nas células hepáticas e acúmulos de hemócitos.

Coelho et al. (2017) foram um dos primeiros a realizar a imunomarcagem de HSP70 em intestino médio de milípedes expostos à vinhaça e ao biossólido. Os autores observaram um maior aumento da imunomarcagem nos animais expostos à vinhaça em comparação ao biossólido e ao controle. As regiões mais marcadas foram as regiões envolvidas em funções protetoras e que atuam na detoxificação, como as células hepáticas e regiões apical e basal das células epiteliais.

As diversas alterações observadas pelos diferentes autores podem ser interpretadas como mecanismos de defesa do organismo, relacionado com processo de neutralização e eliminação de resíduos tóxicos. Portanto, as alterações encontradas no intestino médio podem ser indicativos de contaminação ambiental e podem ser consideradas excelentes biomarcadores. Os diplópodos também já foram utilizados com sucesso como indicadores da presença de metais como cádmio, chumbo e zinco no solo (READ; MARTIN, 1990; KÖHLER; ALBERTI, 1992), e em virtude disso são considerados organismos-teste fundamentais para realizar a avaliação das diferentes camadas do solo (SOUZA et al., 2014).

2.4. *Oreochromis niloticus* como bioindicador aquático

Para análise das condições ambientais no meio aquático, muitos organismos-teste vêm sendo utilizados como os peixes, moluscos, crustáceos, dentre outros (NOGAROL; FONTANETTI, 2012; CHRISTOFOLETTI et al., 2013b; MARCATO et al., 2014; CORREIA et al., 2017a). 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.

Embora nem sempre sejam considerados os organismos aquáticos mais sensíveis aos estressores químicos, possuem ampla variação de comportamento e habitat, que aumentam seu potencial para a exposição a substâncias tóxicas (RAND, 2008; FRANÇA, 2009). 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.

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 aqüiculturas 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 (CHARO-KARISA et al., 2006; 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, 11 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 malabaricus* 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 (SOUZA; FONTANETTI, 2006; BIAGINI et al., 2009; ABDEL-MONEIM et al., 2012; CARVALHO et al., 2012; MARCATO et al., 2014; MOHAMED; OSMAM, et al., 2014; YEŞILBUDAK; ERDEM, 2014).

Correia et al. (2017a) observaram os efeitos agudos da vinhaça nas brânquias de *O. niloticus*. Os resultados revelaram a ação tóxica da vinhaça, uma vez que foram observadas alterações histopatológicas em nível ultramorfológico, com redução das cristas das células pavimentosas, e em nível histológico, com desprendimento e desorganização epitelial. Foi observado também um aumento significativo das células mucosas entre os animais do grupo controle e aqueles das diluições testadas.

Correia et al. (2017b) avaliaram a eficácia do tratamento da vinhaça pela correção de seu pH utilizando cal (CaO), produto relativamente barato e utilizado nas lavouras. Os autores observaram potencial genotóxico de diluições de vinhaça *in natura*, uma vez que essa induziu taxas significativas de micronúcleo em tilápias e mortalidade elevada; nas amostras de vinhaças tratadas, com pH neutro/alcalino, houve uma menor taxa de micronúcleos e redução da mortalidade.

Coelho et al. (2017) observaram alterações histopatológicas em fígados de tilápias expostas ao lixiviado da vinhaça a 2,5%. Os autores observaram também um aumento

significativo na expressão da proteína de choque térmico HSP70 imunomarcadas no fígado.

2.5. Teste do micronúcleo e ensaio do cometa como ferramentas no monitoramento ambiental

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 envelope 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, 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 de 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 seguidas 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 (2004) há mais dois tipos de alterações nucleares, 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 é 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; SEVIL et al., 2013); os eritrócitos, 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 de substâncias e a qualidade da água (AL-SABTI; METCALFE, 1995; GRISOLIA; STARLING, 2001).

Osman et al. (2011), Ozkan et al. (2011) e Ragugnetti et al. (2011) e Correia et al. (2017a) avaliaram o potencial genotóxico da água do rio Nilo, da substância Ibuprofen, doses subletais de cádmio, e da vinhaça 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.

O ensaio do cometa é outro 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 teste 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 pólo positivo (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 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 (COLLINS et al., 2014).

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 da atrazina em *C. auratus* e do inseticida malathion em *C. punctatus*. Hoshina e Marin-Morales (2011) e Souza e Fontanetti (2012) avaliaram a toxicidade da água do rio Paraíba do sul próximo a uma refinaria de petróleo em Paulínia, São Paulo, e do efluente dessa refinaria, 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. Portanto, a utilização desses dois testes é fundamental para uma avaliação genotóxica, além de serem técnicas razoavelmente simples e rápidas.

2.6. Estresse Oxidativo na investigação do impacto ambiental

As células são constantemente expostas a possíveis danos causados por radicais livres. As principais moléculas responsáveis por esses danos são as espécies reativas de oxigênio (EROs), moléculas muito reativas e que podem ser produzidas na própria célula

através de processos metabólicos, ou extracelularmente por exposição à radiação ultravioleta ou ionizante. Seus alvos podem ser o DNA, lipídeos e proteínas, mas as células possuem mecanismos para capturar esses radicais livres diminuindo os efeitos danosos que elas possam causar, mantendo a homeostase celular (EVANS et al., 2004).

Eventualmente essas moléculas escapam dessas defesas e levam a danos que podem ser corrigidos ou não. Quando esses danos oxidativos atingem o DNA, eles podem ser corrigidos por excisão de base, porém ao longo da vida os danos basais que não são corrigidos se acumulam e estão estritamente relacionados com o envelhecimento, e com eventos mutagênicos e carcinogênicos que levam a uma produção de radicais livres e de danos oxidativos no DNA, além da capacidade de reparo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Os primeiros estudos relacionados a danos oxidativos no DNA começaram na década de 80 com a descoberta da formação da 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OH-dG) quando se estudava formação de adutos de DNA (KASAI; NISHIMURA, 1983), levando a grandes quantidades de estudos sobre o tema.

Radicais livres, principalmente radicais OH⁻, reagem com compostos orgânicos adicionando ou roubando elétrons. Quando interagem com o DNA, esses radicais preferem os sítios de ligação com a maior densidade de elétrons (EVANS, 2004). No caso das citosinas, a adição do radical hidroxila ocorre quebrando a ligação dupla entre o carbono 5 e o carbono 6 da desoxirribose, e pode ser adicionada no carbono 5 (87%) ou no carbono 6 (10%); nas timinas 60% ocorre no C5 e 30% no C6, e aproximadamente, em 10% a hidroxila rouba um átomo de hidrogênio do grupo metil (FUJITA; STEENKEN, 1981; HAZRA; STEENKEN, 1983). Esses adutos de pirimidinas podem ser oxidados ou reduzidos, formando compostos que afetam a estrutura do DNA e levam a quebras nas fitas e possíveis erros no quadro de leitura.

Nos nucleotídeos purínicos, a adição do grupo hidroxila ocorrem nos carbonos 4, 5 e 8 nas guaninas e nos carbonos 4 e 8 nas adeninas (O'NEILL, 1983; STEENKEN, 1989; VIEIRA; STEENKEN, 1990; CANDEIAS; STEENKEN, 2000). Esses adutos diferem no seu potencial redox, adutos C4-OH⁻ são oxidados e os C5-OH⁻ e C8-OH⁻ são reduzidos (EVANS et al., 2004).

Mais de 20 diferentes tipos de danos nas bases do DNA foram identificados após a exposição dessa biomolécula às diversas formas de estresses oxidativos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SLUPPHAUG et al., 2003). A guanina, que exibe o menor potencial de ionização entre as bases nitrogenadas, tem sido a escolha preferencial dos estudos das

reações de oxidação das purinas, uma vez que existem metodologias eficientes para a sua detecção. Desta forma, a guanina vem sendo utilizada como um bom exemplo de oxidação de bases nitrogenadas (BERRA et al., 2006).

A guanina oxidada tem grande importância biológica, uma vez que pode causar emparelhamento errôneo com a adenina, gerando uma transversão de GC para TA. Além disso, aparentemente 8-oxodGuo é capaz de bloquear a transcrição (LE PAGE et al., 2000).

Sabe-se que reparo de DNA está intimamente interligado com regulação do ciclo celular, transcrição e replicação, e que esses mecanismos usam, em parte, fatores comuns (SLUPPHAUG et al., 2003). Quando o tipo e a quantidade de danos superam a capacidade de reparo das células, esses mecanismos celulares essenciais podem ser seriamente afetados. Sendo assim, caso essas lesões não sejam removidas, podem levar as células à morte, ou resultarem na incorporação de mutações no genoma, sendo transmitidas para as gerações futuras. Mais ainda, essas mutações podem provocar efeitos genotóxicos severos e, conseqüentemente, gerar instabilidade genômica e até aparecimento de câncer (COSTA et al., 2003).

Além de induzir substituição de bases e erros na matrix de leitura, gerando mutações se essas não forem corrigidas, esses danos oxidativos podem levar a instabilidade de microssatélites (ZIENOLDDINY et al., 2008). Em células normais o tamanho das sequências repetitivas de DNA são constantes, porém em células tumorais, o tamanho dessas sequências é variável. O dano oxidativo no DNA aumenta a instabilidade de microssatélites e está relacionada a descontínua perda de heterozigose (JACKSON et al., 1998; TURKER et al., 1999).

Agentes que geram dano oxidativo no DNA também induzem a expressão gênica, destacando-se a expressão de protooncogenes. Porém não está claro se danos no DNA por si próprio tenham algum efeito na expressão gênica, como um feedback direto, ou se a produção de EROs geradas por estresse oxidativo sejam capazes de ativar a expressão gênica, uma vez que são reconhecidas como sinais intracelulares.

Assim como dito anteriormente, as EROs também podem atacar lipídeos e proteínas. A geração de radicais de oxigênio, induzida por compostos químicos diversos, pode comprometer os componentes celulares que envolvem resíduos de ácidos graxos poli-insaturados de fosfolipídios, os quais, devido às suas ligações duplas, são extremamente sensíveis à oxidação pelas EROs (MARNETT, 1999). A partir das reações

em cadeia que envolvem os lipídios, ocorre o processo de peroxidação lipídica (VALAVANIDIS et al., 2006).

A peroxidação lipídica é considerada o mecanismo que mais causa danos celulares, pois gera grandes quantidades de EROs, com a interferência de fontes endógenas e/ou exógenas, e provocam vários efeitos biológicos (SHAD; IQBAL, 2010). Para Green e Reed (1998), esse mecanismo pode ser citotóxico, quando ocorrer na membrana das mitocôndrias, pois ele altera a atividade enzimática e a produção de ATP, além de iniciar o processo de apoptose. Segundo Gutteridge e Halliwell (1990) e Kohen e Nyska (2002), a peroxidação lipídica é um processo autocatalítico que envolve três eventos distintos: iniciação, propagação e terminação, cujo produto final é a formação de aldeídos e hidrocarbonetos.

Os danos oxidativos às proteínas podem resultar na modificação de atividades enzimáticas celulares, em alterações nas concentrações de cálcio e potássio intracelular e na modificação da transferência de sinal nas células (KLAUNIG et al., 2011). É importante destacar, ainda, que a oxidação de proteínas está diretamente associada a algumas doenças relacionadas à idade e ao envelhecimento (STADTMAN, 2001). O acúmulo de proteínas oxidadas pode ser decorrente do aumento do nível de ERO ou da diminuição da atividade antioxidante de um organismo. Também, pode ser derivado da capacidade reduzida de degradação de proteínas oxidadas, devido a um decréscimo nas concentrações de proteases e/ou a um aumento dos níveis de inibidores de proteases (VALKO et al., 2006). Esta perda na capacidade de degradação de proteínas oxidadas, durante o envelhecimento, implica em efeitos negativos sobre os mecanismos de transcrição e tradução proteica (DUIKAN et al., 2000).

Como nas células a produção de EROs é constante devido as reações metabólicas, a própria célula tem mecanismos para se proteger de possíveis danos. Os antioxidantes são moléculas que protegem o organismo da ação danosa dos radicais livres. O sistema celular de defesa antioxidante pode envolver tanto as enzimas catalase como a glutathione peroxidase dependente de selênio, a glutathione peroxidase total, a glutathione S-transferase e outras moléculas não enzimáticas como chaperonas da família HSP (proteínas de choque térmico), vitaminas e carotenóides, que têm a função de equilibrar a concentração de EROs a fim de minimizar as lesões ocasionadas pela sua ação. Este sistema mantém o equilíbrio redox celular pela eliminação do acúmulo e pela supressão da ação das EROs no interior das células (BONT et al., 2004). O aumento da produção de EROs está

relacionado com o aumento da atividade dos antioxidantes, que protege o organismo contra os danos oxidativos (WINSTON; GIULIO, 1991).

A SOD (superóxido dismutase) é uma das enzimas antioxidantes intracelulares mais eficientes, pois catalisa a dismutação de $O_2^{\cdot-}$ para O_2 e H_2O_2 (MCCORD; FRIDOVICH, 1969), protegendo o citocromo C, ao reduzir o radical superóxido e diminuir a presença dos radicais livres. A SOD é caracterizada por apresentar um metal na sua estrutura, e é encontrada nos compartimentos subcelulares que são alvos do estresse oxidativo mediado por EROs, em todos os organismos aeróbicos (GILL; TUJETA, 2010)

A GSH (glutathiona reduzida) é um composto tiol, que possui uma ligação de três aminoácidos (cisteína, ácido glutâmico e glicina), que desempenha a função de proteger as células e os tecidos contra os efeitos oxidativos. Ela pode ser encontrada de duas formas, livre ou ligada a proteínas, e está presente em quase todos os mamíferos, principalmente, no fígado.

Em condições fisiológicas, a GSH é encontrada no núcleo, no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias (MASELLA et al., 2005). Em eucariontes, a GSH está envolvida na desintoxicação de EROs e de contaminantes químicos, no qual desempenha um papel importante na proliferação e morte celular e, também, em diversos processos que envolvem o DNA e proteínas (GHANTA; CHATTOPADHYAY, 2011).

A glutathiona redutase (GR) é uma flavoproteína que utiliza NADPH como fonte de prótons e elétrons, para reduzir a glutathiona dissulfeto (GSSG) em sulfidril GSH, que é um importante antioxidante celular (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). De acordo com Tandogan et al. (2011), o sistema de defesa celular pode ficar comprometido, se houver alterações na atividade dessa enzima, que acarretará em efeitos danosos, como o estresse oxidativo celular. A presença de substâncias químicas, drogas ou substratos naturais podem influenciar na ativação ou inibição da propriedade redox dessa enzima. Caso ocorra a inibição da GSH, a relação GSH/GSSG diminui, favorecendo a ação do estresse oxidativo e o desenvolvimento de algumas doenças (TANDOGAN et al., 2011).

A GPx (glutathiona peroxidase) foi a primeira enzima antioxidante encontrada em mamíferos, sendo também a mais freqüente na maioria de suas células (ROTRUCK et al., 1973). Ela contém selênio-cisteína, como centro ativo, e, em casos de baixos níveis de selênio, ocorre a diminuição da sua atividade antioxidante (HAMANISHI et al., 2004). Sua função é promover a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos, utilizando a GSH para excretar as espécies reativas de oxigênio dos tecidos e proteger as

membranas biológicas e as estruturas moleculares da ação dos danos oxidativos (LEI et al., 2007). Segundo alguns autores, a GPx é um biomarcador eficaz para indicar situações de estresse na presença de compostos orgânicos e inorgânicos (COGO et al., 2009), para investigar o sistema de defesa antioxidante e seus danos oxidativos em diversos grupos de agrotóxicos, como os inseticidas organofosforados (ALMEIDA et al., 2010), inseticidas carbamatos (MARAN et al., 2010) e os bio-inseticidas (PEREZ-PERTEJO et al., 2008), e para estudos de ação biológica de efluentes urbanos e industriais (TSANGARIS et al., 2011).

As ubíquas proteínas de estresse celular (também referidas como proteínas de choque térmico ou HSP) foram reconhecidas como sendo um dos mecanismos de defesa primários a oxidantes, toxinas, metais, radicais livres, vírus, entre outros, sendo sua síntese geralmente aumentada nestas condições estressantes (BIEKERNS et al., 2000; PONOMARENKO et al., 2013). Em condições normais, as HSPs constitutivas atuam como chaperonas moleculares em importantes processos celulares como o metabolismo proteico, a regulação do ciclo celular e a apoptose (KIANG, TSOKOS, 1998; HIGHTOWER, 1991; RICHTER et al., 2010). Neste grupo, destaca-se a família HSP70 (peso molecular de 70kDa) por ser a mais altamente conservada e extensivamente estudada, sendo que vários estudos nos últimos anos demonstraram o seu imenso potencial em monitorar a poluição ambiental, diante de seu papel citoprotetor em resposta a agentes proteotóxicos (MUKHOPADHYAY et al., 2003).

Sendo assim, analisando o aumento ou diminuição na concentração de moléculas antioxidantes é possível medir o aumento do estresse oxidativo gerado por algum xenobiótico.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o impacto que a vinhaça pode provocar em áreas que a recebam como fertilizante há 5, 15 e 30 anos, aproximadamente, de modo a avaliar se a vinhaça, ao longo dos anos, promove, ou não, o aumento da toxicidade, tanto para o solo quanto para águas subterrâneas.

Os objetivos específicos constituem:

- Exposição de espécimens do diplópodo *Rhinocricus padbergi* à solos coletados em áreas de diferentes tempos de utilização de vinhaça, a fim de analisar morfológica, histoquímica e imunohistoquimicamente os efeitos causados no intestino médio destes animais, local onde ocorre a digestão.

- Estudo a mobilidade do íon potássio no perfil de solo para entender se os anos de aplicação de vinhaça alteram a mobilidade e disponibilidade desse íon do solo.
- Análise se o lixiviado da vinhaça muda nos diferentes solos.
- Avaliação do potencial genotóxico do lixiviado da vinhaça em peixes (tilápias) pela quantificação de células que apresentam anormalidades nucleares e eritrócitos micronucleados em sangue periférico, assim como danos primários, por meio do ensaio do cometa.
- Análise da toxicidade do lixiviado da vinhaça em fígados de tilápias por meio da histopatologia e histoquímica.
- Quantificação algumas proteínas de estresse oxidativo em fígado de tilápias expostas às concentrações do lixiviado da vinhaça.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Áreas de estudo

Para avaliar como se dá a toxicidade da vinhaça ao longo do tempo foram selecionadas três áreas de cultura canavieira da mesma região que receberam vinhaça como fertilizante há diferentes anos (5, 15 e 30 anos, aproximadamente) e duas áreas de referência sem atuação canavieira, denominados S5, S15 e S30 respectivamente.

4.2. Materiais Biológicos

Para a realização do bioensaio de toxicidade terrestre foram utilizados espécimes adultos da espécie *R. padbergi* (Diplopoda), popularmente conhecido como piolho-de-cobra, coletados em amostras de solo controle, dentro do Câmpus da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro-SP.

Peixes da espécie *O. niloticus* (Perciformes, Cichilidae), conhecida popularmente como tilápia-do-Nilo, foram utilizadas neste trabalho como organismo teste no bioensaio de toxicidade aquática. Os espécimes, oriundos de piscicultura, foram trazidos ao Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Rio Claro, e aclimatados em tanque, a temperatura média de 23°C, com sistemas de filtragem e aeração.

4.3. Amostras de solo

Uma parte das amostras de solo coletadas nas quatro áreas foram enviadas para análise químicas, físico-químicas em um laboratório de análises ambientais para

quantificação de metais (As, Ba, Cd, Cu, Cr, Fe, Hg, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se e Zn), macro e micronutrientes (N, Ca, P, K, S), relação carbono/nitrogênio (C/N), matéria orgânica, capacidade de troca catiônica (CTC). Foi analisado também o potencial agrônomo (condutividade elétrica, carbono orgânico, fósforo total, nitrogênio Kjeldahl, nitrogênio amoniacal, nitrogênio nitrato/nitrito, pH em água (1:10), potássio total, sódio total, enxofre total, cálcio total, magnésio total, umidade, sólidos voláteis e sólidos totais).

O restante do solo coletado foi seco a temperatura ambiente e peneirado em peneira com malha de 4 mm para montagem do bioensaio utilizando *R. padibergi* como bioindicador e para a montagem dos ensaios de física de solo.

4.4. Curva de retenção de água no solo

Foram coletadas amostras indeformadas de solo, em triplicata, em anéis de aço inoxidável de dimensões de 3,0 cm de altura, 4,7 cm de diâmetro a uma profundidade de 40cm. As amostras foram então saturadas em bandeja com água destilada para eliminação de bolhas de ar. Para determinação dos pontos da curva de retenção, as amostras foram submetidas a diferentes tensões em câmara de pressão de Richards (100 à 15000 hPa). Os parâmetros θ_r , n e α foram obtidos com auxílio do software Retention Curve (RETC) (Van GENUCHTEN et al., 1991), seguindo a equação de Van Genuchten (1989):

$$\theta = \theta_r + \frac{\theta_s - \theta_r}{\left[1 + (\alpha|\psi_m|)^n\right]^m}$$

$$m = 1 - \frac{1}{n}$$

Em que,

θ - Umidade volumétrica ($\text{cm}^3 \text{ cm}^{-3}$);

Ψ_m - Potencial matricial (hPa);

θ_r - Umidade residual ($\text{cm}^3 \text{ cm}^{-3}$);

θ_s - Umidade na saturação ($\text{cm}^3 \text{ cm}^{-3}$);

m e n - Parâmetros de ajuste.

4.5. Ensaio experimental em coluna segmentada

Um ensaio experimental foi montado em laboratório em que a vazão de entrada e a concentração de aplicação de solutos fossem conhecidas para que se pudesse analisar cada camada de solo separadamente em determinado instante. Para tanto, foram utilizadas

colunas segmentadas de acrílico, que receberam, em seu interior, um tratamento com areia, com o objetivo de aumentar sua rugosidade e evitar possíveis fluxos preferenciais durante os ensaios.

A coluna foi composta por oito anéis de 7 cm de altura e um anel superior de 5 cm de altura. O anel superior tem a função de proteção no momento da aplicação e de auxiliar na verificação da formação de uma possível lâmina da solução aplicada. A coluna foi preenchida de forma homogênea e uniforme e uma fita adesiva foi utilizada para vedar e unir um anel ao outro. Sobre a superfície do solo, no primeiro anel, foi colocada uma manta acrílica de forma circular, de área igual a área da seção interna da coluna, para que não ocorresse selamento da camada superficial, devido ao gotejamento de vinhaça, e para melhorar a distribuição de aplicação sobre a superfície do solo. Todo o material (coluna vazia, manta acrílica e as fitas adesivas) foi pesado antes e depois do preenchimento da coluna, para obtenção da densidade do solo nas colunas. O ensaio foi realizado em triplicata para todos os solos coletados.

Após montagem na coluna (Figura 2) foi aplicada vinhaça a uma vazão de 1,17 ml/min; o fluxo foi interrompido após coleta do lixiviado ao final do oitavo anel. Depois de decorrido esse tempo de aplicação, relativo para cada tipo de solo, os anéis foram desmontados rapidamente e separados em recipientes numerados. Em seguida, de cada recipiente, foi retirada uma pequena amostra de solo para determinação do conteúdo de água e foi feita a pasta de saturação, determinando-se novamente o conteúdo de água. Por fim, foi determinado o teor dos solutos para cada anel, permitindo a elaboração de perfis desses valores ao longo de toda a coluna de solo. O teor de água foi obtido pelo método gravimétrico, pesando as amostras de solo de cada anel, secando-as em estufa a 110°C por 24 horas e pesando-as novamente.



Figura 2 – Coluna segmentada contendo solo fertirrigado por vinhaça durante 30 anos.

4.6. Análise de metais no lixiviado da vinhaça

Após decorrido o tempo de percolação da vinhaça pela coluna segmentada e a coleta do lixiviado após o oitavo anel em potes plásticos, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Solos da ESALQ (Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”) para quantificação de metais (Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Si, Zn).

4.7. Análise de concentração de potássio

Para análise da concentração de potássio, as soluções obtidas pela extração da pasta de cada anel de cada coluna, foram submetidas a um fotômetro de chama ajustado e calibrado por meio de curva de calibração para o potássio com soluções em concentrações 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 ppm.

4.8. Ensaio de colunas para BTC (Breakthrough Curve)

Para ser possível modelar o comportamento dos íons potássio foi necessário calcular seus parâmetros de transporte, obtidos por meio do ensaio de coluna de BTC. Foram utilizadas colunas de PVC, com as dimensões de 20 cm de altura e 5 cm de diâmetro, as quais foram preenchidas com os solos que receberam vinhaça durante diferentes anos (5, 15 e 30 anos) e um solo referência, em camadas constantes, equivalentes e homogêneas nas mesmas densidades obtidas nos ensaios em coluna. Um dreno foi instalado na parte superior da coluna com a função de manter a carga hidráulica

de 1 cm, e na parte inferior, um círculo de manta geotêxtil e uma grade metálica, fixados por um “cap”, com a função de dar o suporte de sustentação do solo dentro da coluna.

Após isto, as amostras foram saturadas por capilaridade com água deionizada de maneira lenta e ascendente. As colunas foram posicionadas verticalmente em um balde com volume de água deionizada cerca de 2/3 da altura da coluna de solo. Depois disso, o conjunto permaneceu em repouso por cerca de 24 horas para a saturação.

Após a saturação, iniciou-se o processo de “lavagem” do solo, o qual consiste na passagem de água deionizada através da coluna durante um período de 24 horas para que a maioria dos íons, presentes no complexo de troca e facilmente solúveis, fosse dissolvida e removida pela água percolante. Montado desta forma, as colunas se comportaram como permeâmetros de carga constante, sendo possível, portanto, determinar a condutividade hidráulica do solo saturado.

Em seguida, foi aplicada vinhaça com uma vazão constante. Foram então coletados volumes sequenciais de efluentes de 15 mL em frascos de acrílico. Cada frasco coletado representando uma pequena fração do volume total de poros do solo na coluna (VP). Os volumes de poros foram calculados em função do volume da coluna preenchida por solo ($392,7 \text{ cm}^3$) e da porosidade do solo. O ensaio foi interrompido quando a concentração de entrada foi a mesma na saída.

Após realizada a curva de distribuição de efluentes foram calculados os parâmetros de transporte: número de Peclet (P), coeficiente de dispersão (D), número de Peclet em função da dispersividade ($\lambda - P(\lambda)$), número de Peclet em função da velocidade da solução no poro ($v - P(v)$) e fator de retardamento (R).

4.9. Montagem dos Bioensaios

4.9.1. Bioensaio de toxicidade terrestre utilizando *R. padbergi*

Para a montagem dos bioensaios com *R. padbergi* foram utilizados doze terrários de vidro, de medidas 45 cm de comprimento, 25 cm de largura e 20 cm de altura, com capacidade de 22,5 L, contendo 7,5 kg de solo. O bioensaio foi realizado em triplicata, sendo três terrários por tratamento, recebendo solo controle e solos com 5, 15 e 30 anos de vinhaça. Após a montagem dos terrários, 20 indivíduos da espécie *R. padbergi* foram adicionados em cada um.

Após 21 e 42 dias de exposição, três animais de cada terrário foram anestesiados com clorofórmio e dissecados em solução fisiológica, a fim de se retirar o intestino médio, o qual teve porções fixadas em diferentes soluções de acordo com o protocolo de cada

técnica utilizada. Após a fixação por 24 h, o material foi colocado em solução tampão fosfato de sódio pH=7,4, para manutenção sob refrigeração.

4.9.2. Bioensaio de toxicidade aquática utilizando *O. niloticus*

O bioensaio foi submetido previamente ao comitê de ética no uso de animais sob protocolo 001860-2/2. O bioensaio foi realizado em réplica e foram utilizados no total dez aquários, com capacidade de 40 L cada. Dois deles receberam água de poço artesiano para funcionar como controle. Os outros aquários receberam água e o lixiviado da vinhaça obtidos após a realização dos ensaios de BTC's na concentração de 5% para saber se há diferença de toxicidade após a vinhaça passar pelos diferentes solos. 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. Foram retirados sangue e fígado, que foram fixados em diferentes soluções, para que pudessem ser aplicadas diferentes técnicas. Após a fixação por 24 h, o material foi colocado em solução tampão fosfato de sódio pH=7,4, para manutenção sob refrigeração.

4.10. Técnicas aplicadas nas amostras coletadas nos bioensaios

4.10.1. Histologia e histoquímica do intestino médio de *R. padbergi* e fígado de *O. niloticus*

Para aplicação das técnicas de histologia e histoquímica, o intestino médio dos diplópodos e os fígados dos peixes foram desidratados em soluções de etanol a 70, 80, 90 e 95% e embebidos em historesina, por 24 horas, sob refrigeração. Posteriormente, os materiais foram transferidos para moldes plásticos contendo resina de inclusão. Após a polimerização, secções de 6 µm de espessura foram obtidas com auxílio de micrótomo. Para análise histológica, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE). Testes histoquímicos foram aplicados para detecção de polissacarídeos neutros – técnica do ácido periódico Schiff - PAS (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983), para detecção de proteínas totais – técnica azul de bromofenol (PEARSE, 1985) e cálcio, pela técnica de von Kossa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). Foram confeccionadas duas lâminas com oito cortes cada para cada técnica. As análises seguiram o protocolo de semi-quantificações de alterações proposta por Christofolletti et al. (2016).

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 animais. 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, foi utilizado o seguinte cálculo:

$$\text{Índice de alteração} = \sum (\text{fator de importância} \times \text{escore}).$$

Os resultados tiveram sua normalidade testada e foi aplicado o teste de variância ANOVA com pos-hoc pelo teste de Dunnett com $p > 0,05$.

4.10.2. Ensaio do cometa utilizando sangue periférico de *O. niloticus*

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 porcentagem de DNA na cauda e momento da cauda medidos pelo software Comet Assay IV. Os resultados tiveram sua normalidade testada e foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com $p > 0,05$ e comparação de pares.

4.10.3. 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 freqüência de células micronucleadas e portadoras de outras anormalidades nucleares. Os resultados tiveram sua normalidade testada e foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com $p > 0,05$ e comparação de pares.

4.10.4. Imunomarcção da proteína HSP70

Para análise da presença da proteína HSP70, após a disseção, o intestino médio foi fixado por 24 horas em paraformaldeído 4% tamponado e mantido em tampão fosfato de sódio. O material foi levado à uma bateria de desidratação lenta em soluções crescentes de álcool (15-100%), diafanização em xilol e imersão em parafina. Para marcação da

HSP70 foi seguido o protocolo proposto por Silva-Zacarin et al. (2012); foram utilizados kits com anticorpos primários – “monoclonal anti heat shock protein” 70 (HSP70) e com anticorpos secundários – “anti mouse” IgG molécula inteira acoplado com fosfatase alcalina.

4.10.5. Estresse oxidativo

O tecido hepático foi primeiramente pesado e, então, homogeneizado em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas em 1000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi congelado em freezer -80°C para a realização das técnicas. As técnicas foram aplicadas individualmente nos animais de cada tratamento, bem como os testes estatísticos e, então, a média e desvio padrão foram obtidos para apresentação dos dados.

4.10.5.1. Análise de proteínas totais

Para a determinação de proteínas totais, uma curva de calibração foi pré-estabelecida a partir de diferentes concentrações de albumina 22%. A dosagem de proteínas foi realizada por meio do método de Bradford (1976). As absorbâncias, obtidas à 595 nm, foram inseridas na equação da reta, o que permitiu a determinação da concentração de proteína para o fígado dos animais expostos aos tratamentos.

4.10.5.2. Peroxidação lipídica TBARS

A quantificação da peroxidação lipídica foi realizada por meio do *TBARS Assay Kit* (Cayman Chemical), respeitando-se as orientações do fabricante. O malondialdeído (MDA) foi utilizado como indicador de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica foi determinada pela medida da quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) formadas durante a decomposição de hidroperóxidos lipídicos, a maioria formada a partir de MDA. A absorbância foi mensurada colorimetricamente à 532 nm usando um leitor de microplacas. O conteúdo de MDA foi calculado para cada amostra a partir de uma curva padrão.

4.10.5.3. Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pelo método de autooxidação do pirogalol descrito por Marklund e Marklund (1974). O ensaio foi realizado com 10 µL de proteínas, 2 mL de tampão TRIS- HCl 25 mM com EDTA 1 mM pH 8,5 e 200 µl de pirogalol 15 mM e incubados a 24°C por 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 200 µl de

HCl 1N e medida em 440 nm. A atividade foi expressa em unidades de absorbância/minuto.

4.10.5.4. Glutathione S Transferase (GST)

A atividade da GST foi avaliada seguindo o método de Habig et al. (1974). A mistura analisada constituía de 2,7 mL de tampão fosfato, 400 µL de GSH 0,1 mM e 400 µL de CDNB 0,1 mM (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) como substrato e 1 mg de proteína. O aumento na absorbância foi medido em 340 nm por 5 minutos com 1 minuto de intervalo. O resultado foi expresso como absorbância/minuto.

5. RESULTADOS

Os resultados foram apresentados na forma de artigos científicos e serão submetidos à revistas especializadas:

Artigo 1. Fertirrigated soils with vinasse for extensive period causes cellular damage to soil bioindicators. Artigo submetido na revista **Biology and Fertility of Soils**.

Artigo 2. Mobilidade do íon potássio é alterada com fertirrigação de vinhaça ao longo dos anos?

Artigo 3. Potencial genotóxico do lixiviado da vinhaça de cana-de-açúcar após percolação em solos com diferentes períodos de fertirrigação.

Artigo 4. Histopatologia e quantificação de proteínas de estresse oxidativo em fígado de *Oreochromis niloticus* expostos ao lixiviado de vinhaça

Artigo 1.**SOLOS FERTIRRIGADOS COM VINASSA POR EXTENSO PERÍODO CAUSA DANOS CELULARES AOS BIOINDICADORES DO SOLO**

Correia, J.E. ¹; Christofoletti, C.A.²; Moreira-de-Sousa, C. ¹; de Souza, C.P.¹

Souza, R.B. ¹; Garcia, C.F.H. ¹; Miranda, J.H.³; Fontanetti, C.S.¹

¹ UNESP (Universidade Estadual Paulista – “Julio de Mesquita Filho”)-Rio Claro, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

² UNIARARAS (Fundação Hermínio Ometto – FHO) – Araras, SP, Brasil

³ USP (Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ), Piracicaba, SP, Brasil

*Auto correspondente: telefone: +55 19 35264139; Fax: +55 19 35264136.

Resumo

A vinhaça é o principal resíduo líquido do processamento da cana-de-açúcar em etanol. Nos últimos 35 anos, a prática de fertirrigação vinhaça tem sido realizada. Este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade de solos que receberam vinhaça por diferentes períodos usando o milípede *Rhinocricus padbergi* como organismo teste. As amostras de solo foram coletadas em culturas de cana-de-açúcar que receberam vinhaça por 5, 15 e 30 anos (S5, S15 e S30) e uma área de controle (SC). Foram realizadas análises físico-químicas das diferentes amostras de solo. Os bioensaios foram realizados em triplicata, com exposição por 21 e 42 dias. Após a exposição, três indivíduos de cada terrário foram anestesiados e dissecados para remoção do intestino médio para análise histopatológica e marcação de HSP70. Os solos apresentaram concentrações variadas de componentes orgânicos e metais. Após 21 dias, apenas três indivíduos sobreviveram ao solo S30 e após 42 dias de alta mortalidade, também foi observado no tratamento com solo S15. A análise histopatológica mostrou espessamento do borda em escova das células epiteliais estatisticamente significativo para indivíduos expostos aos solos S5 e S15 por 21 dias.

A perda de adesão das células epiteliais foi estatisticamente significativa nos indivíduos expostos a S15 por 21 dias e S5 por 42 dias.

Biology and Fertility of Soils

FERTIRRIGATED SOILS WITH VINASSE FOR EXTENSIVE PERIOD CAUSES CELLULAR DAMAGE TO SOIL BIOINDICATORS

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	BFSO-D-19-00723	
Full Title:	FERTIRRIGATED SOILS WITH VINASSE FOR EXTENSIVE PERIOD CAUSES CELLULAR DAMAGE TO SOIL BIOINDICATORS	
Article Type:	Original Paper	
Keywords:	Microanalysis of soil; histopathology; HSP70; soil toxicology; ethanol industry.	
Corresponding Author:	Jorge Evangelista Correia, master Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Jorge Evangelista Correia, master	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Jorge Evangelista Correia, master	
	Cristina Moreira-de-Sousa, PhD	
	Cintya Aparecida Christofoletti	
	Cleiton Pereira de Souza	
	Raphael Baston de Souza, PhD	
	Camila Fernandes Hergert Garcia	
	Jarbas Honório de Miranda, PhD	
	Carmem Silvia Fontanetti, PhD	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2015/26157-9)	Mrs Jorge Evangelista Correia
Abstract:	<p>Vinasse is the main liquid residue from the sugarcane processing in ethanol. Over the last 35 years, the practice of vinasse fertigation has been carried out. This work aimed to evaluate the toxicity of soils that received vinasse for different periods using the millipede <i>Rhinocricus padbergi</i> as test organism. Soil samples were collected in sugarcane crops that received vinasse for 5, 15 and 30 years (S5, S15 and S30) and a control area (SC). Physical-chemical analysis of the different soil samples were performed. The bioassays were carried out in triplicate, with exposure for 21 and 42 days. After exposure, three individuals from each terrarium were anesthetized and dissected for midgut removal for histopathological analysis and marking of HSP70. The soils presented varied concentrations of organic components and metals. After 21 days only three individuals survived to soil S30 and after 42 days high mortality there was also observed in the treatment with soil S15. Histopathological analysis showed thickening of the brush border of epithelial cells statistically significant for individuals exposed to the S5 and S15 soils for 21 days. Loss of epithelial cell adhesion was statistically significant in individuals exposed to S15 for 21 days and S5 for 42 days.</p>	
Suggested Reviewers:	Carolina Quintana Universidad Nacional del Nordeste Argentino carolina@vet.unne.edu.ar	

	Has experience and knowledge about vinasse.
	krisna Gopal Indian Veterinary Research Institute krishnagopaldubey@gmail.com Has experience and knowledge about vinasse

23 **Resume**

24 Vinasse is the main liquid residue from the sugarcane processing in ethanol. Over the last
25 35 years, the practice of vinasse fertigation has been carried out. This work aimed to
26 evaluate the toxicity of soils that received vinasse for different periods using the millipede
27 *Rhinocricus padbergi* as test organism. Soil samples were collected in sugarcane crops
28 that received vinasse for 5, 15 and 30 years (S5, S15 and S30) and a control area (SC).
29 Physical-chemical analysis of the different soil samples were performed. The bioassays
30 were carried out in triplicate, with exposure for 21 and 42 days. After exposure, three
31 individuals from each terrarium were anesthetized and dissected for midgut removal for
32 histopathological analysis and marking of HSP70. The soils presented varied
33 concentrations of organic components and metals. After 21 days only three individuals
34 survived to soil S30 and after 42 days high mortality there was also observed in the
35 treatment with soil S15. Histopathological analysis showed thickening of the brush border
36 of epithelial cells statistically significant for individuals exposed to the S5 and S15 soils
37 for 21 days. Loss of epithelial cell adhesion was statistically significant in individuals
38 exposed to S15 for 21 days and S5 for 42 days.

39 **Key words:** Microanalysis of soil; histopathology; HSP70; soil toxicology; ethanol
40 industry.

43 **1. INTRODUCTION**

44 The search for alternative fuels is an old global need, gaining momentum with the
45 first international oil crisis in 1973. In this scenario ethanol gained a lot of strength,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46 mainly in Brazil and the USA, the largest producers in the world, using sugarcane and
47 corn as matriz, respectively (UNICA, 2017).

48 In Brazil, the sugar and alcohol industry is considered one of the main pillars of
49 the economy. As with any industrial process, the sugarcane processing into ethanol
50 generates waste; the vinasse is the main liquid residue of this process, generated in a
51 proportion up to 15 times larger than the ethanol volume produced (Christofoletti et al.,
52 2013; España-Gamboa et al., 2011). In addition, it has a high organic load, high
53 concentrations of potassium and other metals and acidic pH, and for that reasons has been
54 applied as fertilizer since the 1970s (Christofoletti et al., 2013).

55 Fertigation with vinasse in sugarcane crops has been carried out for approximately
56 35 years. Since the regulation of its safe application in the soil has occurred only in the
57 last 10 years, at least during the first 25 years there has been indiscriminate and excessive
58 use. Because of this, the fertigation with vinasse needs more supervision and studies.
59 Evidence from the literature indicates that sugarcane vinasse can modify soil chemical
60 properties, such as soil pH, redox potential (Eh) of the interstitial solution, salt content,
61 organic matter concentration (Biological Oxygen Demand - BOD and Chemical Oxygen
62 Demand – COD), cation exchange capacity (CEC), concentration of toxic metals such as
63 cadmium, lead, copper, chromium and nickel, ammonia concentration, among others
64 (Alfaro-Soto et al., 2017).

65 The use of soil bioindicators in environmental monitoring can be useful to detect
66 environmental changes at the initial stage or the effectiveness of measures taken to
67 improve environmental quality (Souza et al., 2014). Among the soil bioindicators,
68 millipedes have been gaining prominence in soil ecotoxicology surveys due to their
69 behavior, food habit and ecological function (Souza et al., 2014).

1
2
3
4
5
6
70 As millipedes eat organic matter present in the soil, these animals midgut becomes
71 an excellent organ for soil possible toxicity investigation, and physiological, molecular
72 and histological changes become excellent biomarkers (Souza et al., 2014).

7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
73 Christofolletti et al. (2016) exposed *Rhinocricus padbergi* millipedes to soil
74 combinations with vinasse and biosolid additions and observed intense reactions in the
75 midgut such as brush border thickening, increased epithelial renewal, increased number
76 of granules in hepatic cells and accumulations of hemocytes.

17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
77 Coelho et al. (2017) evaluated the biosolids and vinasse toxicity in concentrations
78 compatible with brazilian regulations for agricultural use, from bioassays with *R.*
79 *padbergi* and immunostaining of stress proteins. The authors observed a significant
80 increase in the immunostaining of proteins HSP70 as a response to xenobiotics of both
81 waste, particularly in regions where cell function is the organ detoxification (such as the
82 hepatic cells and specific regions of the epithelium).

31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
83 The heat shock proteins (HSPs) are large proteins, classified according to their
84 molecular mass, in up to four families with up to 100 kDa: HSP100, HSP90, HSP70 and
85 HSP60 (Feder et al., 1995; Patruno et al., 2001). Among them, HSP70 stands out, which
86 in addition to presenting a rapid and significant synthesis in presence of several stressors,
87 is also involved in numerous cellular events and, for this reason, has been widely used as
88 a biomarker for several analyzes (Coelho et al. , 2017, Moreira-De-Sousa et al., 2018).

46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
89 Considering the high production and use of vinasse in the fields as fertilizer over
90 the last 35 years, this work aimed to evaluate the toxicity of these soils that receive vinasse
91 for different periods of time, to verify if the application time can also be a factor toxicity.
92 For this purpose, a representative of soil fauna, the millipede *R. padbergi* was used as
93 bioindicator and histopathological analysis and immunostaining of HSP70 in the midgut
94 as biomarkers.

95

96 2. MATERIALS AND METHODS

97 2.1. Biological material

98 The individuals of the *R. padbergi* were collected in the UNE/SP, Rio Claro, São
99 Paulo, Brazil (22°23'45.18"S 47°32'49.18"W) and acclimated in the laboratory for 15
100 days in terrarium with the control soil, with a mean temperature of 23°C.

101

102 2.2. Collection of soil samples

103 Three areas of sugarcane cultivation located in the state of São Paulo were
104 selected, which received vinasse as fertilizer at different times (5, 15 and 30 years). Soil
105 of two control areas were collected, one close to location where the millipedes were
106 collected, and the other close to sugarcane crops also with no anthropogenic influence.
107 All soils collected presented very similar characteristics having granulometry of sandy
108 soils. For this reason the authors selected for bioassay control the soil collected close to
109 location where the millipedes was living to minimizing the effects of soil change.

110 The soil collection spots were selected between two sugarcane rows far from the
111 edges; there was a previous cleaning with hoe to remove the fallen straw thus leaving the
112 soil exposed. The soil was excavated to a depth of approximately 30 cm and from that
113 point the soil was collected, sieved and conditioned in plastic bags for transportation to
114 the laboratory. To facilitate understanding, the different soils will be treated as follows:
115 **SC** - soil control; **S5** - soil fertigated by vinasse for 5 years; **S15** - soil fertigated by vinasse
116 for 15 years; **S30** - soil fertigated by vinasse for 30 years.

117

118 2.3. Physical-chemical analysis of soil samples

119 The soil samples collected in the four areas were sent to the laboratory Eurofins -
120 Rio Claro for chemical, physical-chemical and agronomic potential analysis for macro
121 and micronutrients (N, Ca, Mg, P, K, S, Fe, Mn, Cu, Zn), metals (As, Ba, Cd, Cu, Cr, Hg,
122 Mo, Ni, Pb, Se, Zn, electrical conductivity, organic carbon, total phosphorus, Kjeldahl
123 nitrogen, ammoniacal nitrogen, nitrogen nitrate/nitrite, pH in water (1:10), total
124 potassium, total sodium, total sulfur, total calcium, total magnesium, moisture, volatile
125 solids and total solids).

126

127 **2.4. Terrestrial toxicity bioassay using *R. padbergi***

128 For the *R. padbergi* bioassays assemble, twelve glass terrariums, measuring 45 cm
129 long, 25 cm wide and 20 cm high, with a capacity of 22.5 L, containing 7.5 kg of soil
130 were used. The bioassay was performed in triplicate, being three terrariums per treatment,
131 receiving the soils SC, S5, S15 and S30. After terrarium preparation, 20 individuals of
132 the *R. padbergi* species were added to each. After 21 and 42 days of exposure, three
133 animals from each terrarium were anesthetized with sulfuric ether and dissected in
134 physiological solution in order to remove the midgut, which had portions fixed in
135 different solutions according to the protocol of each technique used. After fixation for 24
136 h, the material was placed in sodium phosphate buffer pH = 7.4, and stored under
137 refrigeration for further analysis.

138

139 **2.5. Histology and Histochemistry of the midgut of *R. padbergi***

140 For the histological and histochemical techniques application, millipedes midgut
141 were dehydrated in ethanol solutions at 70, 80, 90 and 95% and embedded in historesin
142 for 24 h under cooling. After this, the materials were transferred to plastic molds
143 containing inclusion resin. After polymerization, sections of 6 μm thick were obtained

144 with the aid of a microtome. For histological analysis, the sections were stained with
145 hematoxylin and eosin (HE). Histochemical tests were applied for the detection of neutral
146 polysaccharides - periodic acid Schiff - PAS technique (Junqueira; Junqueira, 1983), total
147 proteins - bromophenol blue technique (Pearse, 1985) and calcium by von Kossa
148 technique (Junqueira; Junqueira, 1983). Two slides were made with eight sections each
149 for each technique.

150 The analyzes followed the semi-quantification of alterations protocol proposed by
151 Christofolletti et al. (2016). To calculate the change index, each change received an
152 importance value of 1 to 3 according to the impact generated by it in the tissue. This
153 impact factor was then multiplied by values between 0 and 6 regarding the extent of this
154 change by the organ.

155

156 **2.6. Immunostaining of HSP70 protein**

157 For analysis of the presence of HSP70 protein, after dissection, the midgut was
158 fixed for 24 hours in 4% paraformaldehyde buffer and maintained in sodium phosphate
159 buffer. The material undergo to a slow dehydration battery in increasing solutions of
160 alcohol (15-100%), diaphanization in xylol and immersion in paraffin. Subsequently, the
161 material was sectioned in 6µm sections with the aid of the microtome; the sections were
162 then hydrated and collected on slides. The immunostaining of HSP70 protein followed
163 the protocol proposed by Coelho et al. (2017).

164

165 **2.7. Statistical analysis**

166 To select the most appropriate statistical test, the normality of the data was verified
167 by the Shapiro-Wilk test. For the group of data that obtained a normal distribution, the
168 ANOVA test was applied, with Dunnet's post-hoc test ($p < 0.05$). Kruskal-Wallis test and

169 subsequent paired analysis ($p < 0.05$) were applied for the non-normal distribution data
170 group.

171

172 **3. RESULTS**

173 **3.1. Physical-chemical analysis of soil samples**

174 The physical-chemical analysis results were summarized in Table 1. The SC soil
175 obtained the highest values of total organic carbon, ammoniacal nitrogen, nitric nitrogen
176 and metals such as arsenic, lead and molybdenum. The soil S30 obtained the highest
177 values of nitrogen kjeldahl, phosphorus, potassium (four times higher than control), zinc,
178 nickel, magnesium, copper, calcium and barium. Soil pH, with the exception of soil S15,
179 was considered slightly acidic.

180

181 **3.2. Mortality of exposed animals**

182 In 21 days of exposure, the death of most individuals exposed to soil S30 was
183 observed, being possible only the collection of three animals from one of the triplicates.
184 There was mortality of one control individual and two individuals exposed to soil S15.

185 After 42 days of exposure all individuals exposed to soil S30 had died and only
186 four individuals exposed to soil S15 survived and were collected. There was death of one
187 control individual and two of S5 soil.

188

189 **3.3. Histopathology of *R. padbergi* midgut**

190 The control group presented the midgut morphological pattern for the species,
191 characterized by a pseudostratified epithelium with brush border, followed by a layer of
192 muscle cells, hepatic cells and a discontinuous muscle (Figure 1A). The main alterations
193 were: increase in epithelial renewal rate, loss of adhesion of epithelial cells (Figure 1B),

194 thickening on the brush border of epithelial cells (Figure 1C), increase in the presence of
195 granules in hepatic cells. In some individuals, a high incidence of vacuoles was observed
196 in the epithelial cells apical region (Figure 1D). Part of these vacuoles contained
197 spherocrystals, some of which were detected by the von Kossa technique (Figure 1E).

198 The alteration index were summarized in table 2. At 21 days of exposure, brush
199 border thickening was statistically significant in the animals exposed to the S5 and S15
200 soils when compared to the control by the Kruskal-Wallis method ($p < 0.05$). In the
201 animals exposed to soil S15 the loss of epithelial cell adhesion was also statistically
202 significant. At 42 days of exposure, loss of epithelial cell adhesion was statistically
203 significant only in animals exposed to soil S5 years.

204 Some animals exposed to soil S5 and S15 showed very intense marking in hepatic
205 cells for neutral polysaccharides (Figure 2A) and for proteins (Figure 2B) showing a
206 complex composition. Most of the granules of the hepatic cells presented calcium in their
207 constitution, typically observed in these animals, being part of the spherocrystals.

208 The presence of calcium was also evidenced in the epithelial cells of individuals
209 exposed for 21 days to soil S5.

210

211 **3.4. Immunostaining of HSP70**

212 From the HSP70 immunostaining analysis, the lowest protein expression was
213 observed in the 42-day control animals and the highest in the animals exposed for 42 days
214 to the S5 soil (Figure 3). There were statistically significant differences in the individuals
215 exposed for 21 days in soil S5 and S15 and for 42 days in soil S5 when compared to
216 controls. The HSP70 expression was concentrated predominantly in the apical region of
217 epithelial cells and in hepatic cells.

218

219 4. DISCUSSION

220 The use of vinasse as fertilizer in sugarcane crops is a very common and extremely
221 profitable practice for mills. The residue that is produced in very high amounts is
222 discarded in the sugarcane crop and when acting as a natural fertilizer, dispenses the need
223 for chemical fertilizers. However, this practice, which occurred approximately over 35
224 years, was only regulated in Brazil in 2005 and only for the state of São Paulo, through
225 the technical norm P 4.231/2005 of CETESB (São Paulo State Environmental Company),
226 which establishes the criteria and procedures for the vinasse storage, transportation and
227 application.

228 For at least two decades the vinasse application on the soil was carried out
229 uncontrolled. Therefore, to verify the toxic effects of vinasse in soil over time was the
230 objective of this study. For that, soils that received vinasse for 5, 15 and 30 years were
231 collected. The composition of this soils, as well its toxic effects on the exposed millipedes
232 were compared to a control soil.

233 The physical-chemical parameters analyzed varied greatly among the soil samples
234 collected. There was a potassium concentration four times higher in the soil S30 than in
235 soil SC. This difference is due to the presence of potassium in high concentrations in the
236 vinasse (Christofoletti et al., 2013), which is the limiting element for fertirrigation
237 according to the technical norm P 4.231/2005 of CETESB. In the soil S30 was detected
238 the highest concentrations of zinc, nickel, magnesium, copper, calcium and barium were
239 observed, indicating a salinization process.

240 The pH of most of the analyzed soils was slightly acid except for soil S15. In
241 general, several studies have reported that high vinasse doses applied to soils contribute
242 to the cation exchange capacity increase, the percentage of base saturation and to the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

243 elevation of the soil pH index, promoting an improvement in its fertility (Santos et al.,
244 1981; Barros et al., 2010).

245 However it is known that the vinasse acidic pH is given by the addition of sulfuric
246 acid to avoid contamination in the fermentors of the mills. Soil pH acidification was
247 observed by Basso et al. (2016) in tests with raw vinasse percolation in columns
248 containing sandy soils of the Rio Claro Formation; the experiments were started with soil
249 pH values of the slightly acid (5.7) percolated by water. After vinasse addition, the
250 effluent pH values decreased throughout the test, reaching values close to the pH of the
251 initial vinasse (4.1). According to the authors, there was no biodegradation of the organic
252 matter, possibly due to the short test time and the controlled temperature conditions,
253 around 20°C.

254 During exposition of millipedes, death was observed from individuals exposed to
255 S30 soil for 21 days. After 42 days all individuals exposed to soil S30 had died and only
256 four survived in terrariums with soil S15. The high mortality rate indicates a great toxic
257 potential of these soils.

258 Analyzes of the exposed millipedes revealed that epithelial cells, involved in the
259 absorption of the elements present in the lumen, are not immune to the toxic effects
260 provided by soils. The thickening of epithelial cells brush border, statistically significant
261 in individuals exposed to 21 days on the S5 and S15 soils, signals an adaptive response
262 of the animals to prevent the entry of toxic compounds into the midgut. The brush border
263 is constituted by the microvilli of epithelial cells and its thickening may be due to the
264 elongation of these microvilli. According to Phillips et al. (2000), elongation and
265 destruction of microvilli of the intestine are involved in food allergies in humans and
266 animals. In order to prove the elongation of microvilli in this study, it would be necessary
267 to use electron microscopy. However, Christofolletti et al. (2016) exposed *R. padbergi*

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

268 millipedes to soil with vinasse and biosolid and also observed intense reactions in the
269 midgut such as brush border thickening caused by the elongation of microvilli and the
270 overlapping of a amorphous substance thick layer, which according to the authors this
271 change may have occurred due to contact with the contaminated soil, as the animals
272 assimilated the toxic substances during digestion.

273 In the present study, the epithelial cells adhesion loss was statistically significant
274 in individuals exposed to soil S15 for 21 days and S5 for 42 days. The loss of adhesion
275 between the cells can be closely related to the tissue renewal process, since it facilitates
276 the detachment of the damaged cells or in the process of death, favoring their elimination
277 from the tissue. These processes are normal physiological responses to maintain organ
278 function, however if the frequency/incidence of this process is high, there will probably
279 be death of the animal (Souza; Fontanetti, 2011).

280 In the presence of contaminated soils, millipedes can present two strategies, some
281 millipedes species prefer to starve instead of ingesting soil with levels of toxic substances
282 (Hopkin; Read; 1992), but when they move the soil to deep layers, these animals feed on
283 the substrate containing potentially toxic substances (Nogarol; Fontanetti, 2010). In
284 contact with these substances, the potentially toxic compounds intracellular accumulation
285 in insoluble and physiologically inactive forms is an efficient mechanism for the
286 detoxification of these elements. In the millipedes, the hepatic cell actively works in this
287 process (Köhler, 2002; Nogarol; Fontanetti, 2010; Christofolletti et al., 2016); formation
288 as well as increased presence of cytoplasmic granules signals the organ's attempt to
289 maintain homeostasis and ionic balance by causing hepatic cells to absorb metals and
290 harmful substances and accumulate them in the form of spherocrystals. The absorbed
291 metals bind to the organic matrix in the granule immobilizing it and favoring its excretion
292 by vesicles (Nogarol; Fontanetti, 2010).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
293 The increase in granule accumulation in hepatic cells was extensively observed in
294 individuals exposed to all soils; the metals binding, mainly calcium, with a glycoprotein
295 matrix was confirmed by the marking of these granules by the different histochemical
296 techniques employed in this study. Although not statistically significant, the PAS
297 technique also showed a greater marking of neutral polysaccharides in the apical region
298 of the epithelial cells and in some individuals intense accumulation in the hepatic cells as
299 observed in figure 2, revealing the epithelium reaction to the toxic substances present in
300 the soil. Nogarol and Fontanetti (2010) also verified an intense increase in the
301 accumulation granules in hepatic cells of *R. padbergi* exposed to the sewage sludge,
302 reaching an exorbitant amount. The authors also found an increase in the epithelial
303 renewal rate, increase of secretory vesicles with glycoprotein content and increase in the
304 number of hemocytes.

29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
305 In the present study, besides the morphological changes, there was also a
306 statistically significant HSP70 protein expression in the individuals exposed to the S5 and
307 S15 soils in 21 days and S5 in 42 days, with a more intense marking in the apical region
308 of the epithelial cell layer and in the hepatic cells.

309 The HSP70 protein is characterized by rapid and significant synthesis in the
310 presence of several stressors, through the expression of their gene and consequent protein
311 activation, being able to be increased or decreased according to the organism situation
312 (Köhler et al., 1992; Zanger et al., 1996; Nadeau et al., 2001; Mello et al., 2012; Silva-
313 Zacarin et al., 2012; Taylor et al., 2013; Ansoar-Rodríguez et al., 2016). For this reason
314 it has been widely used as a biomarker for several analyzes (Jonsson et al., 2006; Liu et
315 al., 2015). These proteins have specific functions in signaling pathways related to cell
316 growth and in the prevention or reversal of proteotoxic damage caused by stress,
317 including oxidative stress.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

318 In this study, the regions with the most intense presence of HSP70 correlate with
319 the regions of the main morphological alterations found, possibly these responses show
320 that the epithelial cells as well as the hepatic cells served as a defense line in the animals.
321 Moreira-de-Sousa et al. (2018) stated that HSP70 can effectively act up protecting the
322 cells to a certain level of toxicity; the greater the toxic potential of the soils, the lower are
323 the HSP70 proteins effectiveness in avoiding the toxic effects.

324 Coelho et al. (2017) were the first to perform HSP70 immunostaining in the
325 midgut of millipedes exposed to vinasse and biosolid. The authors observed a greater
326 increase of the immunostaining in the animals exposed to the vinasse in comparison to
327 the biosolid and to the control. The most marked regions were the regions involved in
328 protective functions and acting in the detoxification, as the hepatic cells and apical and
329 basal regions of the epithelial cells, the same observed in this study.

330 It is known that millipedes have a great capacity for bioprocessing in the face of
331 contact with toxic compounds (Christofolletti et al., 2012), but in this work, the mortality
332 of the animals showed that the fertigated soils with vinasse for long periods were highly
333 toxic to the animals. Compared to soils with less fertigation time, the cellular damages
334 observed also indicate that these soils presented toxic effects, since the cellular responses
335 clearly reflected processes of cellular lesions and adaptations to the stimuli caused by
336 contact with the contaminated soil. With this in mind, there is an alert about the toxic
337 effects of vinasse over the years of application in the environment and the possibility of
338 salinization of soils by the some elements accumulation in abundance in the vinasse such
339 as potassium and calcium.

340
341
342

343

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

344 **5. ACKNOWLEDGMENT**

345 The authors thank the Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo
346 (FAPESP – Support and Research Foundation of the State of São Paulo), process
347 2015/26157-9 and 2012/50197-2 for financial support and Gerson Mello de Souza for
348 technical assistance.

349 **6. COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS**

350 There is no conflict of interest involved in this manuscript. The animals
351 (diplopods) are invertebrates and therefore under Brazilian law, the experiments do not
352 need ethics committee approval. However, the animals were sacrificed as painlessly as
353 possible; They were anesthetized in a petri dish containing ether-soaked cotton and
354 sacrificed by decapitation. All the authors agreed and participated on the research.

355 **7. FUNDING**

356 This study was funded by FAPESP (São Paulo State Research and Support
357 Foundation) (grant number 2015/26157-9 and 2012/50197-2).

358 **8. CONFLICT OF INTEREST**

359 The authors declare that they have no conflict of interest.

360

361 **9. BIBLIOGRAPHICAL REFERENCES**

362 Ansoar-Rodríguez, Y., Christofolletti, C. A., Correia, J. E., de Souza, R. B., Moreira-de-
363 Sousa, C., Marcato, A. C. D. C. & Fontanetti, C. S. (2016). Liver alterations in
364 *Oreochromis niloticus* (Pisces) induced by insecticide imidacloprid: histopathology and
365 heat shock protein in situ localization. *J. Environ. Science Health, Part B*, **51(12)**, 881-
366 887.

367

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

368 Pessoa de Barros, R., Almeida Viégas, P. R., Lima da Silva, T., Matos de Souza, R.,
369 Barbosa, L., Almeida Viégas, R. & Soares de Melo, A. (2010). Alterações em atributos
370 químicos de solo cultivado com cana-de-açúcar e adição de vinhaça. Pesquisa
371 Agropecuária Tropical, **40**(3).
372
373 Basso, J. B., Soto, M. A. A., & Chang, H. K. (2017). Percolação de vinhaça em coluna
374 de solo arenoso da formação Rio Claro. Águas Subterrâneas, **31**(1), 52-65.
375
376 Bianchi, S.R.; Nogueira, A.R.A.; Moreira, A.; Souza, G.B.; Menezes, E.A.; Lopes,
377 W.V. Alterações nos atributos químicos de um latossolo vermelho amarelo distrófico
378 com adição de vinhaça. In: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de
379 Plantas. Londrina. Fertbio, 2008
380
381 CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) Vinhaça-criterios e
382 procedimentos para aplicação no solo na agricultura. Norma técnica P4231. São Paulo,
383 2006.
384
385 Christofolletti, C. A., Escher, J. P., Correia, J. E., Marinho, J. F. U., & Fontanetti, C. S.
386 (2013). Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. Waste Management,
387 **33**(12), 2752-2761.
388
389 Christofolletti, C. A., Francisco, A., Pedro-Escher, J., Gastaldi, V. D., & Fontanetti, C.
390 S. (2016). Diplopods as soil bioindicators of toxicity after application of residues from
391 sewage treatment plants and ethanol industry. Microscopy and Microanalysis, **22**(5),
392 1098-1110.

393

1
2 394 Christofolletti, C. A., Francisco, A., & Fontanetti, C. S. (2012). Biosolid soil application:
3
4 395 toxicity tests under laboratory conditions. *Applied and Environmental Soil Science*,
5
6
7 396 **2012**, 1-9.
8
9 397

10
11 398 Coelho, M. P. M., Moreira-de-Sousa, C., de Souza, R. B., Ansoar-Rodríguez, Y., Silva-
12
13 399 Zacarin, E. C. M., & Fontanetti, C. S. (2017). Toxicity evaluation of vinasse and biosolid
14
15 400 samples in diplopod midgut: heat shock protein in situ localization. *Environmental*
16
17 401 *Science and Pollution Research*, **24**(27), 22007-22017..
18
19 402

20
21 403 Espana-Gamboa, E., Mijangos-Cortes, J., Barahona-Perez, L., Dominguez-Maldonado,
22
23 404 J., Hernández-Zarate, G., & Alzate-Gaviria, L. (2011). Vinasses: characterization and
24
25 405 treatments. *Waste management & research*, **29**(12), 1235-1250.
26
27 406

28
29 407 Feder, E. M., Parsell, A. D., Lindquist, S. The stress response and stress proteins. In: J. J.
30
31 408 Lemasters & C. Oliver (Ed), *Cell Biology of Trauma* (pp. 177-191). CRC Press Boca
32
33 409 Raton, 1995.
34
35 410

36
37 411 Johnson, J. D., & Fleshner, M. (2006). Releasing signals, secretory pathways, and
38
39 412 immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *Journal of*
40
41 413 *leukocyte biology*, **79**(3), 425-434.
42
43 414

44
45 415 Junqueira, L. C.; Junqueira, L. M. M. S. (1983). *Técnicas Básicas de Citologia e*
46
47 416 *Histologia*. São Paulo: Livraria Editora Santos, p. 123
48
49 417

50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

418 Köhler, H. R., Triebkorn, R., Stöcker, W., Kloetzel, P. M., & Alberti, G. (1992). The
419 70 kD heat shock protein (hsp 70) in soil invertebrates: a possible tool for monitoring
420 environmental toxicants. *Arch Environ Con Tox*, **22**(3), 334-338.

422 Köhler, H. R., Triebkorn, R., Stöcker, W., Kloetzel, P. M., & Alberti, G. (1992). The
423 70 kD heat shock protein (hsp 70) in soil invertebrates: a possible tool for monitoring
424 environmental toxicants. *Archives of environmental contamination and toxicology*,
425 **22**(3), 334-338.

427 Hopkin, S. P.; Read, H. J. *The Biology of Millipedes*. 1 ed. New York: Oxford
428 University Press, 1992. 233 pp.

430 Liu, T., Pan, L., Cai, Y., & Miao, J. (2015). Molecular cloning and sequence analysis of
431 heat shock proteins 70 (HSP70) and 90 (HSP90) and their expression analysis when
432 exposed to benzo (a) pyrene in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Gene*, **555**(2), 108-
433 118.

435 Moreira-de-Sousa, C., de Souza, R. B., & Fontanetti, C. S. (2018). HSP70 as a
436 Biomarker: an Excellent Tool in Environmental Contamination Analysis—a Review.
437 *Water, Air, & Soil Pollution*, **229**(8), 264..

439 Nadeau, D., Corneau, S., Plante, I., Morrow, G., & Tanguay, R. M. (2001). Evaluation
440 for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*.
441 *Cell stress & chaperones*, **6**(2), 153.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

442 Nogarol, L. R., & Fontanetti, C. S. (2010). Acute and subchronic exposure of diplopods
443 to substrate containing sewage mud: Tissular responses of the midgut. *Micron*, **41**(3),
444 239-246.

445

446 Patruno, M., Thorndyke, M. C., Carnevali, M. C., Bonasoro, F., & Beesley, P. W. (2001).
447 Growth factors, heat-shock proteins and regeneration in echinoderms. *Journal of*
448 *Experimental Biology*, **204**(5), 843-848.

449

450 Phillips, A. D., Giròn, J., Hicks, S., Dougan, G., & Frankel, G. (2000). Intimin from
451 enteropathogenic *Escherichia coli* mediates remodelling of the eukaryotic cell surface.
452 *Microbiology*, **146**(6), 1333-1344.

453

454 Santos, G. A., Rossiello, R. O., Fernandes, M. S., & O'Grady, P. C. (1981). Efeitos da
455 vinhaça sobre o pH do solo, a germinação e o acúmulo de potássio em milho. *Pesquisa*
456 *Agropecuária Brasileira*, **16**(4), 489-493.

457

458 Silva-Zacarin, E. C. M., Chauzat, M. P., Zeggane, S., Drajnudel, P., Schurr, F., Faucon,
459 J. P., ... & Engler, J. A. (2012). Protocol for optimization of histological, histochemical
460 and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of
461 honey bee. *Current microscopy contributions to advances in science and technology*.
462 Badajoz: Formatex Research Center, 696-703.

463

464 da Silva Souza, T., & Fontanetti, C. S. (2011). Morphological biomarkers in the
465 *Rhinocricus padbergi* midgut exposed to contaminated soil. *Ecotoxicology and*
466 *environmental safety*, **74**(1), 10-18.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

467 UNICA – União da Indústria da cana-de-açúcar do estado de São Paulo. Produção de
468 álcool do Brasil. UNICA, 2017. in: <http://www.unica.com.br/documentos/publicacoes/>
469 Access in: 20/03/2017.

470

471 Zanger, M., Alberti, G., Kuhn, M., & Köhler, H. R. (1996). The stress-70 protein family
472 in diplopods: induction and characterization. *Journal of Comparative Physiology B*,
473 **165**(8), 622-627.

474

475 **Fig. 1** Histological changes found in the midgut of *R. padbergi*. **A**: control; **B-E**: groups
476 exposed to soil fertigated with vinasse; **l**: lumen; **e**: epithelium; **h**: hemocyte; **m**:
477 musculature; **bb**: brush border; **ml**: muscle layer; **hc**: hepatic cell; **arrow**: loss of
478 epithelial cell adhesion; **arrowhead**: spherocrystals within cytoplasmic vacuoles -
479 calcium detection (von Kossa)

480

481 **Fig. 2** Accumulation of granules in the midgut of *R. padbergi* exposed to soil that received
482 vinasse. **A**: PAS technique - (detection of neutral polysaccharides); **B**: Bromophenol blue
483 technique (total proteins); **C**: von Kossa technique (Calcium); **l**: lumen; **e**: epithelium; **h**:
484 hemocyte; **m**: musculature; **bb**: brush border; **bm**: basal membrane; **ml**: muscle layer; **hc**:
485 hepatic cell; **arrowhead**: spherocrystals

486

487 **Fig. 3** Mean and standard deviation of percentage values per área of expression HSP70
488 protein midgut of *R. padbergi* exposed to fertigated soils by vinasse for different periods.
489 **SC**: soil control; **S5**: soil fertigated with vinasse for 5 years; **S15**: soil fertigated with
490 vinasse for 15 years; **S30**: soil fertigated with vinasse for 30 years; -21: 21 days of
491 exposure; -42: 42 days of exposure. *: statistically significant values by ANOVA test and
492 pos-hoc by Dunett test with $p < 0,05$

Table 1. Physical-chemical analysis values of soils that received fertigation of vinasse over time.

Parâmetro	SC	S5	S15	S30
pH	5.40	5.90	7.2	5.4
Humidity	2.67	2.95	1.43	22.92
Nitric nitrogen (Dilution of 2)	225.20	47.79	17.27	73.91
Ammonia Nitrogen Kjeldahl	62.30	45.10	28.30	44.40
Total Organic Carbon	7.82	2.73	3.14	6.93
Electric conductivity	0.623	0.126	0.120	-
Sulfur	8.02	8.54	13.69	8.21
Potassium	308.00	80.00	152.8	1416
Phosphorus (Dilution of 10)	871.00	478	795	2327
Arsenic	6.85	0.720	1.11	0.87
Barium	19.98	27.78	9.71	83.98
Calcium	857.00	442	914	1376
Lead	17.70	6.02	6.32	12.31
Copper	23.52	4.74	6.158	86.12
Chrome	24.94	22.82	28.02	24.10
Magnesium	377.00	115.0	342	640
Molybdenum	2.50	<0.255	<0.255	<0.255
Nickel	5.82	2.01	2.170	9.20
Sodium	131.00	251.40	197.6	<56.657
Zinc	24.87	6.12	9.46	66.9

SC: soil control; **S5:** soil fertigated with vinasse for 5 years; **S15:** soil fertigated with vinasse for 15 years; **S30:** soil fertigated with vinasse for 30 years

15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65

Table 2 – Mean and standard deviation of alterations index of *R. padbergi* midgut exposed to fertigated soils by vinasse for different periods.

		EPITHELIAL			HEPATIC CELLS	
		Epithelial renewal (1)	Loss of adhesion (2)	Brush border thickening (2)	Vacuoles (3)	Increase of granules (2)
21 DAYS	SC	2.75±0.88	2.87±0.83	0	0	7.00±2.39
	S5	3.66±1.32	5.77±3.07	5.55±2.60*	0	6.66±2.82
	S15	2.66±1.00	6.44±3.43*	6.00±2.64*	1.66±4.71	7.11±2.02
	S30	4.00±1.00	4.66±1.15	6.00±2.00	4.00±7.93	4.33±2.08
42 DAYS	SC	2.75±1.90	0	3.00±4.27	0	6.75±3.19
	S5	4.00±1.52	2.28±0.75*	5.42±3.77	0	6.57±2.50
	S15	3.75±0.50	1.5±0.57	5.00±2.58	3.75±7.50	6.50±1.91
	S30	-	-	-	-	-

SC: soil control; **S5:** soil fertigated with vinasse for 5 years; **S15:** soil fertigated with vinasse for 15 years; **S30:** soil fertigated with vinasse for 30 years. (): importance factor; * : statistically significant values. by the Kruskal-Wallis test with p<0.05. compared to the negative control.

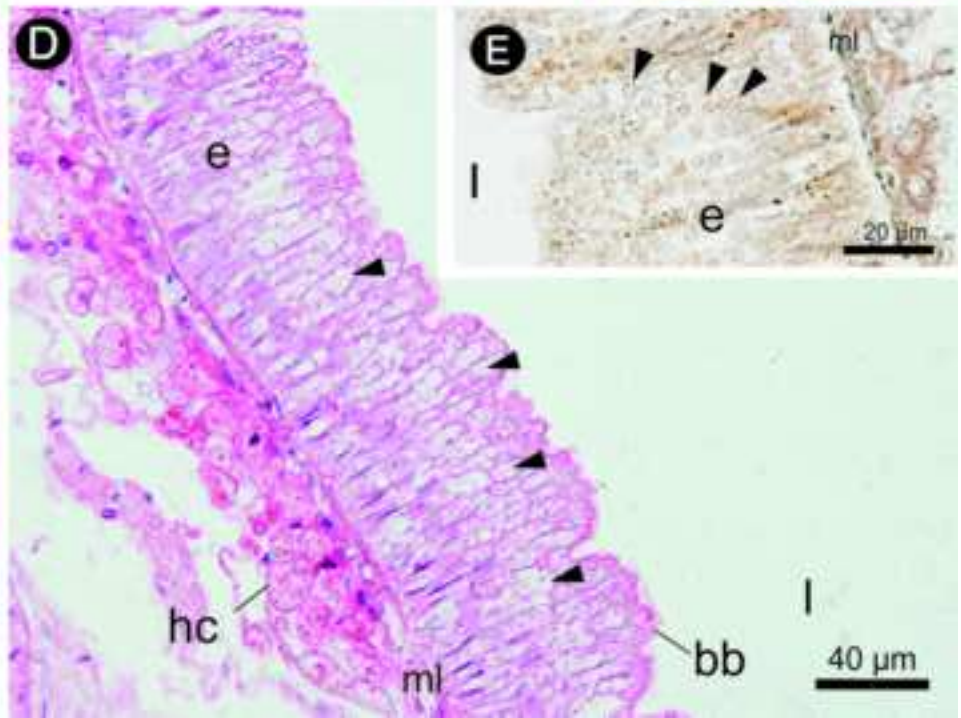
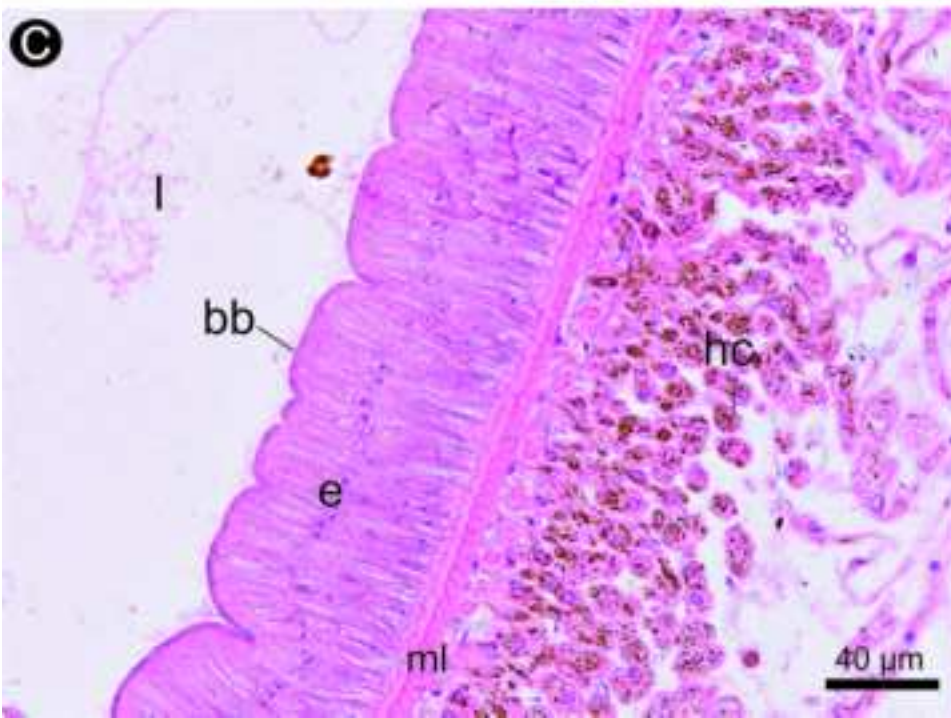
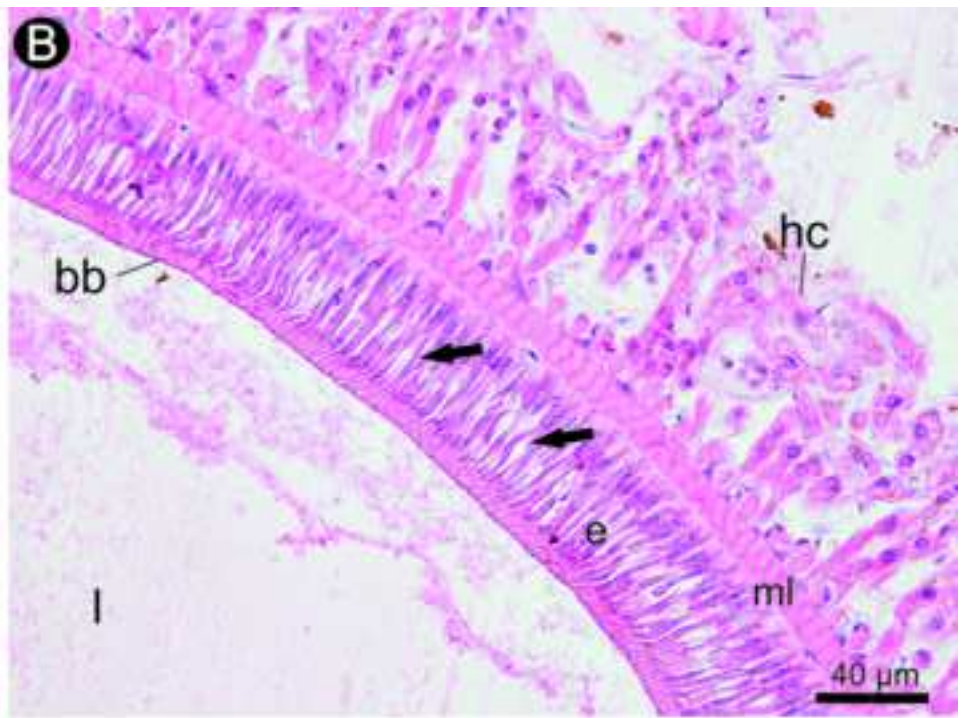
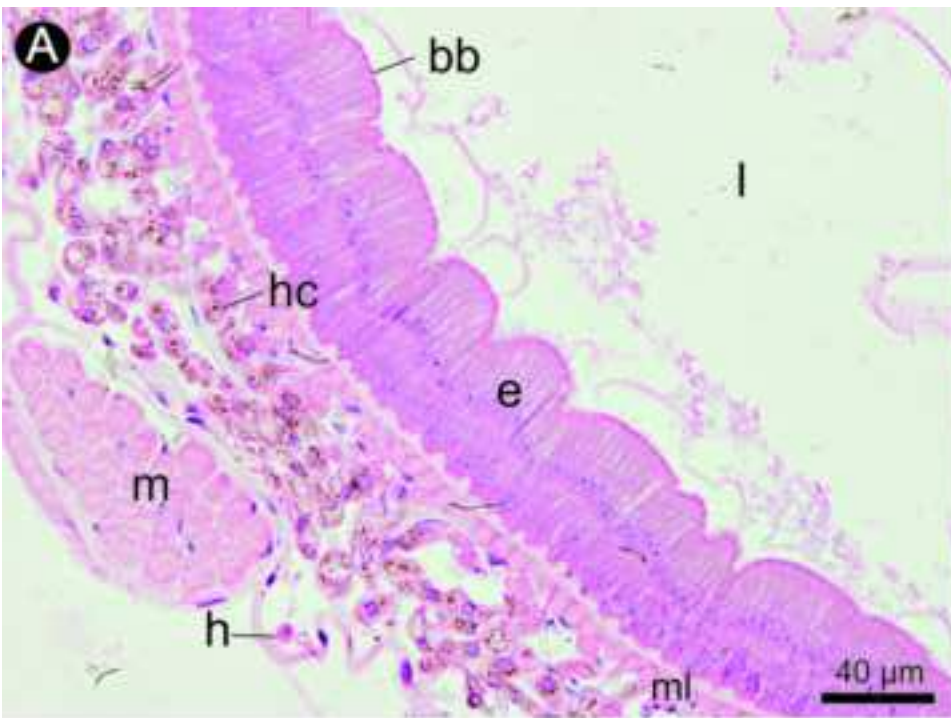
15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65

Table 3 – Mean and standard deviation of the values of histochemical marking intensity in the midgut of *R. padbergi* exposed to fertigated soils by vinasse for different periods.

		NEUTRAL POLISSACARIDES (PAS)		CALCIUM (VON KOSSA)		TOTAL PROTEINS (BROMOPHENOL BLUE)	
		Epithelial	Hepatic cells	Epithelial	Hepatic cells	Epithelial	Hepatic cells
21 DAYS	SC	3.33±1.21	3.0±1.09	0	3.42±0.97	5.33±0.81	4.33±0.81
	S5	2.88±1.36	4.22±1.20	3.77±1.30*	3.22±1.39	4.87±0.83	4.37±1.06
	S15	3.11±1.45	4.22±1.39	1.50±0.75	2.87±1.24	5.22±0.66	4.77±0.97
	S30	3.33±0.57	4.33±1.52	1.66±1.15	3.66±1.52	4.66±0.57	5.66±0.57
42 DAYS	SC	1.62±0.74	2.18±1.06	1.50±1.06	3.00±0.92	3.75±1.38	5.12±0.83
	S5	2.12±0.83	2.75±0.70	2.57±1.98	3.57±1.27	4.33±1.21	5.33±0.51
	S15	1.25±0.50	3.25±0.70	2.75±1.5	4.00±1.15	3.25±0.50	4.50±0.57
	S30	-	-	-	-	-	-

SC: soil control; **S5:** soil fertigated with vinasse for 5 years; **S15:** soil fertigated with vinasse for 15 years; **S30:** soil fertigated with vinasse for 30 years ; * : statistically significant values. by the Kruskal-Wallis test with p<0.05. compared to the negative control.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

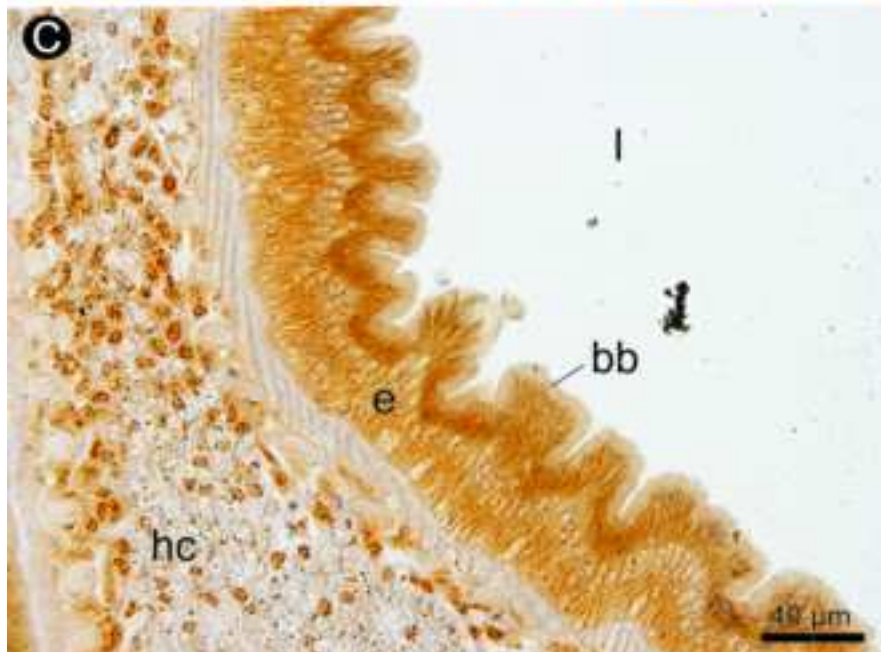
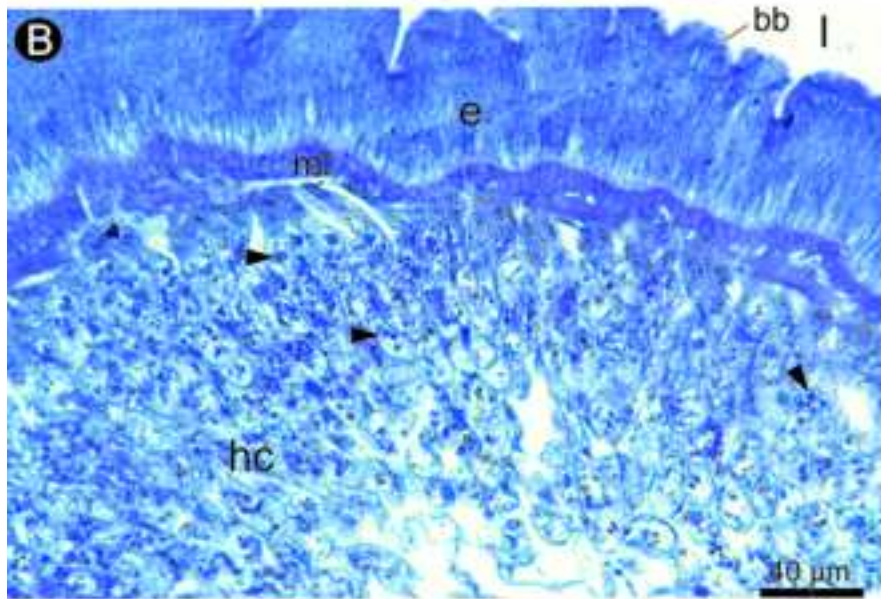
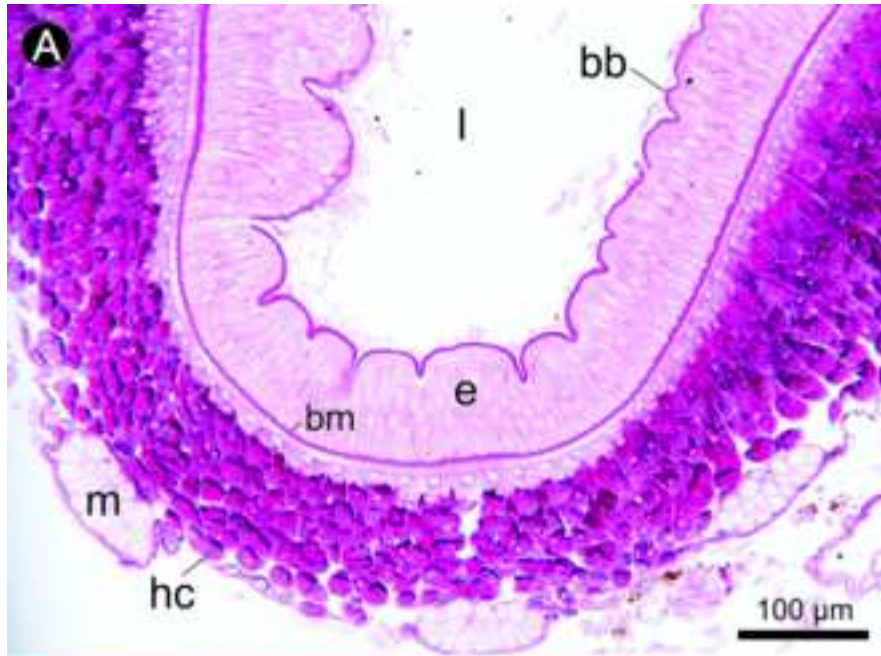
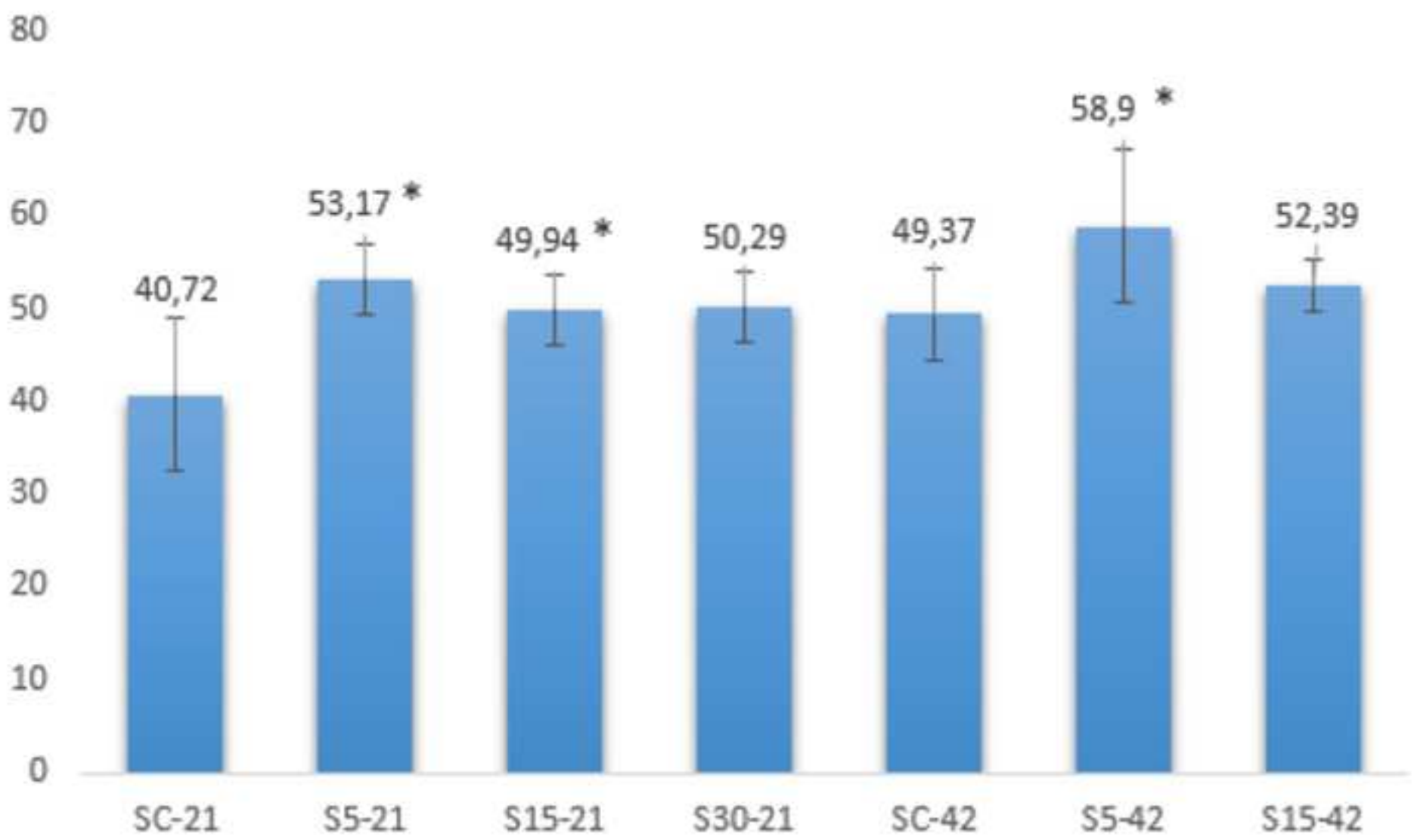
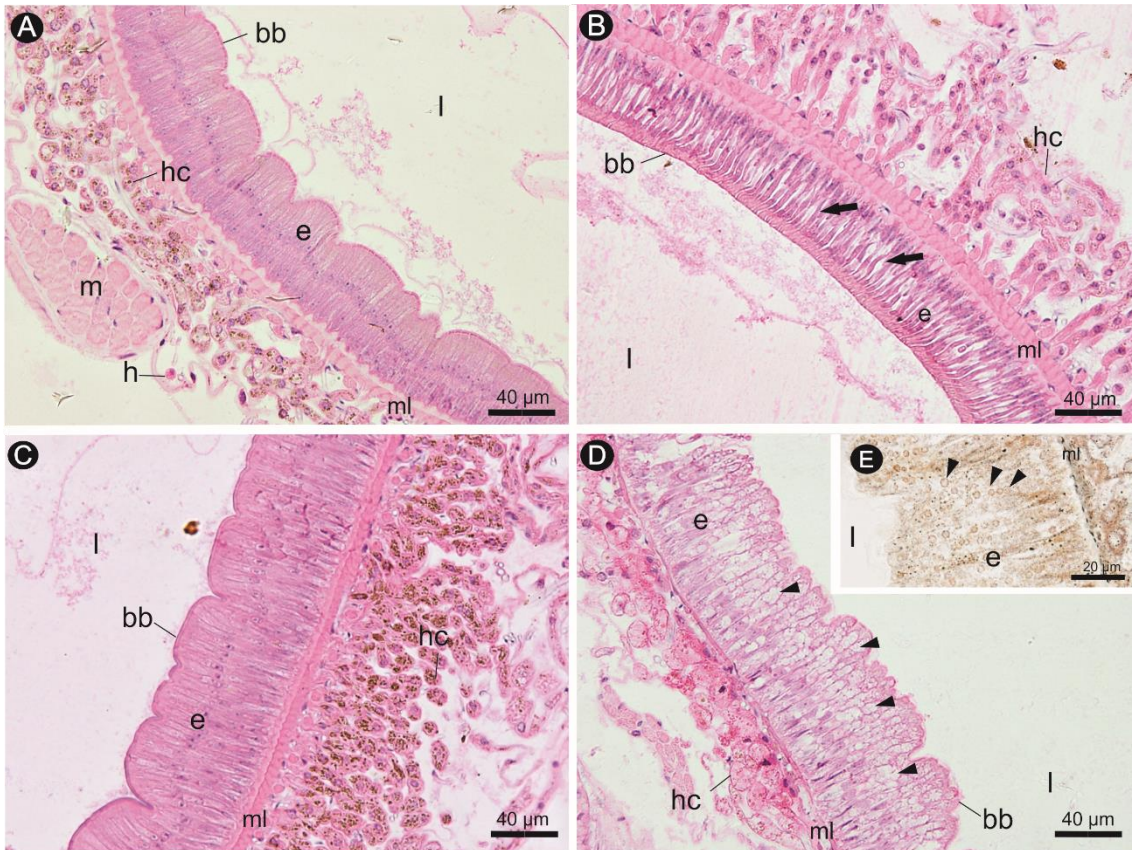
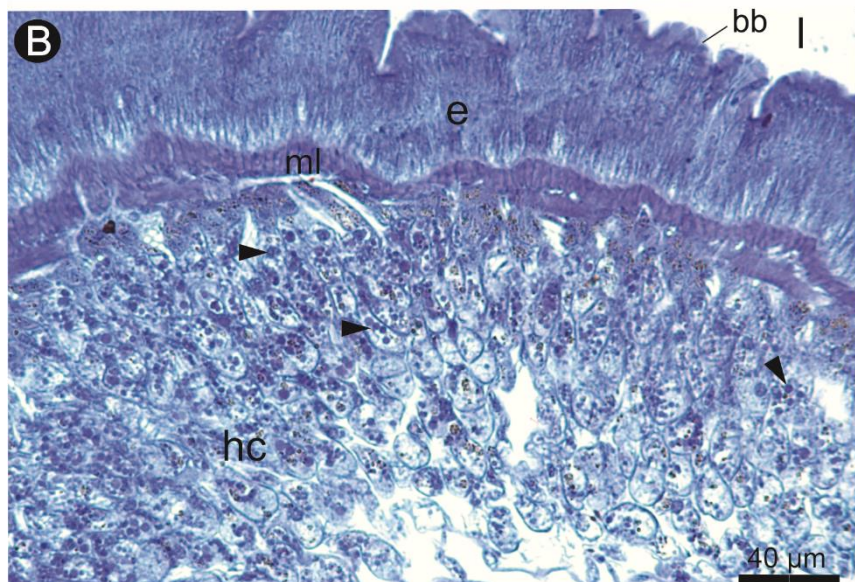
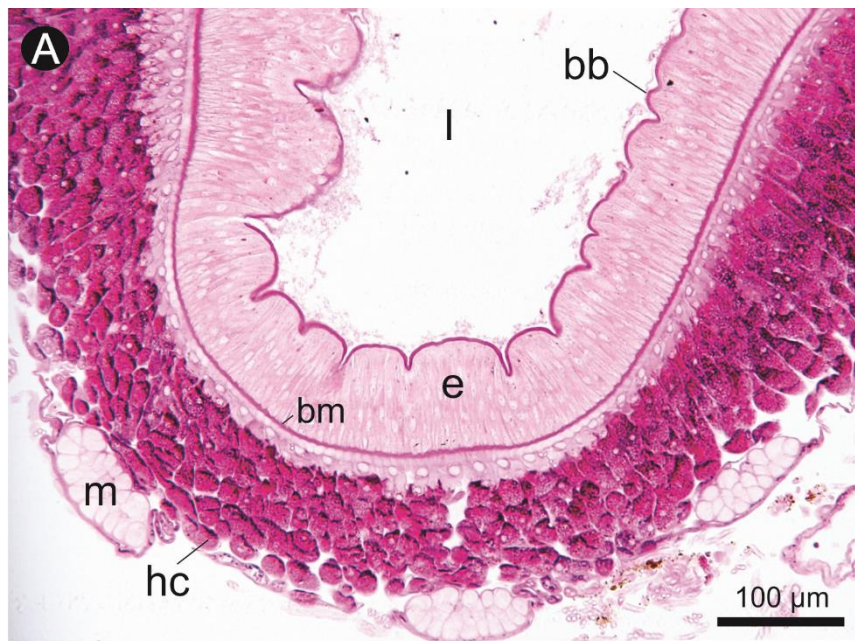


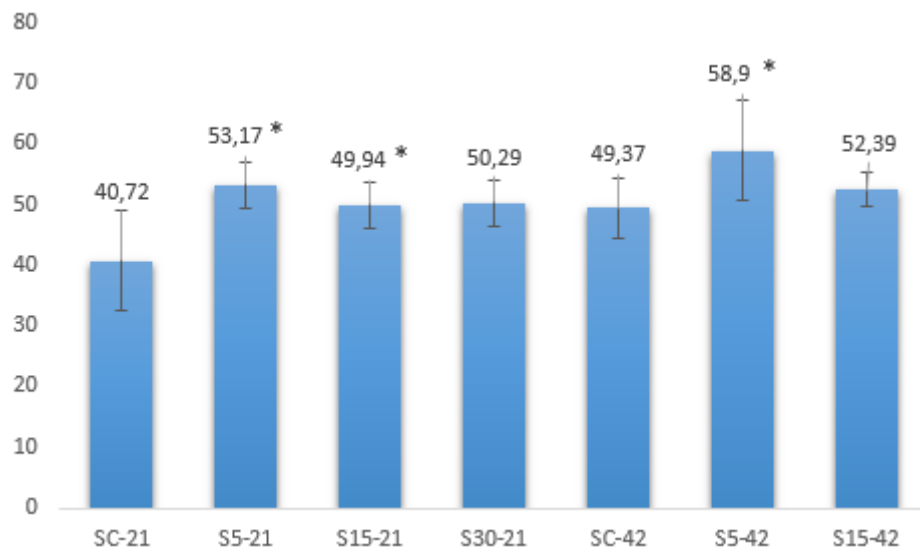
Figure 3

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49









1 **Artigo 2.**

2 **MOBILIDADE DO ÍON POTÁSSIO É ALTERADA COM FERTIRRIGAÇÃO**
3 **DE VINHAÇA AO LONGO DOS ANOS?**

4

5 Correia, J.E.; Grecco, K.L.; Miranda, J.H.; Fontanetti, C.S.

6

7 ¹ UNESP (São Paulo State University)-Rio Claro, Zip Code 13506-900, Rio Claro, SP,

8 *Brazil.*

9 ² ESALQ (Luiz de Queiroz College of Agriculture – São Paulo University) – Piracicaba,
10 *SP, Brazil*

11

12 *Corresponding author: Phone: +55 19 35264139; Fax: +55 19 35264136.

13

[Email: jorgecorreia@hotmail.com](mailto:jorgecorreia@hotmail.com)

14 **Resumo**

15 O estudo do transporte dos componentes químicos no perfil do solo é importante, tanto do
16 ponto de vista ambiental quanto econômico, uma vez que o entendimento dos
17 parâmetros de transporte de solutos nessa matriz nos auxiliam na redução da lixiviação
18 destes para as camadas subsuperficiais. Nesse sentido, considerando a prática da
19 fertirrigação da vinhaça na lavoura de cana-de-açúcar há quase 40 anos, esse estudo
20 objetivou avaliar se os anos de aplicação de vinhaça como fertilizante altera a mobilidade
21 do íon potássio. Amostras de solo foram coletadas em áreas de cultura canavieira com 5
22 (S5), 15 (S15) e 30 anos (S30) de uso de vinhaça como fertilizante e de uma área da
23 mesma região sem influencia antrópica para atuar como solo referência (SR). Assim, a
24 dinâmica do íon potássio foi investigada mediante a análise de seus parâmetros de
25 transporte, obtidos pelo ajuste numérico das curvas de distribuição de efluentes
26 (Breakthrough Curves, BTC) aplicando o código CFITIM dentro do software
27 STANMOD (STudio of ANalytical MODels) e pelo modelo HYDRUS -1D. Nos ensaios
28 em coluna segmentada a diferença entre o solo referência e os solos fertirrigados se deu
29 na concentração de potássio nos anéis inferiores, sendo maior nos solos fertirrigados,
30 indicando uma maior mobilidade do potássio nesses solos. Nos ensaios de BTC's,
31 observou-se nas curvas das simulações que a concentração de potássio chegou a 100%

32 dos valores de entrada para quase todas as triplicatas de todos os solos. O equilíbrio foi
33 atingido mais rápido no solo S5 em relação ao solo referência e mais rápido ainda no S15.
34 Em contrapartida o solo S30 foi o que apresentou maior interação do íon potássio com o
35 solo, confirmados por apresentar os maiores valores de coeficiente de retardamento (R) e
36 coeficiente de distribuição sendo estatisticamente significativos quando comparados entre
37 eles. Tendo em vista os resultados obtidos nesse estudo podemos concluir que o fator
38 tempo de uso do solo influencia na mobilidade do potássio, principal íon de interesse para
39 fertilização de solos. Quanto maior o tempo de aplicação, mais o potássio é retido por
40 processos de advecção

41

42 **Palavras-Chave:** Breakthrough Curves; HIDRUS-1D; fertirrigação, cana-de-açúcar.

43

44

45 1. INTRODUÇÃO

46 A adubação por meio de aplicação de fertilizantes visa suprir demandas
47 nutricionais que são exigidas pelos cultivos, buscando-se fornecer quantidades ideais de
48 nutrientes requeridas pela planta no momento adequado, visando sempre alcançar bons
49 rendimentos e produtos de qualidade. Portanto, para o sucesso dessa prática é essencial
50 que os nutrientes aplicados permaneçam em uma posição no perfil de solo que
51 preferencialmente estejam disponíveis às plantas, ou seja, principalmente em sua zona
52 radicular (profundidade efetiva das raízes). Entretanto, em alguns casos a adubação não
53 é feita e nem manejada de forma adequada, utilizando-se de elevadas quantidades de
54 fertilizantes. Dentre esses casos, pode-se citar o da vinhaça, resíduo proveniente do
55 processamento da cana-de-açúcar para a produção de etanol, a qual possui alta carga
56 orgânica e elevada concentração de potássio, nitrogênio e fósforo, sendo utilizado como
57 fertilizante nas próprias culturas de cana-de-açúcar (CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

58 A vinhaça é produzida em uma razão de 15:1 em relação à produção de etanol, e
59 vem sendo utilizada como fertilizante desde a década de 80 quando foi proibido seu
60 descarte em recursos hídricos (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Entretanto a
61 regulamentação de seu uso no solo ocorreu apenas em 2006 e apenas para o estado de
62 São Paulo, seu maior produtor. Tendo isso em vista, a vinhaça vem sendo aplicada no
63 cultivo canavieiro há praticamente 40 anos, sendo trinta deles sem nenhum controle por
64 parte de órgãos governamentais.

65 A vinhaça é uma mistura complexa que contém tanto componentes orgânicos
66 como inorgânicos. Seu comportamento no solo é bastante variado, podendo modificar a
67 distribuição e tamanho das partículas de solo e conseqüentemente a geometria dos poros
68 de solos arenosos e argilosos (ROLLING; FREIRE, 1997).

69 Silva et al. (2007) observaram que a vinhaça promove mudanças nas propriedades
70 físicas do solo, porém com efeitos distintos. Dependendo do tipo de solo a vinhaça pode
71 elevar a capacidade de infiltração do solo, por meio da melhoria de sua porosidade e dessa
72 forma, aumentando a possibilidade de contaminação de águas subterrâneas. Como
73 também, pode causar o efeito contrário em relação à capacidade de infiltração do solo, ou
74 seja, reduzindo e promovendo o aumento do escoamento, nesse sentido, com possível
75 incremento da contaminação de águas superficiais.

76 De uma maneira geral, vários estudos afirmaram que elevadas doses de vinhaça
77 aplicadas aos solos contribuem para o aumento da capacidade de troca catiônica, da
78 porcentagem de saturação de bases e para a elevação do índice de pH do solo,
79 promovendo melhoria em sua fertilidade (SANTOS et al., 1981; BIANCHI et al., 2008;
80 BARROS et al., 2010).

81 Atualmente a legislação que rege as normas para aplicação de vinhaça se baseia
82 apenas nas concentrações de potássio presentes no solo e na vinhaça para o cálculo da
83 quantidade aplicada por hectare. O potássio é um íon móvel nos solos e, como tal,
84 quantidades significativas podem ser perdidas por lixiviação, afetando a eficiência dos
85 fertilizantes aplicados (ALFARO et al., 2004b). O aumento dos custos com fertilizantes
86 e questões relacionadas à qualidade das águas subterrâneas estão trazendo impactos
87 econômicos e ambientais (SHARMA; SHARMA, 2013).

88 Outro aspecto a ser observado é que a ocorrência de excesso de água proveniente
89 tanto da irrigação quanto da chuva, pode favorecer o deslocamento de íons pelos
90 processos de escoamento superficial o que pode causar também a contaminação de águas
91 superficiais pela erosão hídrica e eutrofização; e de lixiviação para camadas profundas do
92 solo, tornando os nutrientes indisponíveis às plantas e podendo, causar a contaminação
93 de águas subterrâneas e acidificação de camadas do solo (GRECCO, 2019). Para evitar
94 tais prejuízos ambientais, além de aspectos econômicos, como as perdas dos nutrientes, o
95 estudo sobre a dinâmica desses solutos em um perfil de solo, passa a ser relevante.

96 Para um melhor entendimento dessa dinâmica, a sua representação e interpretação
97 é feita por meio da obtenção de alguns parâmetros de transporte de solutos no solo. Como
98 exemplo, dentre esses parâmetros, pode-se citar o fator de retardamento (R), que é

99 definido como sendo a capacidade de adsorção do soluto pelo solo. Outro parâmetro
100 utilizado é o chamado coeficiente de dispersão, o qual representa um movimento
101 proporcionado por variações na velocidade de deslocamento da solução entre os poros de
102 diferentes tamanhos, formas e direções (GRECCO, 2019).

103 Para adquirir tais parâmetros de transporte dos solutos é necessário o ajuste
104 numérico da equação diferencial de advecção-dispersão, a qual representa a dinâmica de
105 solutos no solo. O ajuste pode ser feito de forma inversa, mediante o conhecimento das
106 concentrações dos solutos, diante da coleta de dados obtidos pelas curvas de distribuição
107 de efluentes, cujo termo internacionalmente utilizado é “*Breakthrough Curves*” (BTC)
108 (Curvas de Avanço). As BTC’s são obtidas em condições de laboratório, utilizando-se
109 colunas preenchidas com material de solo em condição de saturação do solo.

110 O modelo HYDRUS-1D (ŠIMŮNEK et al., 2009, 1998) pode ser utilizado para a
111 simulação do movimento unidimensional de água, calor e múltiplos solutos em um solo
112 saturado ou não saturado. O modelo utiliza da técnica de elementos finitos lineares para
113 resolver numericamente a equação de Richards para fluídos de água em meio saturado ou
114 não saturado, as equações de dispersão e advecção tendo como base a lei de Fick para o
115 transporte de calor e soluto

116 Portanto, embora o comportamento do íon potássio seja estudado para diversos
117 tipos de solo (GRECCO, 2019; ZENG, BROWN, 2000; ERNANI et al., 2012), ainda há
118 necessidade desse tipo de pesquisa e por esse motivo, objetivou-se com o presente estudo
119 avaliar a alteração da mobilidade dos íons potássio e nitrato em um material de solo que
120 teve aplicação de vinhaça, como fertilizante, ao longo de diferentes intervalos de tempo
121 (5, 15 e 30 anos).

122

123 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

124 A pesquisa foi conduzida, basicamente, em três etapas: a) coleta do material de solo
125 em áreas com tempos diferentes de aplicação de vinhaça (5, 15 e 30 anos), b) obtenção
126 dos parâmetros de transporte mediante a elaboração de BTC’s e c) simulação pelo modelo
127 Hydrus da dinâmica de nitrato e potássio, mediante a aplicação de vinhaça, nesses
128 diferentes tipos de solo, em colunas segmentadas.

129

130 **2.1. Coleta do material de solo**

131 Foram selecionadas áreas de cultura canavieira de uma região do estado de São
132 Paulo (por motivos corporativos não foi permitida a divulgação das coordenadas

133 geográficas), cuja aplicação de vinhaça como fertilizante já ocorre há 5 (S5), 15 (S15) e
134 30 anos (S30). Além dessas áreas, a título de comparação, tem-se a área de referência
135 (SR) com baixa interferência antrópica e sem ter tido a aplicação de vinhaça ou qualquer
136 tipo de fertilizante.

137

138 **2.1.1. Análises físico-químicas das amostras de solo**

139 As amostras coletadas desse material de solo (nas quatro áreas) foram enviadas ao
140 laboratório de análises ambientais para serem realizadas as análises físico-químicas
141 visando a quantificação de metais (As, Ba, Cd, Cu, Cr, Fe, Hg, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se
142 e Zn), macro e micronutrientes (N, Ca, P, K, S), relação carbono/nitrogênio (C/N),
143 matéria orgânica, capacidade de troca catiônica (CTC), e do potencial agronômico
144 (condutividade elétrica, carbono orgânico, fósforo total, nitrogênio Kjeldahl, nitrogênio
145 amoniacal, nitrogênio nitrato/nitrito, pH em água (1:10), potássio total, sódio total,
146 enxofre total, cálcio total, magnésio total, umidade, sólidos voláteis e sólidos totais).

147

148 **2.1.2. Curva de retenção de água no solo**

149 Foram coletadas amostras indeformadas em triplicata de solo em anéis de aço
150 inoxidável de dimensões de 3,0 cm de altura, 4,7 cm de diâmetro a uma profundidade de
151 40cm. As amostras foram então preparadas para a elaboração da curva de retenção de
152 água no solo (CRA). Dessa forma, iniciou-se com a saturação das amostras em uma
153 bandeja com água destilada. Depois, as amostras foram submetidas a diferentes tensões,
154 pela câmara de pressão de Richards, com os valores de 100 a 15000 hPa, para a obtenção
155 dos respectivos pontos da curva de retenção. O ajuste numérico dos parâmetros
156 representados pelas eqs. 1 e 2, foi feito pelo software Retention Curve (RETC) (Van
157 GENUCHTEN et al., 1991), seguindo o ajuste do modelo proposto por van Genuchten
158 (1980):

159

160

161

162

163

164

165

$$\theta = \theta_r + \frac{\theta_s - \theta_r}{[1 + (\alpha \cdot |\phi_m|)^n]^m} \quad (1)$$

166

$$m = 1 - \frac{1}{n} \quad (2)$$

167 Em que:

θ	umidade volumétrica do solo ($\text{cm}^3 \text{ cm}^{-3}$)
ϕ_m	potencial mátrico (cm)
θ_r	umidade residual do solo ($\text{cm}^3 \text{ cm}^{-3}$)
θ_s	umidade de saturação do solo ($\text{cm}^3 \text{ cm}^{-3}$)
α	parâmetro de ajuste (cm^{-1})
m e n	parâmetros de ajuste

168

169

170 2.2. Ensaio de colunas para elaboração de BTC (Breakthrough Curve)

171 Foram utilizadas colunas de PVC, com as dimensões de 20 cm de altura e 5 cm
 172 de diâmetro, as quais foram preenchidas com os solos SR, S5, S15 e S30, em camadas
 173 constantes, equivalentes e homogêneas nas mesmas densidades obtidas nos ensaios em
 174 coluna segmentada. Um dreno foi instalado na parte superior da coluna com a função de
 175 manter a carga hidráulica de 1 cm, e na parte inferior, um círculo de manta geotêxtil e
 176 uma grade metálica, fixados por um “cap”, com a função de dar o suporte de sustentação
 177 do solo dentro da coluna. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

178 Logo após, as amostras foram saturadas com água deionizada de maneira lenta e
 179 ascendente, por capilaridade por cerca de 24 hora. Após a saturação, iniciou-se o processo
 180 de “lavagem” do solo, o qual consiste na passagem de água deionizada através da coluna
 181 durante um período de 24 horas para que a maioria dos íons, presentes no complexo de
 182 troca, e facilmente solúveis, seja dissolvida e removida pela água percolante. Montado
 183 desta forma, as colunas se comportaram como permeâmetros de carga constante, sendo
 184 possível, portanto, determinar a condutividade hidráulica do solo saturado.

185 Em seguida, aplicou-se vinhaça sob vazão constante. Foram então coletados
 186 volumes sequenciais de efluentes de 15 mL em frascos de acrílico. Cada frasco coletado
 187 representando uma pequena fração do volume total de poros do solo na coluna (VP). Os
 188 volumes de poros são obtidos pela relação entre o volume de efluente coletado e o volume
 189 de poros da coluna (obtido pelo produto da porosidade do solo e o volume total de solo
 190 na coluna ($392,7 \text{ cm}^3$)). O ensaio foi interrompido quando a concentração de potássio e

191 nitrato, que estavam sendo aplicados à coluna (concentração de entrada) foi igual ou
192 próxima à concentração desses elementos obtidos na sequência dos efluentes.

193 Após realizada a curva de distribuição de efluentes, utilizando-se o modelo
194 STANMOD (STudio of ANalytical MODels), mediante um ajuste numérico das BTC's,
195 foram obtidos os parâmetros de transporte dos íons potássio e nitrato para os diferentes
196 tipos de solo: número de Peclet (P), coeficiente de dispersão (D), número de Peclet em
197 função da Dispersividade ($\lambda - P(\lambda)$), número de Peclet em função da velocidade da solução
198 no poro ($v - P(v)$) e fator de retardamento (R).

199

200 **2.3. Ensaio em coluna segmentada e aplicação do modelo Hydrus 1D**

201 Foram utilizadas colunas segmentadas de acrílico, que receberam, em seu interior,
202 um tratamento com jato de areia, com o objetivo de aumentar a sua rugosidade e evitar
203 possíveis fluxos preferenciais da vinhaça durante os ensaios.

204 A coluna foi composta por oito anéis de 7 cm de altura e um anel superior de 5 cm
205 de altura, o qual com função de proteção no momento da aplicação e também de auxiliar
206 na verificação da formação de uma possível lâmina da solução aplicada. A coluna foi
207 preenchida de forma homogênea e uniforme e fita adesiva foi utilizada para vedar e unir
208 um anel ao outro. Sobre a superfície do solo, no primeiro anel, foi colocada uma manta
209 acrílica de forma circular, de área igual a área da seção interna da coluna, para que não
210 ocorresse selamento da camada superficial, devido ao gotejamento da solução, e para
211 melhorar a distribuição de aplicação sobre a superfície do solo. Todo o material (coluna
212 vazia, manta acrílica e as fitas adesivas) foi pesado antes e depois do preenchimento da
213 coluna, para obtenção da densidade do solo nas colunas. O ensaio foi realizado em
214 triplicata para todos os solos coletados.

215 Após montagem na coluna aplicou-se vinhaça a uma taxa de aplicação de 1,17 mL
216 min^{-1} . A aplicação foi interrompida ao atingir o oitavo anel, com o objetivo de obter três
217 diferentes perfis ao longo da coluna: um perfil superficial (com maior aplicação de
218 vinhaça), um perfil intermediário e o perfil ao final ad coluna (sendo possível obter a
219 concentração inicial de potássio e nitrato, para cada material de solo estudado). Após
220 transcorrido esse tempo de aplicação, relativo à cada tipo de solo, os anéis foram
221 desmontados rapidamente e separados em recipientes numerados. Em um primeiro
222 instante, foi obtido o valor da umidade do solo após o fornecimento da vinhaça. A
223 umidade do solo foi medida pelo método gravimétrico. Como nos anéis inferiores a
224 umidade foi menor, necessitou-se adicionar água destilada para facilitar a extração da

225 solução; assim, o valor da umidade foi alterado, necessitando-se determinar o novo valor,
226 para se fazer o ajuste de acordo com a situação inicial. As pastas ficaram em repouso por
227 24 h e depois por meio de filtro e bomba de vácuo, retiraram-se as soluções e submetidas
228 a análise junto ao Laboratório de Solos da ESALQ para quantificação de metais (Al, As,
229 B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Si, Zn). Dessa forma,
230 foi possível a elaboração os perfis dos nutrientes potássio e nitrato ao longo da coluna de
231 solo, preenchida com os diferentes tipos de solo (com diferentes tempos de aplicação de
232 vinhaça). A análise da concentração de potássio, as soluções obtidas pela extração da
233 pasta de cada anel de cada coluna, foram submetidas a um fotômetro de chama ajustado
234 e calibrado por meio de curva de calibração para o potássio com soluções em
235 concentrações 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 ppm.

236 Concluída as etapas anteriores, iniciou-se as simulações numéricas pelo modelo
237 HYDRUS-1D. Para tal, os parâmetros de transporte obtidos em cada altura das colunas
238 para os solutos foram utilizados como dados de entrada no modelo, juntamente com os
239 dados granulométricos e de densidade de cada solo. Assumiu-se o valor do tempo inicial
240 como sendo “zero” e o final após o término da coleta de volumes nas BTC’s. O intervalo
241 de tempo variou para cada tipo de solo de acordo com os volumes de poros e a opção da
242 saída de dados simulados a cada segundo não foi selecionada. Os critérios de iterações
243 foram mantidos seguindo os valores recomendados pelo manual do modelo.

244

245 **3. RESULTADOS**

246 **3.1. Análises físico-químicas das amostras de solo**

247 Os resultados das análises físico-químicas dos solos coletados foram sintetizados
248 na Tabela 1. O solo SR obteve os maiores valores de carbono orgânico total, e metais
249 como cromo e níquel. Já o solo S30 obteve os maiores valores de nitrogênio kjeldahl,
250 fósforo e potássio (quase cinco vezes maior comparado ao controle), zinco, magnésio,
251 cobre, cálcio (dez vezes maior comparado ao solo referência) e bário. O pH dos solos,
252 com exceção do solo S15, foi considerado levemente ácido.

253

254

255

256

257

258

259 **Tabela 1.** Valores de análise físico-química de solos que receberam fertirrigação de
 260 vinhaça ao longo do tempo.

Parâmetro	SR	S5	S15	S30
pH	5,80	5,90	7,2	5,4
Umidade	13,24	2,95	1,43	22,92
Nitrogênio Nítrico (Diluição2)	-	47,79	17,27	73,91
Nitrogênio amoniaco	38,00	45,10	28,30	44,40
Nitrogênio Kjeldahl	274,00	650	493	946
Carbono Orgânico Total	7,82	2,73	3,14	6,93
Condutividade elétrica	0,114	0,126	0,120	-
Enxofre	4,78	8,54	13,69	8,21
Potássio	288,00	80,00	152,8	1416
Fósforo	482,00	478	795	2327
Arsênio	-	0,720	1,11	0,87
Bário	30,67	27,78	9,71	83,98
Cálcio	135,1	442	914	1376
Chumbo	3,70	6,02	6,32	12,31
Cobre	41,89	4,74	6,158	86,12
Cromo	33,57	22,82	28,02	24,10
Magnésio	274,00	115,0	342	640
Níquel	14,35	2,01	2,170	9,20
Sódio	131,00	251,40	197,6	<56,657
Zinco	54,50	6,12	9,46	66,9

261 **SR:** solo referência; **S5:** solo fertirrigado por vinhaça por 5 anos; **S15:** solo fertirrigado
 262 por vinhaça por 15 anos; **S30:** solo fertirrigado por vinhaça por 30 anos; -: valores que
 263 não atingiram limite de quantificação. Valores em mg/L.

264

265 **3.2. Análise de metais do lixiviado da vinhaça**

266 Como os ensaios foram feitos em triplicata, a média dos valores para cada metal
 267 presente no lixiviado da vinhaça foram sintetizados na Tabela 2. O lixiviado do solo
 268 referência obteve os menores valores. Foram observados elevados valores de cálcio,
 269 magnésio, potássio e chumbo nos solos das áreas fertirrigadas com vinhaça. Tendo em
 270 vista as análises físico-químicas dos solos e da vinhaça utilizada nas colunas para
 271 percolação (Tabela 3), apenas as concentrações elevadas de chumbo não foram coerentes.

272 **Tabela 2** – Média dos valores de metais (mg/L) obtidos após percolação de vinhaça em
 273 coluna dos solos de diferentes tempos de fertirrigação por vinhaça.

Parâmetro	SR	S5	S15	S30
Alumínio	0,10	0,06	0,21	-
Bário	-	0,90	0,68	0,72
Calcio	4,46	1070,0	983,66	625,62
Cobre	0,01	0,03	0,08	0,02
Ferro	0,13	0,07	0,43	0,06
Potássio	3,64	212,60	306,46	635,1
Magnésio	0,65	600,63	799,06	460,06
Manganês	0,05	1,11	0,35	0,88
Sódio	6,71	14,99	9,36	50,17
Níquel	0,21	2,54	4,94	0,89
Chumbo	3,80	225,63	397,16	119,65
Silício	-	7,19	7,19	1,51
Zinco	0,05	0,30	0,09	0,37

274 **SR:** solo referência; **S5:** solo fertirrigado por vinhaça por 5 anos; **S15:** solo fertirrigado
 275 por vinhaça por 15 anos; **S30:** solo fertirrigado por vinhaça por 30 anos. Valores em
 276 mg/L; -: valores que não atingiram os limites de quantificação.

277

278

279 **Tabela 3** - Valores de análise físico-química da vinhaça bruta utilizada nas colunas

Parâmetro	Vinhaça safra 2017
pH	4,20
Nitrogênio amoniacal	10,77
Nitrogênio Kjeldahl	278,90
Sódio	12,4
Carbono Orgânico Total	7,82
Condutividade elétrica	0,623
Enxofre	8,02
Potássio	3210,00
Fósforo	49,3
Arsênio	-
Bário	0,20
Cálcio	992
Chumbo	-
Cobre	0,19
Cromo	0,02
Magnésio	
Molibdênio	0,01
Níquel	0,024
Sódio	
Zinco	0,754

280 Valores em mg/L; -: valores que não atingiram os limites de quantificação.

281

282 3.3. Curva de retenção de água no solo

283 Após obtenção dos valores na câmara de Richards, com auxílio do software
 284 Retention Curve (RETC) foi traçada a curva de retenção e obtidos os parâmetros θ_r , n e
 285 α , essenciais para estabelecer a movimentação dos íons na coluna de solo. As curvas de
 286 retenção e os valores obtidos para os solos S5, S15 e S30 seguem abaixo:

287

288 **Tabela 4.** Parâmetros da curva de retenção, segundo o modelo de van Genuchten
 289 (1980) dos três solos submetidos à simulação

	θ_r	θ_s	α	n	m
S5	0,18169	0,36612	0,03215	1,48662	0,32733
S15	0,14855	0,34363	0,02500	1,49320	0,3302
S30	0,26306	0,54744	0,04244	1,18469	0,15589

290 **S5:** solo fertirrigado por vinhaça durante 5 anos; **S15:** solo fertirrigado por vinhaça
 291 durante 15 anos; **S30:** solo fertirrigado por vinhaça durante 30 anos.

292

293

294 3.4. Breakthrough curves e os parâmetros de transporte de potássio

295 As BTC's do potássio (K^+), nos solos que receberam vinhaça e no solo referência
 296 para colunas com 20 cm de altura, podem ser conferidas pela Figura 1. Observa-se nas
 297 curvas das simulações que a concentração de potássio chegou a 100% dos valores de
 298 entrada para quase todas as triplicatas de todos os solos. O equilíbrio é atingido mais
 299 rápido no solo S5 em relação ao solo referência e mais rápido ainda no S15. Em
 300 contrapartida o solo S30 foi o que apresentou maior interação do íon potássio com os
 301 solos, confirmados por apresentar os maiores valores de coeficiente de retardamento (R)
 302 e coeficiente de distribuição (Tabela 4), sendo estatisticamente significativos quando
 303 comparados entre eles pelo método ANOVA com pos-hoc de Dunnett com $p < 0,05$.

304

305

306

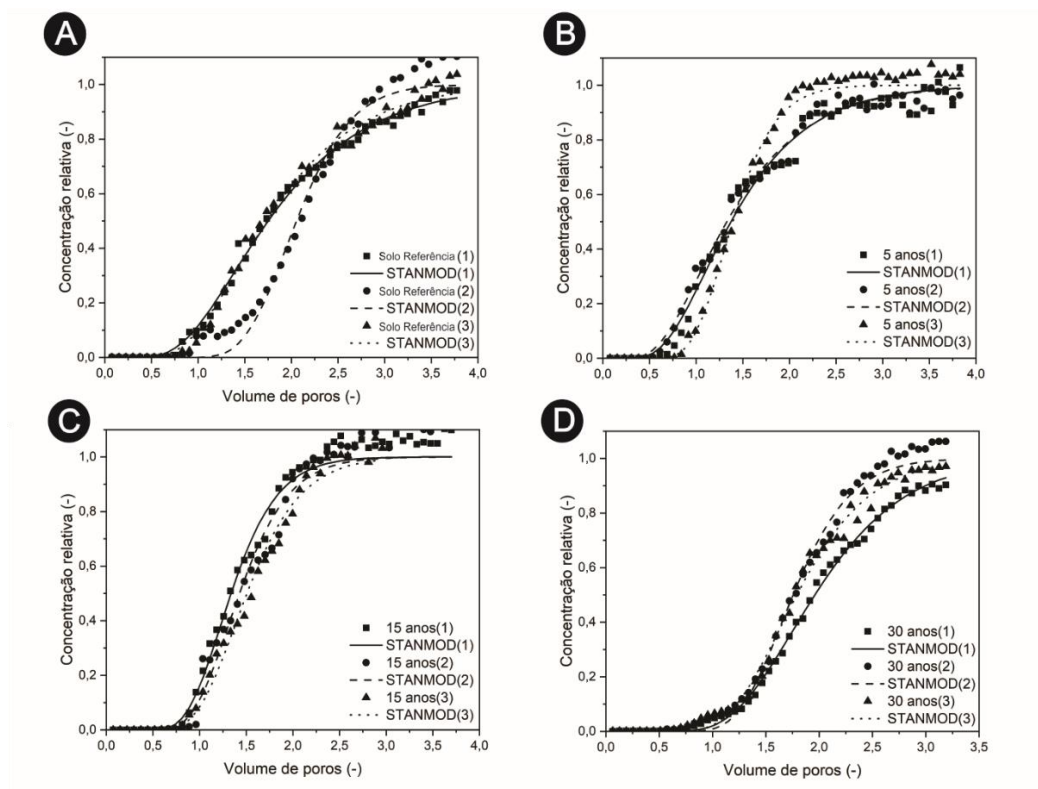
307

308

309

310

311



312

313

314

315

316

Figura 1 – Simulações utilizando STANMOD com parâmetros de entrada das BTC's.

Tabela 4 - Parâmetros de transporte do K^+ para os solos em colunas.

	P	λ	D	R	Kd
5 Anos	8,346	2,372	0,001	1,358	0,109
	7,241	2,734	0,001	1,310	0,094
	29,389	0,673	0,001	1,391	0,119
Média	14,99233	1,926	0,001	1,353	0,107
15 Anos	22,25739	0,889	0,001	1,334	0,099
	22,74172	0,870	0,001	1,424	0,126
	21,468	0,922	0,001	1,504	0,150
Média	22,155	0,894	0,001	1,420	0,125
30 Anos	17,033	1,162	0,001	1,954	0,574
	33,766	0,586	0,001	1,754	0,454
	21,929	0,902	0,001	1,787	0,473
Média	24,243	0,883	0,001	1,832 *	0,500 *

317

318

319

P: número de Peclet; **R**: fator de retardamento; **Kd**: coeficiente de distribuição; **D**: coeficiente de dispersão; λ : dispersividade; *: valores significativos pelo método ANOVA com pos-hoc de Dunnett com $p < 0,05$.

3.5. Simulação da dinâmica de potássio em coluna segmentada

Os valores obtidos por meio do fotômetro de chama foram ajustados juntamente com a curva de retenção para todas as colunas realizadas e podem ser conferidos pelas Figuras 4, 5, 6 e 7. A curva de concentração de potássio acompanhou a frente de molhamento da coluna, ou seja, as maiores concentrações de potássio são pertencentes aos primeiros anéis da coluna, tendo sua concentração diminuída nos anéis mais profundos. A diferença entre o solo referência e os solos fertirrigados se deu na concentração de potássio nos anéis inferiores, sendo maior nos solos fertirrigados, indicando uma maior mobilidade do potássio nesses solos.

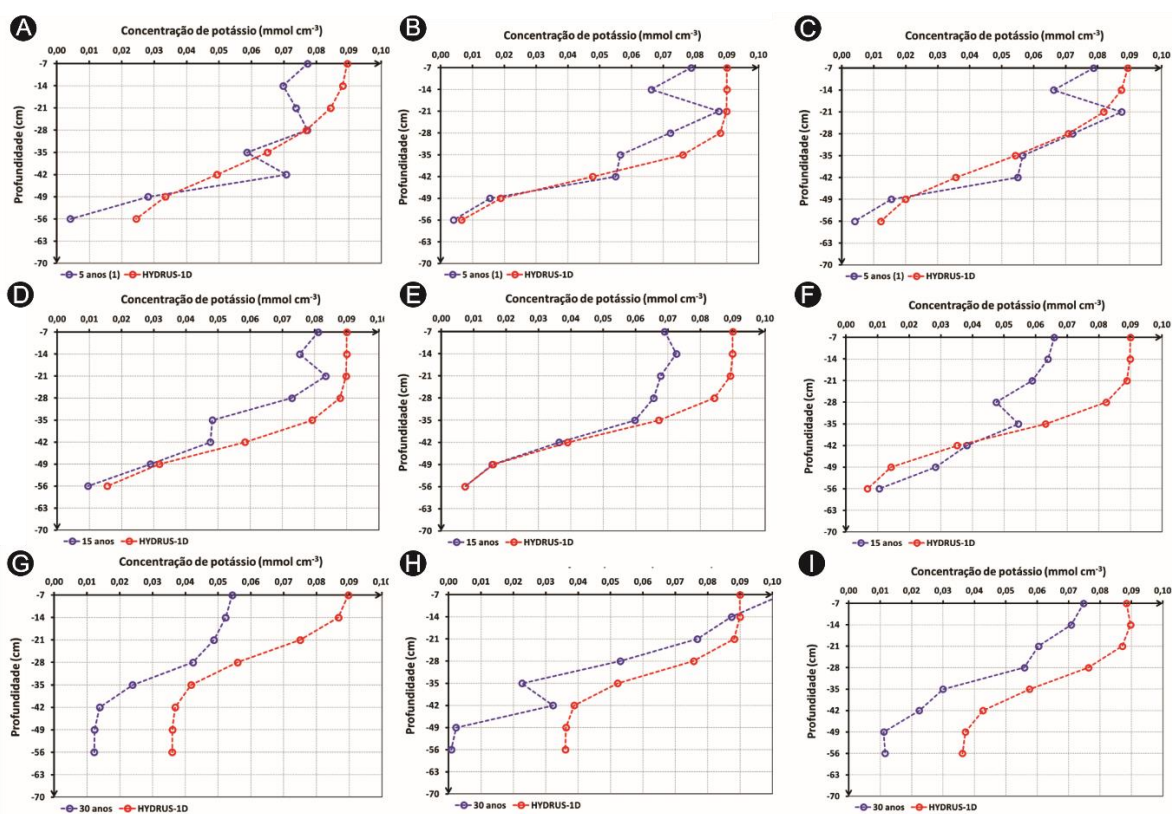


Figura 2. Representação esquemática do perfil de concentração de potássio na coluna segmentada de solo, em função do tempo de aplicação de vinhaça. **A-C:** solo com 5 anos de fertirrigação; **D-F:** solo com 15 anos de fertirrigação; **G-I:** solo com 30 anos de fertirrigação.

4. DISCUSSÃO

O uso da vinhaça de cana-de-açúcar como fertilizante gera controvérsias entre seus benefícios e seus impactos ambientais. Particularmente no setor sulcroalcooleiro brasileiro, praticamente toda a vinhaça gerada nas destilarias é direcionada à fertirrigação dos campos, buscando-se a reciclagem de água e nutrientes. Embora esta prática possibilite a obtenção de benefícios a curto prazo, a aplicação contínua de vinhaça na lavoura tem potencial para gerar inúmeros impactos adversos ao solo, recursos hídricos e produtividade da lavoura.

A vinhaça utilizada nesse estudo apresentou características comuns a outras vinhaças utilizadas em diversos trabalhos (CORREIA et al, 2017a; MARINHO et al., 2014; CHRISTOFOLETTI et al. 2013; KUMAR, GOPAL, 2001) como elevada DBO e DQO, pH baixo e altos teores de potássio, fósforo e cálcio.

Considerando que a fertirrigação de vinhaça nas culturas canavieiras se dá há quase 40 anos, foram selecionadas áreas canavieiras com 5, 15 e 30 anos dessa prática e uma área referência. Todas as áreas possuem a mesma classificação de latossolo vermelho. As amostras de solo foram enviadas a um laboratório de análises ambientais e tiveram sua composição físico-química comparadas. O solo SR obteve os maiores valores de carbono orgânico total, e metais como cromo e níquel. Já os solos fertirrigados por vinhaça obtiveram maiores diferenças nos níveis de nitrogênio kjeldahl, em relação ao solo referência, muito devido à fertilização feita nas áreas de uso agrícola. Já o solo S30 obteve os maiores valores de nitrogênio kjeldahl, bário, cobre, zinco, fósforo, potássio, magnésio e cálcio, os quatro últimos em proporções de duas à quatro vezes maiores aos menores valores encontrados no solo SR.

Os níveis crescentes e elevados de cálcio, potássio e magnésio presentes nas amostras coletadas nas áreas fertirrigadas por vinhaça levantam um alerta para um potencial processo de salinização do solo. Práticas agrícolas intensivas provocaram grave degradação ambiental, incluindo perda da biodiversidade e poluição de mananciais superficiais e subterrâneos devido ao uso intenso de fertilizantes e pesticidas nas lavouras (FAO, 2011). O processo de salinização envolve a concentração de sais solúveis na solução do solo e resulta na formação dos solos salinos, que resulta da acumulação de sais solúveis de Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^+ nos horizontes do solo (PEDROTTI et al., 2015; FUESS et al., 2017).

373 Por se tratar de uma mistura complexa, a vinhaça apresentou uma composição
374 variada com presença de muitos metais e compostos orgânicos. Uma das perguntas desse
375 estudo foi saber quais desses metais passam pela coluna de solo e se os anos de
376 fertirrigação de vinhaça alteram a concentração desses compostos que podem
377 possivelmente atingir águas subterrâneas. O lixiviado do solo SR obteve os menores
378 valores para cálcio, magnésio, chumbo e zinco. Foram observados elevados valores de
379 cálcio, magnésio, potássio e chumbo nos solos das áreas fertirrigadas com vinhaça.
380 Considerando as concentrações presentes na vinhaça e no solo desses três primeiros íons,
381 é de se esperar concentrações elevadas no lixiviado, mesmo esses íons possuindo cargas
382 positivas e ficando em sua maioria adsorvidos no solo. A concentração elevada de
383 chumbo no lixiviado dos solos S5, S15 e S30 é alarmante, porém a não presença de
384 concentrações desse elemento, na mesma magnitude, nas amostras de solo e da vinhaça
385 são contraditórias.

386 A CETESB, em 2005, lançou a norma técnica P 4.231/2005 a qual estabelece os
387 critérios e procedimentos para o armazenamento, transporte e aplicação da vinhaça,
388 gerada pela atividade sucroalcooleira no processamento de cana-de-açúcar. Sua base
389 cálculo é a concentração de potássio presente na vinhaça e no solo. Como essa legislação
390 só cobre menos de 1/3 do tempo de utilização da vinhaça como fertilizante, e
391 considerando que essa legislação é estadual, estudar o comportamento do potássio nos
392 solos fertirrigados por vinhaça ao longo de todo o período de sua utilização é de extrema
393 importância.

394 A curva de concentração de potássio acompanhou a frente de molhamento da
395 coluna, ou seja, as maiores concentrações de potássio são pertencentes aos primeiros anéis
396 da coluna, tendo sua concentração diminuída nos anéis mais profundos. A diferença entre
397 o solo referência e os solos fertirrigados se deu na concentração de potássio nos anéis
398 inferiores, sendo maior nos solos fertirrigados, indicando uma maior mobilidade do
399 potássio nesses solos. Segundo Malavolta (2005), pode haver fluxo de massa se forem
400 aplicadas doses elevadas do elemento no solo. Em concordância, Alfaro et al. (2004), ao
401 estudarem os fatores que afetam a lixiviação de potássio em diferentes solos, encontraram
402 que as perdas eram dependentes das quantidades do elemento disponível no solo.

403 Em experimento de deslocamento miscível em um latossolo vermelho, Rivera et
404 al. (2006) concluíram que há interação do potássio com a matriz do solo, uma vez que a
405 distribuição do elemento ficou restrita às camadas superficiais do bulbo úmido.
406 Resultados obtidos por outros autores, também em latossolo, corroboram a tese da

407 interação potássio-micela do solo (MIRANDA et al., 2005; MELO et al., 2006; ARAÚJO
408 et al., 2007; GONÇALVES et al., 2008). O mesmo foi observado no presente estudo uma
409 vez que as maiores concentrações de potássio foram encontradas nos primeiros dois anéis.

410 Para entender melhor a diferença de comportamento dos solos S5, S15 e S30 ao
411 receber vinhaça foram realizados ensaios de BTC's. Observou-se nas curvas das
412 simulações que a concentração de potássio chegou a 100% dos valores de entrada para
413 quase todas as triplicatas de todos os solos. O equilíbrio foi atingido mais rápido no solo
414 S5 em relação ao solo referência e mais rápido ainda no S15. Em contrapartida o solo S30
415 foi o que apresentou maior interação do íon potássio com o solo, confirmados por
416 apresentar os maiores valores de coeficiente de retardamento (R) e coeficiente de
417 distribuição sendo estatisticamente significativos quando comparados entre eles.
418 Provavelmente o alto teor de matéria orgânica presente no solo S30 favoreceu a maior
419 retenção do cátion potássio com a matriz desse solo. O coeficiente de dispersão e a
420 dispersividade indicam a movimentação do soluto no perfil do solo, o solo que obteve
421 maior dispersividade foi o solo S5.

422 Vilela et al. (2018) obtiveram o parâmetro R de 6,117 a 16,100 em colunas
423 preenchidas com Latossolo Vermelho (solo arenoso) e altura de 20 cm, o maior valor foi
424 na concentração de 32 mg L⁻¹ K⁺ por cloreto de potássio e os valores do parâmetros
425 foram distintos aos solos arenosos do presente trabalho.

426 Da Silva et al. (2012) determinaram o parâmetro R de 1,396 para o íon K⁺ em
427 colunas com aplicação de vinhaça, alturas de 20 cm e preenchidos com o Nitossolo
428 Vermelho, os valores foram próximos ao encontrado para o solo S5 e S15. A alta
429 concentração do soluto presente na vinhaça e o elevado número de Peclet, o qual indica
430 o predomínio do transporte advectivo, são justificativas para essa semelhança.

431 Tendo em vista os resultados obtidos nesse estudo podemos concluir que o fator
432 tempo de uso do solo influencia na mobilidade do potássio, principal íon de interesse para
433 fertilização de solos. Quanto maior o tempo de aplicação, mais o potássio é retido por
434 processos de advecção.

435

436 5. CONCLUSÕES

437 Tendo em vista os resultados obtidos nesse estudo podemos concluir que o fator
438 tempo de uso do solo influencia na mobilidade do potássio, principal íon de interesse para
439 fertilização de solos. Quanto maior o tempo de aplicação, mais o potássio é retido por
440 processos de advecção.

441 **6. AGRADECIMENTOS**

442 Os autores agradecem à Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo
443 (FAPESP), processos 2012/50197-2 e 2015/26157-9 pelo apoio financeiro.

444

445 **7. REFERÊNCIAS**

446 ALFARO, M.A., ALFARO, M.A., JARVIS, S.C., GREGORY, P.J. Factors affecting
447 potassium leaching in different soils. **Soil Use Management**. v..20, p.182–189, 2004a.

448 ALFARO, MARTA A., GREGORY, P.J., JARVIS, S.C. Dynamics of Potassium
449 Leaching on a Hillslope Grassland Soil. **Journal of Environmental Quality**, v. 33, p.
450 192, 2004b.

451 ARAUJO, C.A.S., RUIZ, H.A., FERREIRA, P.A., SILVA, D.J., CARVALHO, M.A.,
452 Transporte de fósforo e de potássio em colunas com agregados de um latossolo
453 vermelho distrófico. *Rev. Bras. Ciência do Solo* 24, 259–268, 2007.

454 BARROS, R. P.; VIÉGAS, P. R. A.; DA SILVA, T. L.; DE SOUZA, R. M.;
455 BARBOSA, L.; VIÉGAS, R. A.; BARRETTO, M. C. V.; DE MELO, A. S. Alterações
456 em Atributos Químicos de Solo Cultivado Com Cana-De-Açúcar e Adição de Vinhaça.
457 **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, Goiânia, v. 40, n. 3, p. 341-346, 2010.

458

459 BIANCHI, S.R.; NOGUEIRA, A.R.A.; MOREIRA, A.; SOUZA, G.B.; MENEZES,
460 E.A.; LOPES, W.V. Alterações nos atributos químicos de um latossolo vermelho
461 amarelo distrófico com adição de vinhaça. In: **Reunião Brasileira de Fertilidade do**
462 **Solo e Nutrição de Plantas**. Londrina. Fertbio, 2008.

463

464 CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) Vinhaça-criterios e
465 procedimentos para aplicação no solo na agricultura. Norma técnica P4231. São Paulo,
466 2006.

467

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

471

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

476

477 CORREIA, J.E.; CHRISTOFOLETTI, C.A.; ANSOAR-RODRÍGUEZ, Y.; GUEDES,
478 T.A.; FONTANETTI, C.S. Comet assay and micronucleus tests on *Oreochromis*
479 *niloticus* (Perciforme: Cichlidae) exposed to raw sugarcane vinasse and to
480 phisicochemical treated vinasse by Ph adjustment with lime (CaO). **Chemosphere**, v.
481 173, p.494-501, 2017b.

482

483 FUESS, L. T., KIYUNA, L. S. M., JÚNIOR, A. D. N. F., PERSINOTI, G. F., SQUINA,
484 F. M., GARCIA, M. L.; ZAIAT, M. Thermophilic two-phase anaerobic digestion using

- 485 an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy
486 recovery from sugarcane vinasse. **Applied energy**, 189, 480-491. 2017.
- 487
- 488 GRECCO, K. L. (2019). Efeito da composição físico-química e mineralógica de solos
489 sobre a dinâmica dos íons nitrato, fósforo e potássio (**Tese de doutorado**, Universidade
490 de São Paulo).
- 491
- 492 GONÇALVES, A.D.M.A., MIRANDA, J.H., ROSSI, P., SABADIN, J.F.G.,
493 KAMOGAWA, M.Y., Temperature effect in potassium and nitrate ions in soil
494 transport. **Eng. Agrícola** 28, 438–447. 2008
- 495
- 496 KUMAR, S.; GOPAL, K. Impact of Distillery Effluent on Physiological Consequences
497 in the Freshwater Teleost *Channa punctatus*. **Bulletin of Environmental**
498 **Contamination and Toxicology**, v.66, p.617-622, 2001.
- 499
- 500 MARINHO, J.F.U.; CORREIA, J.E.; MARCATO, A.C.C.; PEDRO-ESCHER, J.
501 FONTANETTI, C.S. Sugar cane vinasse in water bodies: impact assessed by liver
502 histopathology in tilapia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.110, p.239-245,
503 2014.
- 504
- 505 MIRANDA, J.H., DUARTE, S.N., LIBARDI, P.L., FOLEGATTI, M. V. Simulação do
506 deslocamento de potássio em colunas verticais de solo não-saturado. **Eng. Agrícola** 25,
507 677–685, 2005.
- 508 MELO, V. DE F., WYPYCH, F., 2009. Caulinita e Haloisita, **in**: MELO, V. DE F.,
509 ALLEONI, L.R.F. (Eds.), Química e Mineralogia do Solo: Parte I - Conceitos Básicos.
510 Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, pp. 428–504.
- 511
- 512 PEDROTTI, A., CHAGAS, R. M., RAMOS, V. C., PRATA, A. D. N., LUCAS, A. A.
513 T., & SANTOS, P. D.. Causas e consequências do processo de salinização dos solos.
514 Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental, 19(2), 1308-1324.
515 2015
- 516
- 517 RIVERA, R.N.C., DUARTE, S.N., MIRANDA, J.H. DE, BOTREL, T.A. Modelagem
518 da dinâmica do potássio no solo sob irrigação por gotejamento: validação do modelo.
519 **Eng. Agrícola** 26, 388–394, 2006
- 520
- 521 RIVERA, R.N.C., MIRANDA, J.H. DE, DUARTE, S.N., BOTREL, T.A. Modelo
522 aplicado à dinâmica da água e do potássio no solo sob irrigação por gotejamento:
523 análise de sensibilidade. **Eng. Agrícola** 28, 448–459, 2008.
- 524
- 525 SANTOS G.; ROSSIELLO R. O. P.; FERNANDES M.; GRADY P. C. O. Efeitos da
526 vinhaça sobre o pH do solo, a germinação e o acúmulo de potássio em milho. **Pesquisa**
527 **Agropecuária Brasileira**., Brasília, v. 16, n. 4, p.489-493, 1981.
- 528
- 529 SHARMA, V., SHARMA, K.N. Influence of Accompanying Anions on Potassium
530 Retention and Leaching in Potato Growing Alluvial Soils. **Pedosphere**, v.23, p.464–
531 471, 2013.

- 532
533 SILVA, M.A.S.; GRIEBELER, N.P.; BORGES, L.C. Uso de vinhaça e impactos nas
534 propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e**
535 **Ambiental**, v.11, n.11, p.108-114, 2007.
- 536
537 SILVA, L.P. DA, VAN LIER, Q. DE J., CORREA, M.M., MIRANDA, J.H. DE,
538 OLIVEIRA, L.A. DE, Retention and Solute Transport Properties in Disturbed and
539 Undisturbed Soil Samples. *Rev. Bras. Ciência do Solo* 40, 1–10. 2016.
- 540
541 ŠIMŮNEK, J.; VAN GENUCHTEN, M.TH.; ŠEJNA, M. The HYDRUS software
542 package for simulating the two- and three-dimensional movement of water, heat, and
543 multiple solutes in variably-saturated media; **Technical manual**, Version 2.0, PC-
544 Progress, Prague, Czech Republic, 258 p., 2011.
- 545
546 VAN GENUCHTEN, M.T., 1981. Non-equilibrium transport parameteres from
547 miscible displacement experiments(No. 119). USDA, U.S. Salinity Laboratory,
548 Riverside.
- 549 VAN GENUCHTEN, M.T., A closed-form equation for predicting the hydraulic
550 conductivity of unsaturated soils. **Soil Sci. Soc. Am. J.** 44, 892–898. 1980.
- 551 VAN GENUCHTEN, M.T., LEIJ, F.J., 1992. On estimating the hydraulic properties of
552 unsaturated soils, **in**: VAN GENUCHTEN, M.T., LEIJ, F.J., LUND, L.J. (Eds.),
553 *Proceedings of International Workshop, Indirect Methods for Estimating the Hydraulic*
554 *Properties of Unsaturated Soils*. University of California, Riverside, pp. 1–14.
- 555 VAN GENUCHTEN, M.T., ŠIMŮNEK, J., LEIJ, F.J., TORIDE, N., ŠEJNA, M.,
556 STANMOD: Model Use, Calibration, and Validation. *Trans. ASABE* 55, 1355–1368.
557 2012.
- 558 VAN GENUCHTEN, M.T., WIERENGA, P.J. Solute Dispersion Coefficients and
559 Retardation Factors, **in**: KLUTE, A. (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part I: Physical*
560 *Methods*. Soil Science Society of America, American Society of Agronomy, Madison,
561 pp. 1025–1053, 1986.
- 562 VILELA, N.M.S., THEBALDI, M.S., LEAL, B. DE P., SILVA, A. V., MARTINS, I.P.,
563 Transport parameters of potassium from different sources in soil columns. **Eng.**
564 **Agrícola** 38, 135–141. 2018.
- 565 ZENG, Q.; BROWN, P. H. Soil potassium mobility and uptake by corn under
566 differential soil moisture regimes. **Plant and Soil**, 221(2), 121-134. 2000.

Artigo 3

POTENCIAL GENOTÓXICO DO LIXIVIADO DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR APÓS PERCOLAÇÃO EM SOLOS COM DIFERENTES PERÍODOS DE FERTIRRIGAÇÃO

Correia, J.E.¹; Guedes, T.A.¹; Souza, R.B.¹; Miranda, J.H.²; Fontanetti, C.S.¹

¹ UNESP (São Paulo State University)-Rio Claro, Zip Code 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil.

² ESALQ (Luiz de Queiroz College of Agriculture – São Paulo University) – Piracicaba, SP, Brazil

*Corresponding author: Phone: +55 19 35264139; Fax: +55 19 35264136.

[Email: jorgecorreia@hotmail.com](mailto:jorgecorreia@hotmail.com)

Resumo

A fertirrigação de vinhaça nas culturas canavieiras é realizada há aproximadamente 40 anos. Muitos estudos avaliaram os efeitos agudos da vinhaça em diversos organismos. Entretanto, poucos trabalhos avaliaram a variável do tempo que esse resíduo é utilizado no campo relacionando ao seu potencial genotóxico em meio aquático quando lixiviado. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar se o tempo de fertirrigação por vinhaça influenciou na genotoxicidade do lixiviado em águas subterrâneas; para isso, uma mesma concentração de lixiviado (5%) foi utilizada em todos os tratamentos aplicada em solos com 5, 15 e 30 anos de uso de vinhaça como fertilizante. O bioensaio foi realizado em réplica. Foram utilizados o total de dez aquários, com capacidade de 40 L cada. Dois deles receberam água de poço artesiano para funcionar como controle. Foram expostos cinco peixes da espécie *Oreochromis niloticus* para cada aquário, dez indivíduos por tratamento. Após 96 horas de exposição os peixes foram anestesiados e o seu sangue foi retirado para aplicação do teste de micronúcleo e do ensaio do cometa. Os resultados mostraram ação genotóxica do lixiviado de vinhaça após passagem nos solos de 5 e 15 anos, demonstrado pela maior incidência de eritrócitos micronucleados, estatisticamente significativa quando comparados ao controle. Os micronúcleos foram formados possivelmente por ação aneugênica, uma vez que não houve ação clastogênica confirmada pelo ensaio do cometa. Tendo em vista os resultados apresentados, surge um

alerta para o impacto que a fertirrigação com vinhaça pode causar em um espaço curto de tempo para as águas subterrâneas e recursos hídricos localizados próximos as plantações.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar figura atualmente como um dos pilares da economia brasileira representando 2% do PIB (Produto Interno Bruto) (UNICA, 2019). Dado o seu papel fundamental na economia, essas monoculturas fazem uso excessivo de agrotóxicos e pesticidas para assegurar a produção, além de gerar quantidades altíssimas de resíduos que podem conter substâncias potencialmente poluidoras (RIBEIRO et al., 2007); consequentemente, o agronegócio tem se tornado um dos setores da economia que mais causam impacto ambiental.

A vinhaça, principal resíduo gerado na produção do etanol, possui alta carga orgânica e altas concentrações de potássio, nitrogênio e fósforo, apresentando grande potencial para utilização em solos agrícolas, principalmente na forma de fertirrigação (CHRISTOFOLETTI et al., 2013a). A adoção da prática de fertirrigação consiste na infiltração da vinhaça bruta no solo, por meio da irrigação das culturas de cana-de-açúcar, sendo o principal destino desde a proibição de seu descarte em água na década de 80 (CAMARGO et al., 2009). Diversos autores, como Resende (1979), 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. Essa prática é o principal destino da vinhaça há 40 anos, sendo os primeiros 25 anos sem nenhuma regulamentação ou controle.

A fertirrigação de vinhaça, por ser uma prática utilizada há tanto tempo, sempre chamou a atenção da comunidade científica para os possíveis impactos causados por ela. Diversos estudos procuraram dimensionar os efeitos tóxicos da vinhaça tanto em meio aquático quanto terrestre. Para isso, a utilização de bioindicadores e biomarcadores sensíveis foi de fundamental importância. Os efeitos agudos da vinhaça de cana-de-açúcar foram estudados por diversos autores (KUMAR; GOPAL, 2001; CHRISTOFOLETTI et al., 2013b; MARINHO et al., 2014; CORREIA et al., 2017a), sendo constatado seu potencial tóxico nos organismos empregados.

Nesse contexto, o teste do micronúcleo associados a anormalidades nucleares e o ensaio do cometa são técnicas muito efetivas no monitoramento da genotoxicidade de substâncias potencialmente tóxicas (BOLT et al., 2011). Correia et al. (2017b) avaliaram

a eficácia do tratamento da vinhaça pela correção de seu pH utilizando cal (CaO), produto relativamente barato e utilizado nas lavouras. Os autores observaram potencial genotóxico de diluições de vinhaça bruta, uma vez que essa induziu taxas significativas de micronúcleo em tilápias e mortalidade elevada; nas amostras de vinhaças tratadas, com pH neutro/alcalino, houve uma menor taxa de micronúcleos e redução da mortalidade.

Embora os efeitos agudos da vinhaça sejam bem estudados, poucos trabalhos estudaram o tempo em que esse resíduo é lançado no meio ambiente como um fator no impacto ambiental. Soto et al. (2015) simularam fluxo e transporte de íons de vinhaça aplicado a um corte bidimensional de solo de Ajapí (Rio Claro – SP). Os resultados obtidos apontaram que para os cenários hipotéticos do estudo, íons provenientes da vinhaça podem alcançar o nível freático em pouco tempo de percolação (1 a 3 anos), dependendo de sua profundidade (6m a 20m). Adicionalmente, concentrações entre 31% e 44% da concentração inicial do soluto podem ser atingidas em períodos de 10 a 30 anos.

Tendo isso em vista, o presente estudo objetivou avaliar se os anos em que a vinhaça é aplicada nos solos como fertilizante altera a toxicidade do lixiviado da vinhaça que pode atingir as águas subterrâneas. Para isso, o lixiviado de colunas contento solo que recebem vinhaça há 5, 15 e 30 anos, foi coletado para realização de bioensaio com tilápias (*Oreochromis niloticus*) e aplicação do teste do micronúcleo e ensaio do cometa para avaliação do potencial genotóxico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Vinhaça de cana-de-açúcar e obtenção do lixiviado

A vinhaça de cana-de-açúcar foi retirada *in natura* de uma usina do estado de São Paulo - Brasil, e mantida refrigerada em câmara fria a 4° C até sua utilização. O lixiviado da vinhaça foi obtido por meio de montagem de ensaios de BTC's (breakingthrough curves), nos quais colunas de 20cm foram preenchidas com os solos de 5, 15 e 30 anos de fertirrigação de vinhaça, foram saturadas com água deionizada e após isso receberam vinhaça a uma vazão constante até o momento que a concentração de vinhaça lixiviada fosse igual a vinhaça que era aplicada.

2.2. Material biológico

Peixes da espécie *O. niloticus* (Perciformes, Cichilidae), conhecida popularmente como tilápia-do-Nilo, foi utilizada neste trabalho como organismo teste. Os espécimes, oriundos de piscicultura, foram trazidos ao Departamento de Biologia, Instituto de

Biociências, UNESP, Campus de Rio Claro, São Paulo – Brasil, onde foram aclimatados em tanque, a temperatura média de 23°C, com sistemas de filtragem e aeração e alimentação controlada por um período de 15 dias.

2.3. Montagem do bioensaio

O bioensaio foi realizado em réplica e foram utilizados no total 10 aquários, com capacidade de 40 L cada. Dois deles receberam água de poço artesiano para funcionar como controle. Os outros aquários receberam água e o lixiviado da vinhaça na concentração de 5%. 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 23°C com fotoperíodo de 12 horas, totalizando 40 indivíduos, 10 por tratamento (controle, lixiviado de solo de 5, 15 e 30 anos). A água de cada tratamento foi analisada em laboratório especializado para obtenção dos parâmetros físico-químicos.

2.4. Teste do micronúcleo e 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 por meio de punção cardíaca, utilizando seringas heparinizadas. Três extensões sanguíneas por meio de esfregaço 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 definidas por Carrasco et al. (1991) como: núcleos “notched” (com invaginação); núcleos “blebbed” (com evaginação); núcleos “lobed” (com mais de uma evaginação ou morfologia indefinida); brotos (esferas ligadas ao núcleo central) e “broken-egg” (micronúcleos ligados por ponte nucleoplasmática ao núcleo). Os resultados tiveram sua normalidade testada pelo teste de Shapiro-Wilk e assim foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com $p < 0,05$.

2.5. 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). Após realização da eletroforese realizada a 39V e 300 mA, 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. Foram analisados 100 nucleóides de cada peixe para a determinação do comprimento, intensidade e momento da cauda medidos pelo software Comet Asssay IV. Os valores obtidos tiveram sua normalidade testada pelo teste de Shapiro-Wilk e assim foi implementado o teste de Kruskal-Wallis com $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Análise das águas

As águas dos aquários foram analisadas para obtenção dos parâmetros físico-químicos e os resultados foram compilados na tabela 1. Observa-se que o pH, cálcio, cobre e zinco aumentaram de acordo com o tempo de uso de fertirrigação de vinhaça. No tratamento com lixiviado do solo de 30 anos houve também a presença de concentrações de chumbo e cobalto. Todos os valores se encontram dentro dos limites permitidos pela CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) para águas subterrâneas.

Tabela 1. Valores de análise físico-química das águas do tratamento controle e dos tratamentos contendo lixiviado de vinhaça à 5%.

Parâmetro	Unidade	Controle	5 anos	15 anos	30 anos
pH	-	5,98	5,89	6,56	6,73
Nitrogênio Nítrico	mg/L	8,73	1,56	3,52	-
Nitrogênio amoniacal	mg NH ₃ -N/L	-	4,47	5,05	5,07
Nitrogênio Kjeldahl	mg NH ₃ -N/L	-	20,40	22,10	26,60
Sulfato	mg/L	-	38,00	34,00	39,60
Potássio	mg/L	2,51	44,50	32,90	42,50
Fósforo	mg/L	-	0,46	0,56	0,88
Arsênio	µg/L	-	-	-	-
Bário	µg/L	60,00	64,00	67,00	71,00
Cálcio	mg/L	3,01	15,9	15,30	17,60
Chumbo	µg/L	-	-	-	6,00
Cobalto	µg/L	-	-	-	10,00
Cobre	µg/L	8,00	11,00	10,00	13,00
Cromo	µg/L	-	-	-	-
Magnésio	µg/L	-	-	-	-
Molibdênio	µg/L	-	-	-	-
Níquel	µg/L	-	-	-	-
Sódio	mg/L	13,17	11,10	12,30	11,60
Zinco	µg/L	28,00	27,00	29,00	40,00

-: valores que não atingiram limite de quantificação.

3.2. Teste do micronúcleo associado a anormalidades nucleares

Na avaliação do potencial genotóxico, foram considerados os eritrócitos micronucleados (Figura 1A) e eritrócitos portadores de anormalidades nucleares (Figuras 1B-F). Os resultados da avaliação genotóxica estão apresentados na forma de média e desvio padrão na tabela 2. O tratamento controle obteve os menores valores para todos os parâmetros. Houve diferenças estatisticamente significativas na quantificação dos eritrócitos micronucleados dos peixes expostos ao lixiviado de vinhaça após passagem em solos de 5 e 15 anos quando comparados ao tratamento controle.

Tabela 2. Valores de média e desvio padrão de micronúcleos e anormalidades nucleares observados em eritrócitos de *O. niloticus*, expostos ao lixiviado da vinhaça após passagem em solos de 5, 15 e 30 anos.

Tratamento	MN	Notched	Blebbled	Lobed	Broken-egg	Broto
Controle	0,80±0,63	19,40±11,17	18,00±7,54	7,10±3,03	2,6±2,50	4,30±3,05
5 anos	6,20±8,66 *	31,70±12,46	23,8±8,24	9,40±4,92	3,30±2,75	7,50±4,19
15 anos	4,60±3,53 *	30,40±26,58	21,00±12,49	10,50±7,16	2,20±2,74	6,50±5,91
30 anos	1,70±1,15	21,80±17,05	17,90±4,81	7,80±3,96	1,60±0,96	3,6±1,83

MN: micronúcleo; * valores estatisticamente significativos, pelo método de Kruskal-Wallis, com $p < 0,05$.

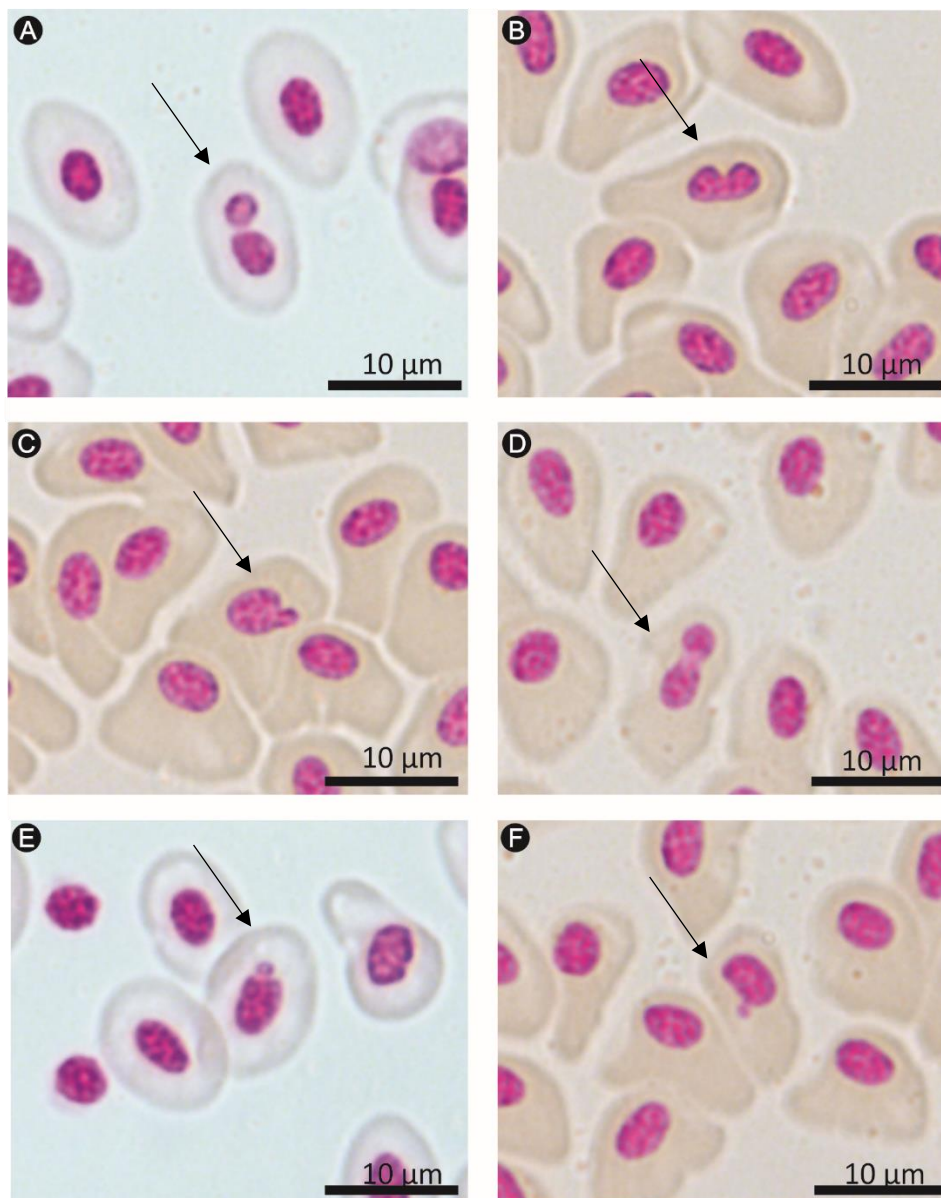


Figura 1. Eritrócitos de *O. niloticus* expostos ao lixiviado da vinhaça percolado em solos fertirrigados por 5, 15 e 30 anos. **A:** Eritrócito com micronúcleo; **B:** Eritrócito com alteração “notched”; **C:** Eritrócito com alteração “blebbed”; **D:** Eritrócito com alteração “lobed”; **E:** Eritrócito com alteração “broto”; **F:** Eritrócito com alteração “broken-egg”.

3.3. Ensaio do cometa

Os resultados obtidos estão apresentados na forma de média e desvio padrão na tabela 4. Os tratamentos com lixiviado de vinhaça dos solos 5 e 15 anos apresentaram valores de comprimento, intensidade e momento da cauda estatisticamente menores quando comparados com o controle.

Tabela 3. Média e desvio padrão dos parâmetros de medição dos nucleóides após ensaio do cometa.

Tratamento	Comprimento da cauda	Intensidade da cauda	Momento da cauda
Controle	41,07±10,15	29,72±6,31	4,67±1,72
5 anos	25,48±7,16 *	21,67±7,04 *	2,47±1,56*
15 anos	24,79±6,05 *	20,39±4,94*	1,69±0,54*
30 anos	28,17±5,74	27,54±1,37	3,05±0,49

* valores estatisticamente significativos, pelo método de Kruskal-Wallis, com $p < 0,05$.

4. DISCUSSÃO

De acordo com Sisinho e Oliveira-Filho (2013), a toxicidade pode ser definida como a propriedade inerente de uma substância ou amostra ambiental complexa de produzir um efeito adverso sobre um organismo vivo, desde níveis moleculares, celulares e bioquímicos, até sobre uma comunidade, após exposição durante um período e em determinadas doses ou concentrações. Ao se tratar de amostras complexas, como a vinhaça da cana-de-açúcar, estudos de toxicidade e genotoxicidade utilizando peixes têm se mostrado ferramentas importantes e eficientes na avaliação da qualidade ambiental dos ecossistemas aquáticos (FONTANETTI; CORREA-BUENO, 2017).

Os efeitos genotóxicos de diluições de 1, 2,5, 5 e 10% de vinhaça bruta foram testados por Correia et al. (2017) por meio do teste do micronúcleo associado a anormalidades nucleares e pelo ensaio do cometa. Os autores observaram valores significativos de eritrócitos micronucleados nas diluições de 1 e 2,5% e escore de dano pelo ensaio do cometa nas diluições de 2,5 e 5%.

Coelho et al. (2017) observaram alterações histopatológicas em fígados de tilápias expostas ao lixiviado da vinhaça a 2,5%. Os autores observaram também um aumento significativo na expressão da proteína de choque térmico HSP70 imunomarcadas no fígado.

A partir das análises físico-químicas das águas com diluição de 5% do lixiviado de vinhaça após percolação em solos com diferentes tempos de fertirrigação, foi observado que nenhum dos parâmetros analisados ultrapassou o limite recomentado para águas subterrâneas pela CETESB e apresentaram valores bem abaixo dos presentes na vinhaça utilizada nesse estudo (CORREIA et al., 2019 – artigo submetido). Nesse sentido, percebe-se que os solos atuaram como filtros, retendo os metais e outros componentes

orgânicos como o potássio, cálcio e fósforo. Coelho et al. (2017) também verificaram essa redução quando comparada a composição da vinhaça bruta e seu lixiviado.

Como o objetivo desse trabalho foi avaliar se o tempo de fertirrigação de vinhaça influenciou na genotoxicidade do lixiviado que pode chegar às águas subterrâneas, uma mesma concentração de lixiviado foi utilizado em todos os tratamentos apenas variando o solo pela qual a vinhaça percolou. Sendo assim, os resultados obtidos pelo emprego do teste do micronúcleo e o ensaio do cometa nos indicou indiretamente se ao longo dos anos a utilização da vinhaça como fertilizante alterou o potencial tóxico para o ambiente aquático e águas subterrâneas.

Por meio do teste do micronúcleo associados a anormalidades nucleares verificou-se que o lixiviado dos solos de 5 e 15 anos apresentou potencial genotóxico pela presença estatisticamente significativa de eritrócitos micronucleados, sendo maior no solo de 5 anos. Curiosamente, a análise do ensaio do cometa que indica quebras no material genético das células revelou que o lixiviado dos solos de 5 e 15 anos apresentaram valores estatisticamente significativos menores até mesmo que o controle.

Esses resultados nos indicam que a ação do lixiviado da vinhaça nos solos de 5 e 15 anos nos eritrócitos dos peixes expostos foi provavelmente aneugênica, uma vez que não foram observados danos diretos ao DNA, indicado pelo ensaio do cometa, mas elevou significativamente a taxa de micronúcleos.

Micronúcleos 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 cromossômicas, levando assim a uma perda cromossômica e, conseqüentemente, a células aneuplóides (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011). Um indicativo que corrobora essa hipótese é o tamanho dos micronúcleos encontrados nesse trabalho, que foram maiores do que os encontrados em outros trabalhos. Para se ter certeza se os micronúcleos são de origem aneugênica os eritrócitos poderiam ser marcados por hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) para evidenciar estruturas cromossômicas nos micronúcleos.

Tendo em vista os resultados apresentados, surge um alerta para o impacto que a fertirrigação com vinhaça pode causar em um espaço curto de tempo para as águas subterrâneas e recursos hídricos localizados próximos as plantações. Soto et al. (2015) simularam fluxo e transporte de íons de vinhaça aplicado a uma área hipotética próximo a corpo hídrico e com lençol freático a 6 e 20 metros de profundidade. Os autores observaram que para os cenários hipotéticos do estudo, íons provenientes da vinhaça

poderiam alcançar o nível freático em pouco tempo de percolação (1 a 3 anos), dependendo de sua profundidade (6m a 20m). Adicionalmente, concentrações entre 31% e 44% da concentração inicial do soluto podem ser atingidas em períodos de tempo de 10 a 30 anos.

Sendo assim, a fertirrigação de vinhaça tem que ser avaliada não somente por viabilidade econômica e logística, mas também em termos do impacto ambiental que essa atividade pode causar.

5. CONCLUSÃO

Os resultados apontaram ação genotóxica do lixiviado da vinhaça nos solos que a recebem como fertilizante há 5 e 15 anos, sugerindo que seus possíveis impactos aos recursos hídricos podem se dar a curto e médio prazo. Por isso a fertirrigação de vinhaça tem que ser feita com mais cautela.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2012/50197-2 e 2015/26157-9 pelo apoio financeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

CAMARGO O.A; VALADARES J.M.A.S; GERALDI R.N. Características físicas e químicas de solo que recebeu vinhaça por longo tempo. Campinas: **Instituto Agrônomo**, 1983. 30p. (Boletim Técnico, 76).

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.

CORREIA, J.E.; CHRISTOFOLETTI, C.A.; MARCATO, A.C.C.; MARINHO, J.F.U.; FONTANETTI, C.S. Histopathological analysis of tilapia gills (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) exposed to sugarcane vinasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.135, p.319-326, 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**, v. 173, p.494-501, 2017b.

COELHO, M. P. M., MOREIRA-DE-SOUSA, C., DE SOUZA, R. B., ANSOAR-RODRÍGUEZ, Y., SILVA-ZACARIN, E. C. M., & FONTANETTI, C. S. Toxicity evaluation of vinasse and biosolid samples in diplopod midgut: heat shock protein *in situ* localization. **Environmental Science and Pollution Research**, v.24(27), p. 22007-22017, 2017.

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.

FONTANETTI, C. S.; BUENO, O. C. (2017). Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica.

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.

LYRA, M. R. C. C.; ROLIM, M. M.; SILVA, J. A. A. da. Topossequência 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.

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.

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

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.

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.

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.

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.

SISINNO, C. L. S., & OLIVEIRA-FILHO, E. C. (2013). Princípios de toxicologia ambiental. **In** Princípios de toxicologia ambiental.

SOTO, M.A.A.; BASSO, J.B.; KIANG, C.H.; van GENUCHTEN, M.T. Simulação de fluxo e transporte de íons de vinhaça através de vertente da formação rio claro. **Águas Subterrâneas**, v.29, n.2, p. 162-174, 2015.

UNICA – União da Indústria da cana-de-açúcar do estado de São Paulo. Histórico de Produção e Moagem. UNICA, 2019. Disponível em:
http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=31&tipoHistorico=2&acao=visualizar&idTabela=1802&produto=etanol_total&safrIni=1980%2F1981&safrFim=2015%2F2016&estado=RS%2CSC%2CPR%2CSP%2CRJ%2CMG%2CES%2CMS%2CMT%2CGO%2CDF%2CBA%2CSE%2CAL%2CPE%2CPB%2CRN%2CCE%2CPI%2CMA%2CTO%2CPA%2CAP%2CRO%2CAM%2CAC%2CRR Acesso em: 07/08/2019.

Artigo 4.**HISTOPATOLOGIA E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM FÍGADO DE *Oreochromis niloticus* EXPOSTOS AO
LIXIVIADO DE VINHAÇA**

Correia, J.E. ¹; Guedes, T.A. ¹; Souza, R.B. ¹; Miranda, J.H. ²; Fontanetti, C.S. ¹

¹ UNESP (São Paulo State University)-Rio Claro, Zip Code 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil.

² ESALQ (Luiz de Queiroz College of Agriculture – São Paulo University) – Piracicaba, SP, Brazil

*Corresponding author: Phone: +55 19 35264139; Fax: +55 19 35264136.

[Email: jorgecorreia@hotmail.com](mailto:jorgecorreia@hotmail.com)

Resumo

A vinhaça de cana-de-açúcar é o principal resíduo da produção de etanol. Gerada em proporção quinze vezes maior que o etanol, esse resíduo é utilizado como fertilizante nas culturas de cana-de-açúcar há mais de 40 anos. Considerando o potencial tóxico que a vinhaça apresenta, comprovado por diversas publicações, esse estudo objetivou avaliar se os anos em que a vinhaça é utilizada como fertilizante pode influenciar na toxicidade do seu lixiviado que pode atingir as águas subterrâneas ou recursos hídricos próximos as áreas de cultivo. Para isso, peixes da espécie *Oreochromis niloticus* foram expostos por 96 horas a diluição de 5% do lixiviado da vinhaça que percolou em colunas contendo solos de culturas canavieiras fertirrigadas por 5, 15 e 30 anos e um tratamento controle que recebeu água de poço artesiano. O bioensaio foi realizado em réplica, cada aquário contendo cinco peixes. Após exposição, os peixes foram anestesiados e tiveram porções do fígado coletadas, fixadas e processadas para análise histológica e histoquímica e análise de proteínas de estresse oxidativo. Os peixes expostos ao lixiviado do solo de 15 anos apresentaram índices de alterações estatisticamente significativos para perda de limite celular e aumento de vacúolos citoplasmáticos quando comparados ao controle. Todos os tratamentos apresentaram aumento do volume dos núcleos dos hepatócitos, sendo esta alteração estatisticamente significativa em relação ao controle. Não houve diferença na marcação de polissacarídeos neutros evidenciados pela técnica de PAS.

Mesmo não sendo estatisticamente significativo observou-se um padrão de atividade para todas as enzimas testadas nesse estudo. A atividade das enzimas foi maior no tratamento com lixiviado de vinhaça do solo de 15 anos e os menores valores no tratamento do lixiviado proveniente do solo de 30 anos. Os resultados levantam o alerta para que a vinhaça seja usada com mais cautela levando em consideração que seu uso no campo irá completar 40 anos e já podemos encontrar efeitos tóxicos em 15 anos.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil, atualmente, é o segundo maior produtor de etanol no mundo, atrás apenas dos Estados Unidos. A matriz da produção de etanol no Brasil é a cana-de-açúcar, em regime de monocultura com área plantada de 10 milhões de hectares; mais da metade dessa área está concentrada no estado de São Paulo (UNICA, 2019). Devido a sua importância econômica para o país, a indústria sucroalcooleira é uma das que mais causam impactos ambientais. Os impactos negativos da cana-de-açúcar, diz respeito, principalmente a um subproduto do etanol: a vinhaça.

A vinhaça é o resíduo líquido da destilação do mosto da cana-de-açúcar em etanol, possui baixo pH, alta concentração de potássio, cálcio, fósforo e alguns metais (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Devido a essas características e sua alta produção, chegando ser até 15 vezes maior que o próprio etanol, a vinhaça é utilizada como fertilizante da própria cultura da cana-de-açúcar há 40 anos.

De acordo com Camargo et al. (2009), os primeiros estudos para a aplicação da vinhaça nos solos, no Brasil, datam da época de 1950 e foram realizados pela Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz (ESALQ). Seu uso como fertilizante, por meio da fertirrigação, se tornou frequente entre as usinas a partir da década de 80. 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). O uso da vinhaça por meio da fertirrigação constitui uma tecnologia que propõe usar de forma racional os recursos naturais, impedindo que a vinhaça seja lançada nos rios, possibilitando a fertilização dos solos agricultáveis (GIANCHINI; FERRAZ, 2009). No entanto, de acordo com vários autores, o despejo direto da vinhaça no solo pode causar: sua salinização, a lixiviação dos metais presentes no solo para às águas subterrâneas, alterações na qualidade do solo devido ao desbalanceamento dos nutrientes, redução da

alcalinidade, perda das culturas e aumento da fitotoxicidade (AGRAWAL; PANDEY, 1994).

Neste sentido, os peixes têm sido amplamente utilizados como modelos experimentais, tanto em avaliações de saúde dos ecossistemas aquáticos como em estudos de patologia toxicológica (LAW, 2003; LEDY et al., 2003; SIMONATO et al., 2008). A tilápia tem sido considerada um bom modelo para estudos toxicológicos por diversos motivos; entre eles, podemos enumerar suas altas taxas de crescimento, fácil adaptação às dietas comerciais, resistência a doenças e lesões consequentes de manejo, boa reprodução em cativeiro e tolerância a várias condições ambientais (FIGUEIREDO FERNANDES et al., 2006).

As alterações histológicas são ferramentas úteis para avaliações das relações entre danos em peixes e poluição ambiental, atuando como bons marcadores de estresses ambientais (DYK et al., 2012; MAHROUS et al., 2015). Para as análises destas alterações histológicas em diferentes órgãos de peixes pode ser utilizado um protocolo semi-quantitativo; a aplicação deste protocolo oferece informações importantes sobre a funcionalidade do tecido, tendo em conta os diferentes tipos de alterações, frequência e o fator de importância delas (BERNET et al., 1999; MARINHO et al., 2014).

O fígado é um órgão chave quando se considera a ação de poluentes sobre os peixes, pois é muito sensível a contaminantes ambientais. Esse fato deve-se a sua alta capacidade de acumular tais substâncias, muitas vezes mais do que no próprio ambiente ou em outros órgãos (HEALTH, 1995). Assim, a exposição a agentes tóxicos pode causar alterações histológicas no fígado, que por este motivo podem ser utilizados como biomarcador para indicar contato prévio com tais substâncias. Embora o fígado tenha a capacidade de degradar compostos tóxicos, seus mecanismos de regulação podem ser sobrecarregados por concentrações elevadas destes produtos, resultando, conseqüentemente, em danos na estrutura do órgão (HINTON; LAUREN, 1990; van DICK, 2003).

Danos em níveis moleculares também podem ocorrer devido a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Como nas células a produção de EROs é constante devido as reações metabólicas, a própria célula tem mecanismos para se proteger de possíveis danos. Este sistema mantém o equilíbrio redox celular pela eliminação do acúmulo e pela supressão da ação das EROs no interior das células (BONT et al., 2004). O aumento da produção de EROs está relacionado com o aumento da atividade dos antioxidantes, que protege o organismo contra os danos oxidativos (WINSTON; GIULIO,

1991), sendo assim, a quantificação dessas enzimas que combatem o estresse oxidativo tornam-se excelentes biomarcadores.

Levando em consideração que a vinhaça vindo sendo utilizada nos campos há 40 anos e que sua toxicidade em diversos organismos foi comprovada por diversos autores (KUMAR; GOPAL, 2001; MARINHO et al., 2014; CORREIA et al., 2017a e b; COELHO et al., 2017), foi objetivo desse estudo avaliar a toxicidade do lixiviado da vinhaça após percolação em solos que recebem vinhaça há 5, 15 e 30 anos .

2. MATERIAS E MÉTODOS

2.1. Vinhaça de cana-de-açúcar e obtenção do lixiviado

A vinhaça de cana-de-açúcar foi retirada *in natura* de uma usina do estado de São Paulo - Brasil e mantida refrigerada em câmara fria a 4°C até sua utilização. O lixiviado da vinhaça foi obtido por meio de montagem de ensaios de BTC's (breakingthrough curves), nos quais colunas de 20cm foram preenchidas com os solos de 5, 15 e 30 anos de fertirrigação por vinhaça, foram saturadas com água deionizada e após isso receberam vinhaça a uma vazão constante até o momento que a concentração de vinhaça lixiviada fosse igual a vinhaça que era aplicada.

2.2. Material biológico

Peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichilidae), conhecida popularmente como tilápia-do-Nilo, foi utilizada neste trabalho como organismo teste. Os espécimes, oriundos de piscicultura, foram trazidos ao Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Rio Claro, São Paulo – Brasil, onde foram aclimatados em tanque, a temperatura média de 23°C, com sistemas de filtragem e aeração e alimentação controlada por um período de 15 dias.

2.3. Montagem do bioensaio

O bioensaio foi realizado em réplica e foram utilizados no total 10 aquários, com capacidade de 40 L cada. Dois deles receberam água de poço artesiano para funcionar como controle. Os outros aquários receberam água e o lixiviado da vinhaça na concentração de 5%. 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 23°C com fotoperíodo de 12 horas, totalizando 40 indivíduos, 10 por tratamento (controle, lixiviado de solo de 5, 15 e 30 anos). A água de

cada tratamento foi analisada em laboratório especializado para obtenção dos parâmetros físico-químicos. Decorrido o tempo do bioensaio, os peixes foram anestesiados e tiveram porções do fígado coletados e fixados em Bouin. Após fixação, as amostras de fígados foram mantidas em tampão fosfato (pH=7,4) e mantidas sobre refrigeração.

2.4. Histologia e histoquímica de fígado de *O. niloticus*

Para aplicação das técnicas de histologia e histoquímica, os fígados dos peixes foram desidratados em soluções de etanol a 70, 80, 90 e 95% e embebidos em historesina, por 24 horas, sob refrigeração. Posteriormente, os materiais foram transferidos para moldes plásticos contendo resina de inclusão. Após a polimerização, secções de 6 µm de espessura foram obtidas com auxílio de micrótomo. Para análise histológica, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE). Testes histoquímicos foram aplicados para detecção de polissacarídeos neutros – técnica do ácido periódico Schiff - PAS (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

As análises seguiram o protocolo de semi-quantificações de alterações proposta por Christofolletti et al. (2016) e adaptado para o fígado de peixes por Marinho et al. (2014). Nesse protocolo, cada alteração possui um fator de importância, que varia de 1 a 3. Esse fator é multiplicado pela extensão dessa alteração no órgão analisado, que varia de 1 (pouco presente) a 6 (amplamente presente). Esses fatores multiplicados resultam no índice de alteração.

2.5. Estresse oxidativo

O tecido hepático foi primeiramente pesado e, então, homogeneizado em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas em 1000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi congelado em freezer -80°C para a realização das técnicas. As técnicas foram aplicadas individualmente nos animais de cada tratamento, bem como os testes estatísticos e, então, a média e desvio padrão foram obtidos para apresentação dos dados.

2.5.1. Análise de proteínas totais

Para a determinação de proteínas totais, uma curva de calibração foi pré-estabelecida a partir de diferentes concentrações de albumina 22%. A dosagem de proteínas foi realizada por meio do método de Bradford (1976). As absorbâncias, obtidas

à 595 nm, foram inseridas na equação da reta, o que permitiu a determinação da concentração de proteína para o fígado dos animais expostos aos tratamentos.

2.5.2. Peroxidação lipídica TBARS

A quantificação da peroxidação lipídica foi realizada por meio do *TBARS Assay Kit* (Cayman Chemical), respeitando-se as orientações do fabricante. O malondialdeído (MDA) foi utilizado como indicador de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica foi determinada pela medida da quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) formadas durante a decomposição de hidroperóxidos lipídicos, a maioria formada a partir de MDA. A absorbância foi mensurada colorimetricamente à 532 nm usando um leitor de microplacas. O conteúdo de MDA foi calculado para cada amostra a partir de uma curva padrão.

2.5.3. Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pelo método de autooxidação do pirogalol descrito por Marklund e Marklund (1974). O ensaio foi realizado com 10 µL de proteínas, 2 mL de tampão TRIS- HCl 25 mM com EDTA 1 mM pH 8,5 e 200 µl de pirogalol 15 mM e incubados a 24°C por 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 200 µl de HCl 1N e medida em 440 nm. A atividade foi expressa em unidades de absorbância/minuto.

2.5.4. Glutathione S transferase (GST)

A atividade da GST foi avaliada seguindo o método de Habig et al. (1974). A mistura analisada constituía de 2,7 mL de tampão fosfato, 400 µL de GSH 0,1 mM e 400 µL de CDNB 0,1 mM (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) como substrato e 1 mg de proteína. O aumento na absorbância foi medido em 340 nm por 5 minutos com 1 minuto de intervalo. O resultado foi expresso como absorbância/minuto.

3. RESULTADOS

3.1. Análise físico-química das diluições do lixiviado da vinhaça

Os parâmetros analisados foram compilados na tabela 1. Todos os parâmetros obtiveram valores dentro do permitido pela Companhia Ambiental do Estado de São

Paulo (CETESB). Como o esperado, o controle, constituído de água de poço artesiano, obteve os menores valores.

Tabela 1. Valores de análise físico-química das águas do tratamento controle e dos tratamentos contendo lixiviado de vinhaça à 5%.

Parâmetro	Unidade	Controle	5 anos	15 anos	30 anos
pH	-	5,98	5,89	6,56	6,73
Nitrogênio Nítrico	mg/L	8,73	1,56	3,52	-
Nitrogênio amoniacal	mg NH ₃ -N/L	-	4,47	5,05	5,07
Nitrogênio Kjeldahl	mg NH ₃ -N/L	-	20,40	22,10	26,60
Sulfato	mg/L	-	38,00	34,00	39,60
Potássio	mg/L	2,51	44,50	32,90	42,50
Fósforo	mg/L	-	0,46	0,56	0,88
Arsênio	µg/L	-	-	-	-
Bário	µg/L	60,00	64,00	67,00	71,00
Cálcio	mg/L	3,01	15,9	15,30	17,60
Chumbo	µg/L	-	-	-	6,00
Cobalto	µg/L	-	-	-	10,00
Cobre	µg/L	8,00	11,00	10,00	13,00
Cromo	µg/L	-	-	-	-
Magnésio	µg/L	-	-	-	-
Molibdênio	µg/L	-	-	-	-
Níquel	µg/L	-	-	-	-
Sódio	mg/L	13,17	11,10	12,30	11,60
Zinco	µg/L	28,00	27,00	29,00	40,00

-: valores que não atingiram o limite de quantificação.

3.2. Histologia e histoquímica de fígado de *O. niloticus*

Não houve mortalidade de nenhum indivíduo ao longo do bioensaio. O grupo controle apresentou arquitetura típica do tecido hepático de peixes teleósteos (Fig. 1A, B), com ausência de anormalidades patológicas. Os hepatócitos são arranjados em fileiras e entremeados por sinusóides, nos quais é possível observar eritrócitos. O citoplasma dos hepatócitos aparece homogeneamente corado (Fig. 1A) ou por vezes menos corado, podendo apresentar alguns vacúolos.

Os fígados dos peixes expostos ao lixiviado de vinhaça nos solos de 15 anos obtiveram valores estatisticamente significativos para perda de limite celular (Figura 1 B) e para aumento de vacúolos intracelulares (Figura 1C). Todos os tratamentos apresentaram aumento estatisticamente significativo de núcleos de volume aumentado ao longo do tecido (1D). Observou-se também degeneração hidrópica (Figura 1D) e presença de núcleos picnóticos (Figura 1D) em alguns pontos, mas com valores estatisticamente não significativos.

Em relação ao acúmulo de polissacarídeos nos hepatócitos evidenciado pela técnica de PAS, não foi observado diferenças em relação aos tratamentos.

Tabela 2. Média e desvio padrão dos índices de alteração histopatológicas de fígados de *O. niloticus* expostos a 5% de lixiviado de vinhaça percolado em solos de diferentes tempos de fertirrigação.

Tratamentos	Degeneração hidrópica (2)	Núcleo Picnótico (3)	Perda de limite celular (3)	Presença de Vacúolos (1)	Núcleos de volume aumentados (2)
Controle	6,30±2,49	0,75±1,27	1,35±1,31	2,40±1,34	0
5 anos	5,80±1,75	1,50±1,41	1,20±1,97	3,3±1,05	3,9±2,33*
15 anos	7,20±1,68	2,10±2,46	5,70±2,62*	4,00±1,05*	3,60±2,45*
30 anos	5,60±1,83	1,80±2,09	3,90±3,75	2,60±0,96	2,40±2,27*

() : fator de importância; * valores estatisticamente significativos quando comparados ao controle pelo método de ANOVA com pos-hoc de Dunnett com $p < 0,05$.

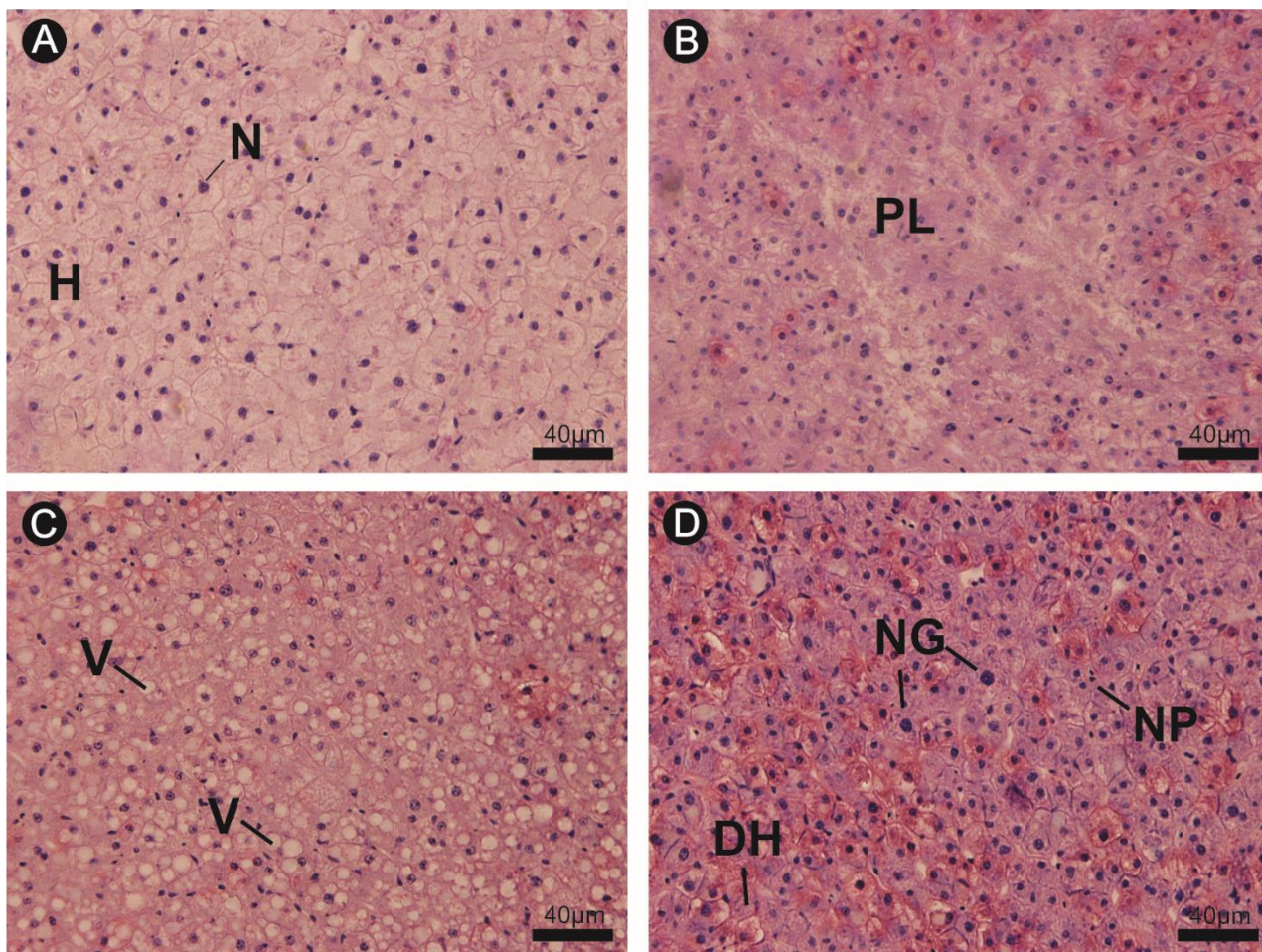


Figura 1. Cortes histológicas de fígado de *O. niloticus* expostos a lixiviados de vinhaça percolado em solos com diferentes tempos e fertirrigação. **A:** controle; **B-D:** tratamentos; **h:** hepatócito; **n:** núcleo; **pl:** perde de limite celular; **v:** vacúolo; **ng:** núcleos grandes; **dh:** degeneração hidrópica. ; **np:** núcleo picnótico.

3.3. Quantificação de proteínas totais.

A curva de calibração do reagente (Figura 2) foi realizada para se estabelecer uma relação entre a quantidade de proteína e a cor do reagente. Com base na absorbância pedida foi possível estabelecer a quantidade estimada de proteína para cada amostra. A equação de reta foi $y=0,5121x - 0,0073$ com $R^2=0,995$. O fator de correção obtido foi de 1,953.

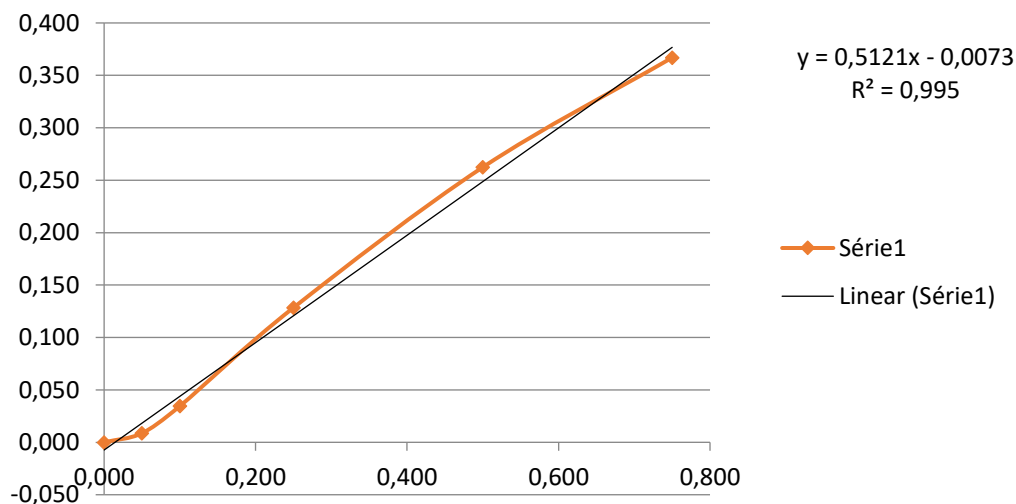


Figura 2. Curva de calibração do reagente. Eixo x: $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína; Eixo y: absorbância.

3.4. Peroxidação lipídica TBARS

A curva de calibração do reagente (Figura 3) foi realizada para obtenção do fator de correção. A equação da reta foi $y = 0,0008x + 0,0032$ com $R^2 = 0,9976$. Os valores de peroxidação lipídica estão apresentados em forma de gráfico (Figura 4). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, porém os maiores valores foram obtidos no lixiviado da vinhaça do solo de 5 anos e os menores para o de 30 anos.

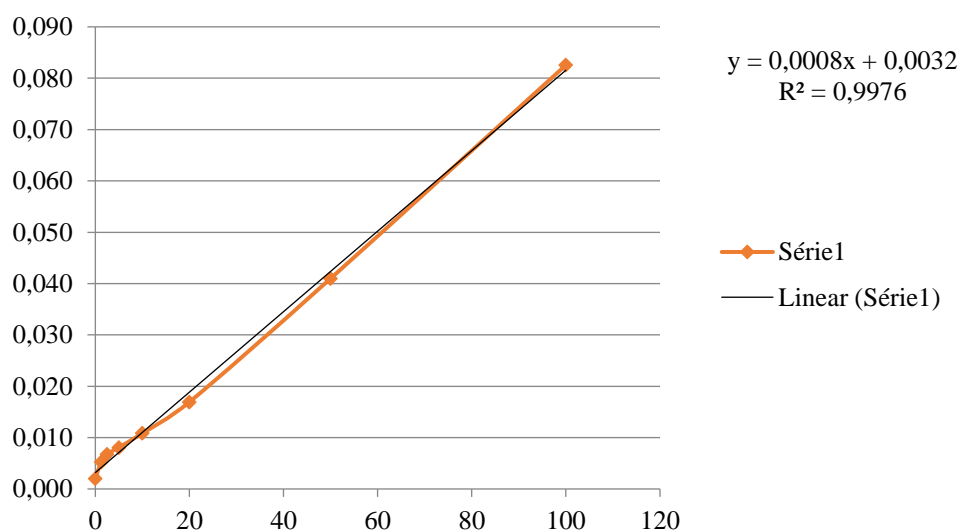


Figura 3. Curva de calibração do reagente. Eixo x: μM de MDA; Eixo y: absorbância.

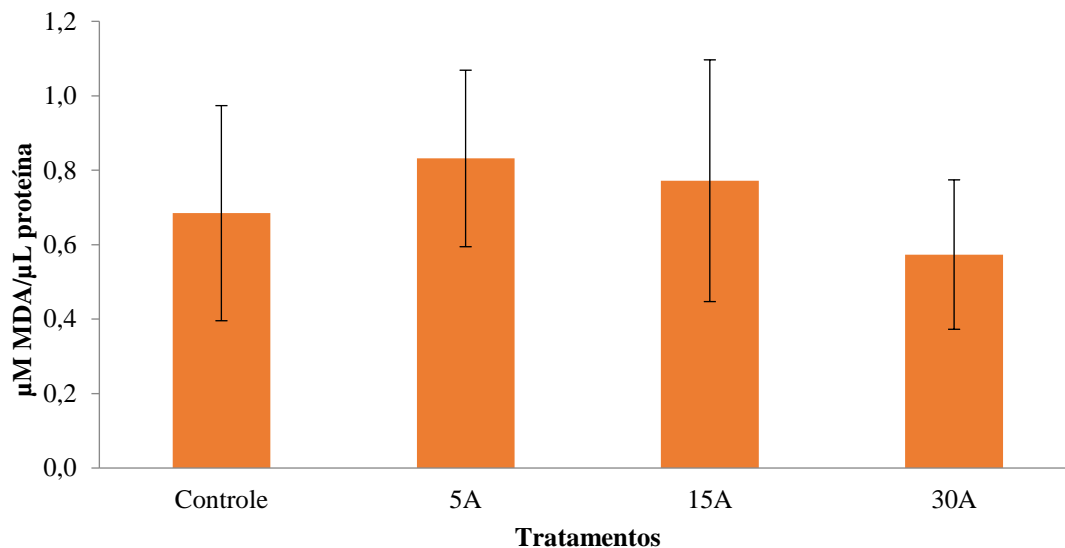


Figura 4. Valores médio e desvio padrão de $\mu\text{M MDA}/\mu\text{L}$ de proteína. **5A:** tratamento com lixiviado do solo de 5 anos; **15A:** tratamento com lixiviado do solo de 15 anos; **30A:** tratamento com lixiviado do solo de 30 anos.

3.5. Superóxido Dismutase (SOD)

Os resultados são apresentados pelos valores obtidos depois da adição de HCl menos os valores de leitura logo após a adição de pirogallol (Figura 5). A menor variação de atividade da SOD ocorreu no tratamento do lixiviado de vinhaça do solo de 30 anos. A maior variação foi observada no de 15 anos.

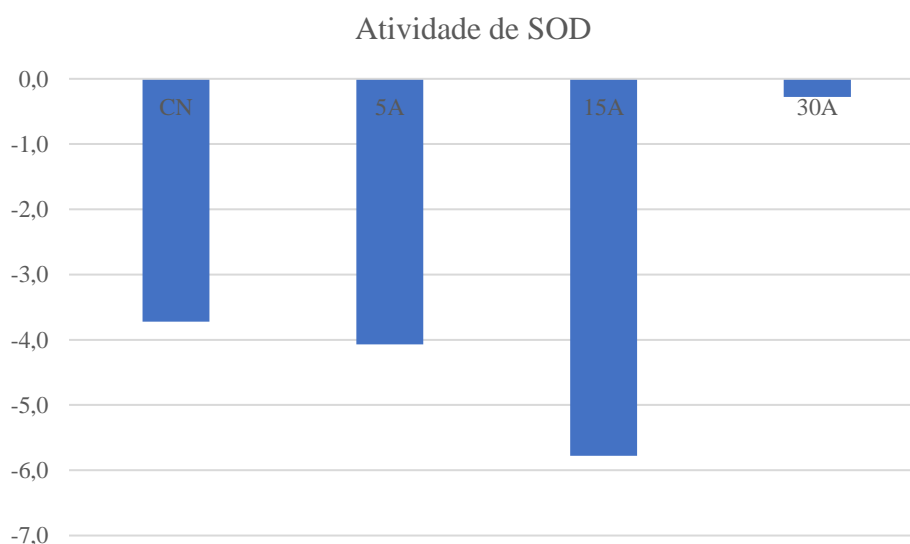


Figura 5. Diferença das médias representativas dos valores da SOD depois menos antes da adição de HCl. **Eixo x:** absorbância/ug proteína. **5A:** tratamento com lixiviado do solo de 5 anos; **15A:** tratamento com lixiviado do solo de 15 anos; **30A:** tratamento com lixiviado do solo de 30 anos.

3.6. Glutathione S transferase

Os resultados são apresentados pela média de atividade da GST no momento da sua realização e da cinética dessa enzima (Figura 6). Não houve diferenças significativas entre os tratamentos, porém observou-se assim a variação da atividade ao longo do tempo da GST foi muito menor no tratamento com lixiviado de vinhaça do solo de 30 anos, como observado na SOD.

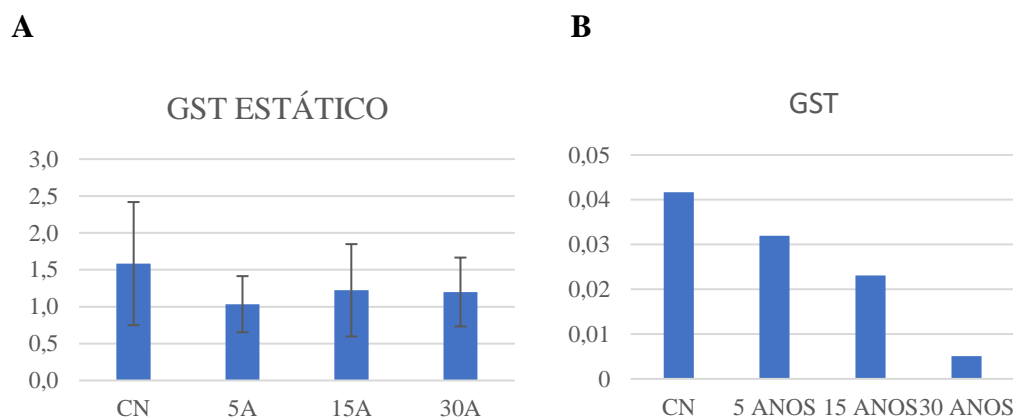


Figura 6. Média da atividade da GST. **A:** leitura realizada ao final da reação; **B:** variação cinética da atividade da enzima do momento inicial até a finalização da reação. **Eixo x:** absorbância/ug proteína. **CN:** controle; **5A:** tratamento com lixiviado do solo de 5 anos; **15A:** tratamento com lixiviado do solo de 15 anos; **30A:** tratamento com lixiviado do solo de 30 anos.

4. DISCUSSÃO

Há 40 anos a vinhaça é utilizada como fertilizante da cultura de cana-de-açúcar e cada vez mais o setor sucroenergético vem crescendo e se expandindo. Por conta disso, estudos que consigam dimensionar os impactos causados pela vinhaça ao longo desses anos são de fundamental importância para a prevenção de impactos futuros.

Tendo isso em vista, esse estudo objetivou avaliar se o tempo de fertirrigação de vinhaça e uso desses solos afetava o potencial tóxico do lixiviado da vinhaça quando utilizada como fertilizantes.

Os resultados das análises físico-químicas das águas contendo 5% do lixiviado de cada solo mostraram que não houve muita diferença na composição entre os três tratamentos. Devido a maior quantidade de matéria orgânica era de se esperar uma maior retenção nos solos de 30 e 15 anos.

Mesmo não havendo tantas diferenças na composição das águas a que os peixes foram expostos, ao se analisar os fígados desses animais observou-se diferenças significativas. Na análise histopatológica observou-se que o índice de alteração para perda

de limite celular e para aumento de vacúolos obteve valores estatisticamente significativos em relação ao controle. Embora não tenha sido evidenciado por outras técnicas de marcação histoquímica, infere-se que o conteúdo desses vacúolos seja de origem lipoprotéica, uma vez que não houve marcação de seu conteúdo na coloração convencional (H-E), nem marcação de polissacarídeos neutros pelo PAS.

Akaishi et al. (2004), ao estudar fígados de peixes contaminados com petróleo, também puderam observar perda de limites celulares nos hepatócitos. Segundo os autores, essa característica sugere alterações drásticas na distribuição de organelas, o que pode trazer consequências graves para o funcionamento do órgão.

Coelho et al. (2017), além de observar perda de limite celular observou também aumento nos vacúolos e aumento do volume dos núcleos dos hepatócitos, assim como observado nesse estudo, cujo índice de alteração foi significativo para todos os tratamentos. Isso pode ser explicado pelo fato de que o fígado dos teleósteos é um dos órgãos mais sensíveis do animal. A exposição a diferentes tipos de poluentes ambientais pode alterar sua morfologia, bioquímica e fisiologia (AHMED et al., 2013; ALESCI et al., 2014).

Mesmo não sendo estatisticamente significativo observou-se um padrão de atividade para todas as enzimas presentes nesse estudo. A atividade das enzimas era maior no tratamento com lixiviado de vinhaça do solo de 15 anos e os menores valores eram apresentados no tratamento do lixiviado proveniente do solo de 30 anos. Muitos estudos relacionaram o dano hepático ao aumento de biomarcadores bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo (OLIVEIRA et al. 2015; VALAVANIDIS et al., 2006; ARFATA et al., 2014). O mesmo foi observado nesse estudo, uma vez que os danos significativos também ocorreram nos tratamentos com o lixiviado do solo de 15 anos.

A peroxidação lipídica é considerada o mecanismo que mais causa danos celulares, pois gera grandes quantidades de EROs, com a interferência de fontes endógenas e/ou exógenas, e provocam vários efeitos biológicos (SHAD; IQBAL, 2010). O fígado, músculo e tecido adiposo são os principais órgãos de deposição de lipídios e seu acúmulo é resultado do equilíbrio entre lipogênese e oxidação β , com muitas enzimas envolvidos nesses processos metabólicos (CHEN et al., 2015). A síntese aumentada e absorção de ácidos graxos traz consigo aumento da acumulação de lipídios neste órgão, que pode ser visualizado em forma de vacúolos na análise histológica; observamos o aumento da presença de vacúolos no tecido hepático, porém não foi aplicada nenhuma

técnica para marcação desses elementos. O aumento da atividade de peroxidação lipídica no tratamento de lixiviado do solo de 15 anos pode ser em decorrência disso.

Diferentes compostos, incluindo xenobióticos tóxicos e produtos reativos de processos intracelulares, como peroxidação de lipídios, atuam como substratos para a GST (TORRES et al., 2004). A atividade da GST nesse estudo pode ser em função da atividade da peroxidação lipídica que por sua vez é consequência do acúmulo de lipídios.

5. CONCLUSÃO

Em vista dos resultados obtidos nesse estudo, podemos concluir que o tempo de uso da vinhaça influencia na toxicidade e no impacto ambiental. Os resultados levantam o alerta para que a vinhaça seja usada com mais cautela levando em consideração que seu uso no campo irá completar 40 anos e já podemos encontrar efeitos tóxicos em 15 anos.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2012/50197-2 e 2015/26157-9 pelo apoio financeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, C.S.; PANDEY, G.S. Soil pollution by spent wash discharge: depletion of manganese (II) and impairment of its oxidation. **Journal of Environmental Biology**, v.15, p.49–53. 1994.

AKAISHI, F.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; JAKOBI, S.C.G.; EIRAS-STOFELLA, D.R.; ST-JEAN, S.D.; COURTENAY, S.C. Morphological and neurotoxicological findings in tropical fresh water fish (*Astyanax* sp.) after water borne and acute exposure to Water Soluble Fraction (WSF) of crude oil. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v.46, p.244-253. 2004.

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.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72(1-2), 248-254. 1976.

CAMARGO O.A; VALADARES J.M.A.S; GERALDI R.N. Características físicas e químicas de solo que recebeu vinhaça por longo tempo. Campinas: **Instituto Agrônomo**, 1983. 30p. (Boletim Técnico, 76).

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.

CHEN, B., LU, Y., CHEN, Y., CHENG, J. The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. *J Endocrinol*, 225(3), R83-R99. 2015.

COELHO, M. P. M., MOREIRA-DE-SOUSA, C., DE SOUZA, R. B., ANSOAR-RODRÍGUEZ, Y., SILVA-ZACARIN, E. C. M., & FONTANETTI, C. S. Toxicity evaluation of vinasse and biosolid samples in diplopod midgut: heat shock protein *in situ* localization. *Environmental Science and Pollution Research*, v.24(27), p. 22007-22017, 2017.

CORREIA, J.E.; CHRISTOFOLETTI, C.A.; MARCATO, A.C.C.; MARINHO, J.F.U.; FONTANETTI, C.S. Histopathological analysis of tilapia gills (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) exposed to sugarcane vinasse. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.135, p.319-326, 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 phisicochemical treated vinasse by Ph adjustment with lime (CaO). *Chemosphere*, v. 173, p.494-501, 2017b.

DYK, J.C.V.; COCHRANE, M.J.; WAGENAAR, G.M. Liver histopathology of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. *Chemosphere*, v. 87, p.301-311, 2012.

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.

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

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.

GIANCHINI, C.F.; FERRAZ, M.V. Benefícios da Utilização de vinhaça em Terras de Plantio de Cana-de-açúcar - Revisão de Literatura. São Paulo: **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**. Ano VII, n.15. 2009.

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

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.

MAHROUS, K.F.; HASSAN, A.M.; RADWAN, H.A.; MAHMOUD, M.A. Inhibition of cadmium-induced genotoxicity and histopathological Changes in Nile tilapia fish by Egyptian and Tunisian montmorillonite clay. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 119, p. 140-147, 2015.

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.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*, 47(3), 469-474. 1974.

LAW, J.M. Issues related to the use of fish models in toxicology pathology: session introduction. **Toxicol. Pathol.**, v.31, p. 49-52. 2003.

LEDY, K., GIAMBÉRINI, L., PIHAN, J.C. Mucous cell responses in gill and skin of brown trout *Salmo trutta fario* in acidic, aluminium containing stream water. **Dis Aquat Org**, v.56, p.235–240. 2003.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R.. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 69, p.112-120, 2008.

TORRES, M. C. L., SOARES, N. D. F. F., MAIA, J. F. Parâmetros cinéticos da glutationa S-transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Ciênc Tecnol Aliment**. (2004).

UNICA – União da Indústria da cana-de-açúcar do estado de São Paulo. Histórico de Produção e Moagem. UNICA, 2019. Disponível em: http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=31&tipoHistorico=2&acao=visualizar&idTabela=1802&produto=etanol_total&safrIni=1980%2F1981&safrFim=2015%2F2016&estado=RS%2CSC%2CPR%2CSP%2CRJ%2CMG%2CES%2CMS%2CMT%2CGO%2CDF%2CBA%2CSE%2CAL%2CPE%2CPB%2CRN%2CCE%2CPI%2CMA%2CTO%2CPA%2CAP%2CRO%2CAM%2CAC%2CRR Acesso em: 07/08/2019.

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.

VALAVANIDIS, A., VLAHOGIANNI, T., DASSENAKIS, M., & SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and environmental safety**, 64(2), 178-189. 2006.

WINSTON, G W.; DI GIULIO, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquatic toxicology**, , 19.2: 137-161. 1991.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A preocupação da comunidade científica com o potencial tóxico da vinhaça e seus impactos na biota vem crescendo ao longo dos anos. O crescimento vertiginoso da indústria sucroalcooleira nas últimas décadas, atreladas a lentidão do nosso sistema legistalivo ambiental em acompanhar esse crescimento, gerou um cenário em que, um resíduo gerado numa proporção 15 vezes maior que seu produto, passou 26 anos sendo utilizado sem que houvesse nenhuma regulamentação sobre seu uso no campo. Atualmente há muitos trabalhos mostrando os efeitos agudos da vinhaça em diversos organismos, porém ainda não se tinha a dimensão dos impactos ao longo dos anos de uso excessivo da vinhaça como fertilizante. Tendo esse cenário em vista, esse trabalho objetivou avaliar como o tempo de uso da vinhaça como fertilizante atua no potencial tóxico que esse resíduo possa ter tanto no meio terrestre como aquático.

No meio terrestre utilizando o diplópodo *R. padbergi* como bioindicador, observou-se elevada toxicidade nos solos com utilização de vinhaça há 30, 15 anos e até mesmo no solo de apenas 5 anos e em todas os níveis de complexidade como mortalidade, alterações teciduais e moleculares.

Houve também o interesse de estudar a mobilidade do principal íon presente na vinhaça, o potássio, para entender sua movimentação no solo e como eles se comportavam frente aplicação de vinhaça. Observou-se que nos solos de 30 anos houve um aumento significativo no fator de retardamento e no coeficiente de dispersão, nos indicando que após 30 anos do uso de vinhaça no solo fez com que o mesmo retesse mais esse íon em comparação aos solos de 5 e 15 anos.

Essa maior retenção pode ter refletido nos resultados com o lixiviado da vinhaça que percolou nesses solos, uma vez que o lixiviado do solo de 30 anos obteve os menores valores na quantificação dos biomarcadores no ensaio de toxicidade aquática.

Analisando os resultados de forma holística, podemos inferir que ao longo dos anos de aplicação de vinhaça, o potencial tóxico no solo aumenta a medida dos anos de aplicação de vinhaça. Inversamente, a toxicidade para as águas subterrâneas diminuiu no lixiviado do solo de 30 anos, uma vez que a tendência é que cada vez mais, parte dos componentes da vinhaça, possam ficar mais retidos no solo devido ao acúmulo de matéria orgânica e de íons com cargas positivas como potássio e cálcio. Esse comportamento também levanta o alerta para a salinização do solo com o tempo, podendo a longo prazo, afetar a própria produção de cana-de-açúcar.

Estudos com esse viés temporal e histórico são de extrema importância para entender os efeitos a longo prazo de uma mistura tão complexa como a vinhaça. Como perspectiva a curto prazo, é pretendido avaliar o comportamento do nitrato nesses solos, uma vez que esse possui cargas negativas e tende a ser repelido nos colóides do solo.

7. Referências Bibliográficas

ALFARO, M.A., ALFARO, M.A., JARVIS, S.C., GREGORY, P.J. Factors affecting potassium leaching in different soils. **Soil Use Management**, v.20, p.182–189, 2004a.

ALFARO, MARTA A., GREGORY, P.J., JARVIS, S.C. Dynamics of Potassium Leaching on a Hillslope Grassland Soil. **Journal of Environmental Quality**, v. 33, p. 192, 2004b.

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.

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*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

ANDRIOLI, I. Efeitos da vinhaça em algumas propriedades químicas e físicas de um Latossolo Vermelho-Escuro textura média. Piracicaba: ESALQ, 1986. 85p. **Tese Doutorado**.

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.

BARROS, R. P.; VIÉGAS, P. R. A.; DA SILVA, T. L.; DE SOUZA, R. M.; BARBOSA, L.; VIÉGAS, R. A.; BARRETTO, M. C. V.; DE MELO, A. S. Alterações em Atributos Químicos de Solo Cultivado Com Cana-De-Açúcar e Adição de Vinhaça. **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 40, n. 3, p. 341-346, 2010.

BEBÉ, F. V.; ROLIM, M. M.; PEDROSA, E. M.; SILVA, G. B.; OLIVEIRA, V. S. Avaliação de solos sob diferentes períodos de aplicação com vinhaça. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, vol. 13, p. 781-787, 2009.

BERRA, C. M., MENCK, C. F., & DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, 29(6), 1340, 2006.

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.

BIANCHI, S.R.; NOGUEIRA, A.R.A.; MOREIRA, A.; SOUZA, G.B.; MENEZES, E.A.; LOPES, W.V. Alterações nos atributos químicos de um latossolo vermelho amarelo distrófico com adição de vinhaça. In: **Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas**. Londrina. Fertbio, 2008.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72(1-2), 248-254. 1976.

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.

BOZZATTO, V.; FONTANETTI, C. S., Sewage sludge toxicity in edaphic organism: analysis of midgut responses in the diplopod *Rhinocricus padbergi*. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 869-875, 2012

CAMARGO O.A; VALADARES J.M.A.S; GERALDI R.N. Características físicas e químicas de solo que recebeu vinhaça por longo tempo. Campinas: **Instituto Agrônomo**, 1983. 30p. (Boletim Técnico, 76).

CANDEIAS, Luis P.; STEENKEN, Steen. Reaction of HO. with Guanine Derivatives in Aqueous Solution: Formation of Two Different Redox-Active OH-Adduct Radicals and Their Unimolecular Transformation Reactions. Properties of G (-H). **Chemistry–A European Journal**, 2000, 6.3: 475-484.

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.

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.
- CHRISTOFOLETTI, C.A.; DAVID, J.A.O.; FONTANETTI, C.S. Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus*: a methodological comparison. **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.
- CHRISTOFOLETTI, C. A. et al. Diplopods as soil bioindicators of toxicity after application of residues from sewage treatment plants and ethanol industry. **Microscopy and Microanalysis**, v. 22, n. 5, p. 1098-1110, 2016.
- CHEN, B., LU, Y., CHEN, Y., CHENG, J. The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. **J Endocrinol**, 225(3), R83-R99. 2015.
- COELHO, M. P. M., MOREIRA-DE-SOUSA, C., DE SOUZA, R. B., ANSOAR-RODRÍGUEZ, Y., SILVA-ZACARIN, E. C. M., & FONTANETTI, C. S. Toxicity evaluation of vinasse and biosolid samples in diplopod midgut: heat shock protein *in situ* localization. **Environmental Science and Pollution Research**, v.24(27), p. 22007-22017, 2017.
- 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.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra Brasileira: cana de açúcar, Safra 2014/2015, v. 1, n. 3, 28p, 2014.
- CORREIA, J.E.; CHRISTOFOLETTI, C.A.; MARCATO, A.C.C.; MARINHO, J.F.U.; FONTANETTI, C.S. Histopathological analysis of tilapia gills (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) exposed to sugarcane vinasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.135, p.319-326, 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

phiscochemical treated vinasse by Ph adjustment with lime (CaO). **Chemosphere**, v. 173, p.494-501, 2017b.

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.

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.

DE MENDONÇA-CASADEI, J.; LASTORIA, G.; GABAS, S. G.; DE SOUZA, T. A.; TAKAHASHI, K. M.; CAVAZZANA, G. H. Estágio atual da utilização da vinhaça para fertirrigação no Estado de Mato Grosso do Sul. **Águas Subterrâneas**. 2015.

DICK, D.P., NOVOTNY, E.H., DIECKOW, J., BAYER, C., 2009. Química da matéria orgânica do solo, **in**: Melo, V. de F.

Dos SANTOS, G.R.; GARCIA, E.A.; SHIKIDA, P.F.A.; JÚNIOR, D.J.R. A agroindústria canvieira e a produção de etanol no Brasil: características, potenciais e perfil da crise atual. **In**: Quarenta Anos de Etanol em Larga Escala no Brasil: desafios, crises e perspectivas. p. 17-46, 2016.

DUKAN, S., FAREWELL, A., BALLESTEROS, M., TADDEI, F., RADMAN, M., & NYSTRÖM, T.. Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 97(11), 5746-5749. 2000.

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.

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.

FUJITA, S.; STEENKEN, S. Pattern of hydroxyl radical addition to uracil and methyl- and carboxyl-substituted uracils. Electron transfer of hydroxyl adducts with N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine and tetranitromethane. **Journal of the American Chemical Society**, v.103.10: p.2540-2545, 1981.

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.
- GODOY, J. A. P; FONTANETTI, C. S.. Diplopods as bioindicators of soils: Analysis of midgut of individuals maintained in substrate containing sewage sludge. **Water, Air, Soil Pollution**, v.210, p.389-398, 2010.
- GOLOVATCH, S. I.; KIME, D. Millipede (Diplopoda) distributions: A review. **Soil Organisms**, v.81 (3), p.565-597, 2009.
- Green, D. R.; Reed, J. C. Mitochondria and apoptosis. *science*, 281(5381), 1309-1312. (1998).
- 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.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine: Oxford University Press. *Inc, New York*, 1999.
- HAZRA, D. K.; STEENKEN, S. Pattern of hydroxyl radical addition to cytosine and 1-, 3-, 5-, and 6-substituted cytosines. Electron transfer and dehydration reactions of the hydroxyl adducts. **Journal of the American Chemical Society**, 105.13: 4380-4386, 1983.
- HOLANDA, A. **Biodiesel e inclusão social**. Brasília, DF: Câmara dos Deputados, 2004.
- HOPKIN, S. P.; READ, H. J. **The Biology of Millipedes**. 1 ed. New York: Oxford University Press, 1992. 233 pp.
- HOPKIN, S.P.; WATSON, K.; MARTIN, M.H.; MOULD, M.L. The assimilation of heavy metals by *Lithobius _B_ lembola* and *Glomeris marginata* (Chil: Dipl.). **Bijdragen Tot De Dierkunde**, v. 55, p. 88-94, 1985.
- 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.

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

KASAI, H.; NISHIMURA, S. Hydroxylation of the C-8 position of deoxyguanosine by reducing agents in the presence of oxygen. **In: Nucleic acids symposium series**. 1983. p. 165-167.

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.

KLAUNIG, J. E., WANG, Z., PU, X.; ZHOU, S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. **Toxicology and applied pharmacology**, 254(2), 86-99. 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.

KÖHLER, H.R.; ALBERTI, G. The effect of heavy metal stress on the intestine of diplopods. In: E. Meyer, K. Thaler and W. Schedl, eds. **Advances in Myriapodology**. Innsbruck: Ber nat-med Ver. Suppl., v. 10, p. 257-267, 1992.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic pathology**, 30(6), 620-650. 2002.

KOLAHCHI, Z., JALALI, M. Simulating leaching of potassium in a sandy soil using simple and complex models..**Agricultural Water Management**, v.85, p.85–94. 2006.

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.

PAGE, F. L., KWOH, E. E., AVRUTSKAYA, A., GENTIL, A., LEADON, S. A., SARASIN, A., & COOPER, P. K. Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. **Cell**, 101(2), 159-172, 2000.

LYRA, M. R. C. C.; ROLIM, M. M.; SILVA, J. A. A. da. Topossequência 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.

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..21.22, 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.110, p.239-245, 2014.

MARNETT, L. J. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 424(1-2), 83-95. 1999.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*, 47(3), 469-474. 1974.

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

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions I. radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. **Journal of Biological Chemistry**, 244.22: 6056-6063. 1969

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

MENDONÇA, M. A. Expansão da produção de álcool combustível no Brasil: uma análise baseada nas curvas de aprendizagem. **In: Congresso da sociedade brasileira de economia, administração e sociologia rural**, 46., 2008, Rio de Branco. **Anais...** Rio Branco: BNDES, 2008.

MERLINI, V. V.; NOGAROL, L. R.; MARIN-MORALES, M. A.; FONTANETTI, C. S. Toxicity of trifluralin herbicide in a representative of the edaphic fauna: Histopathology of the midgut of *Rhinocricus pdbergi* (Diplopoda). **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 1361-1369, 2012.

MICHELLON, E.; SANTOS, A. A. L.; RODRIGUES, J. R. A. Breve descrição do Proálcool e perspectivas futuras para o etanol produzido no Brasil. **In: Congresso da sociedade brasileira de economia, administração e sociologia RURAL**, 46., 2008, Rio Branco. **Anais...** Rio Branco: BNDES, 2008.

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.

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.

NOGAROL, L.R.; FONTANETTI, C.S.. Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate containing sewage mud: Tissular responses of the midgut. **Micron**, v.41, p.239-246, 2010.

NOGAROL, L. R.; FONTANETTI, C.S. Ultrastructural alterations in the midgut of diplopods after subchronic exposure to substrate containing sewage mud. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 218 , p. 539-547, 2011.

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.

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.

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**, vol. 9, p.197-201, 2005.

PENTEADO-ORELLANA, M.M. Estudo geomorfológico do sítio urbano de Rio Claro (SP). **Notícia Geomorfológica**, Campinas, 21 v.42, p. 23-56, 1981.

PEREZ, D. G.; FONTANETTI, C. S. Assessment of the toxic potential of sewage sludge in the midgut of the diplopod *Rhinocricus padbergi*. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 128, p. 437-444, 2011.

PIERI, C., OLIVER, R., 1986. Assessment of K losses in tropical cropping systems of francophone Africa and Madagascar, in: International Potash Institute (Ed.), Nutrient Balances and the Need for Potassium. International Potash Institute, Madison, WI, pp. 73–92.

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

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.

READ, H. J.; MARTIN, M. H. A study of millipede communities in woodlands contaminated with heavy metals. **In** Proceedings of the 7th International Congress of Myriapodology, ed. A. Minelli, E. J. Brill, Leiden, p.289-298, 1990.

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.

RIBEIRO, A. C.; NOVAIS, R. F.; BAHIA FILHO, A. F. C. Efeitos da vinhaça sobre a dispersão de argila de amostras de Latossolos. **Revista Ceres**, v.30, n.167, p.12-18, 1983.

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.

RUPPERT, E. E., FOX, R. S.; BARNES, R. D. (2005). **Zoologia dos invertebrados – Uma abordagem funcional-evolutiva**. São Paulo: Editora Roca Ltda.

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

SANTOS G.; ROSSIELLO R. O. P.; FERNANDES M.; GRADY P. C. O. Efeitos da vinhaça sobre o pH do solo, a germinação e o acúmulo de potássio em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**., Brasília, v. 16, n. 4, p.489-493, 1981.

SANTOS, G. R.; GARCIA, E. A.; SHIKIDA, P. F. A. A crise na produção do etanol e as interfaces com as políticas públicas. **Boletim Radar: tecnologia, produção e comércio exterior**, Ipea/Diset, n. 39, p. 27-38, jun. 2015.

SHARMA, V., SHARMA, K.N. Influence of Accompanying Anions on Potassium Retention and Leaching in Potato Growing Alluvial Soils. **Pedosphere**, v.23, p.464–471, 2013.

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.

SILVA-ZACARIN, E. C. M. ; CHAUZAT, M.P. ; ZEGGANE, S. ; DRAJNUDEL, P.; SCHURR, F. ; FAUCON, J.P. ; MALASPINA, O. ; ENGLER, J.A. . Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. **Current microscopy contributions**

to advances in science and technology. 5ed. Badajoz: Formatex Research Center, v. 1, p. 696-703, 2012.

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.

SLUPPHAUG, Geir; KAVLI, Bodil; KROKAN, Hans E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 531.1-2: 231-251. 2003

SOTO, M.A.A.; BASSO, J.B.; KIANG, C.H.; van GENUCHTEN, M.T. Simulação de fluxo e transporte de íons de vinhaça através de vertente da formação rio claro. **Águas Subterrâneas**, v.29, n.2, p. 162-174, 2015.

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/6laudass/SOUZA,%20Vitor%20Hugo%20Enumo%20de.pdf>>. Acesso em: 14/05/2019.

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.; 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.

SOUZA, R. B. ; MAZIVIERO, G. ; CHRISTOFOLETTI, C. A. ; PINHEIRO, T.G. ; FONTANETTI, C.S. . Soil Contamination with Heavy Metals and Petroleum Derivates: Impact on Edaphic Fauna and Remediation Strategies. In: Maria C. Hernandez Soriano. (Org.). **Soil Processes and Current Trends in Quality Assessment**. 1ªed.Rijeka: InTech, cap 6, p. 175-203, 2013.
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.

STADTMAN, E. R.. Protein oxidation in aging and age-related diseases. **Annals of the new York Academy of Sciences**, 928(1), 22-38. 2001.

TORRES, M. C. L., SOARES, N. D. F. F., MAIA, J. F. Parâmetros cinéticos da glutatona S-transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Ciênc Tecnol Aliment**. (2004).

UNICA – União da Indústria da cana-de-açúcar do estado de São Paulo. Histórico de Produção e Moagem. UNICA, 2019. Disponível em:

http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=31&tipoHistorico=2&acao=visualizar&idTabela=1802&produto=e-tanol_total&safraIni=1980%2F1981&safraFim=2015%2F2016&estado=RS%2CSC%2CPR%2CSP%2CRJ%2CMG%2CES%2CMS%2CMT%2CGO%2CDF%2CBA%2CSE%2CAL%2CPE%2CPB%2CRN%2CCE%2CPI%2CMA%2CTO%2CPA%2CAP%2CRO%2CAM%2CAC%2CRR Acesso em: 07/08/2019.

STEENKEN, Steen. Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e-and OH adducts. **Chemical Reviews**, , 89.3: 503-520, 1989.

TURKER, Mitchell S. Somatic cell mutations: can they provide a link between aging and cancer?. **Mechanisms of ageing and development**, 117.1-3: 1-19. 2000,

UYEDA, C.A.; MIRANDA, J.H.; DUARTE, S.N.; MEDEIROS, P.R.F.; DIAS, C.T.S. Avaliação dos efeitos da aplicação de vinhaça em características físicoquímicas de diferentes solos. **Engenharia Agrícola**, 33: 1-10. 2013.

VALAVANIDIS, A., VLAHOGIANNI, T., DASSENAKIS, M., & SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and environmental safety**, 64(2), 178-189. 2006.

VALKO, M., RHODES, C., MONCOL, J., IZAKOVIC, M. M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, 160(1), 1-40. 2006.

VAN GENUCHTEN, M.T., LEIJ, F.J., 1992. On estimating the hydraulic properties of unsaturated soils, **in**: VAN GENUCHTEN, M.T., LEIJ, F.J., LUND, L.J. (Eds.), *Proceedings of International Workshop, Indirect Methods for Estimating the Hydraulic Properties of Unsaturated Soils*. University of California, Riverside, pp. 1–14.

VIEIRA, A. J. S. C.; STEENKEN, S. Pattern of hydroxy radical reaction with adenine and its nucleosides and nucleotides. Characterization of two types of isomeric hydroxy adduct and their unimolecular transformation reactions. **Journal of the American Chemical Society**, 1990, 112.19: 6986-6994.

WINSTON, G W.; DI GIULIO, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquatic toxicology**, , 19.2: 137-161. 1991.
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.

ZIENOLDDINY, S., CAMPA, D., LIND, H., RYBERG, D., SKAUG, V., STANGELAND, L. B., ... & HAUGEN, A. A comprehensive analysis of phase I and phase II metabolism gene polymorphisms and risk of non-small cell lung cancer in smokers. **Carcinogenesis**, 29(6), 1164-1169, 2008.

ZOLIN, J.P.; BERTONHA, C.A.; FREITAS, P.S.; FOLEGATTI, M.V. Estudo exploratório do uso da vinhaça ao longo do tempo. II. Características da cana-de-açúcar.

Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 15, n. 3, p. 244-249, 2011.