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

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DA VINHAÇA APÓS A FITORREMEDIAÇÃO
EMPREGANDO DIFERENTES ORGANISMOS TESTES**

CLEITON PEREIRA DE SOUZA

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

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DA VINHAÇA APÓS A FITORREMEDIAÇÃO
EMPREGANDO DIFERENTES ORGANISMOS TESTES**

CLEITON PEREIRA DE SOUZA

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

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

S729a Souza, Cleiton Pereira de
Avaliação do potencial tóxico da vinhaça após a fitorremediação
empregando diferentes organismos testes / Cleiton Pereira de Souza. --
Rio Claro, 2019
52 f.

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

1. Ciências biológicas. 2. Toxicologia ambiental. 3. Histologia. 4.
Mitose. 5. Mutagênese. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DA VINHAÇA APÓS A FITORREMEDIAÇÃO
EMPREGANDO DIFERENTES ORGANISMOS TESTES

AUTOR: CLEITON PEREIRA DE SOUZA

ORIENTADORA: CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

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

Prof. Dr. LUÍS ADRIANO ANHOLETO
x / x

Profa. Dra. MARIA TEREZA PAMPLONA SILVA
x / x

Profa. Dra. THAYS DE ANDRADE GUEDES
x / x

Profa. Dra. VANESSA BEZERRA DE MENEZES OLIVEIRA
Pós-Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental / Universidade
Federal de São Carlos (UFSCar) - Campus Sorocaba

Rio Claro, 25 de outubro de 2019

À minha mãe, irmão
e ao meu pai (*in memoriam*),
os grandes e verdadeiros
amores da minha vida.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à minha família, em especial, meus pais e irmão, que sempre estiveram comigo e fizeram de tudo para que eu conseguisse conquistar meus objetivos. A vocês minha eterna gratidão.

Ao meu namorado Emerson, que dividiu comigo boa parte dessa caminhada, sempre com muita compreensão, paciência e companheirismo e à sua família por me acolher tão bem.

À minha orientadora Profa. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti, por me orientar, por ser mãe, terapeuta, pela paciência, pelo carinho, pelos ensinamentos científicos e para a vida.

Aos fofotes, Camila, Adolfo, Louise, Luiza, Maria Paula, Thays, Jorge, Cristina, Ana Claudia, Yadira, Raphael e Cintya, vocês fizeram meus dias mais felizes e com certeza nosso grupo de pesquisa é o mais lindo de todos.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Mutagênese Ambiental e também aos demais amigos do departamento de Biologia.

Ao professor José Paulo Sousa meu coorientador no Doutorado Sanduíche na Universidade de Coimbra- Portugal. Ao Tiago Natal-da-Luz pelo acompanhamento nos experimentos e ensinamentos e aos demais colegas e amigos do Laboratório de Ecotoxicologia de Solos.

À minhas amigas construídas em Três Lagoas Camila Hossotani, Flávia, Carol, Isabela Batalhão, Bianca e Elenita, atualmente nos vemos raramente, estamos longe na distância, mas sempre perto no coração e sempre que nos vemos percebo que nada mudou. Obrigado por serem minhas amigas.

Agradeço os técnicos Gerson, Roberta e Mônica, à secretária e desenhista Cristiane, ao jardineiro senhor João, pela paciência, ajuda e compreensão.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) - 88881.134599/2016-01.

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

Por fim garanto que todos foram muito importantes e só tenho a agradecer por tudo, se hoje estou concluindo mais esta etapa, é porque tive a ajuda e o companheirismo de vocês. Meu muito obrigado.

RESUMO

Embora o álcool possa ser produzido por meio de diversas matérias-primas, sua produção utilizando a cana-de-açúcar é bastante expressiva, em especial no Brasil. Em média, durante a produção do álcool, para cada litro gerado é produzida uma quantidade de 13L de vinhaça. A principal fonte de destinação deste resíduo é a fertirrigação de solos agrícolas. No entanto, devido as suas características físico-químicas o uso da vinhaça na fertirrigação pode oferecer riscos para ecossistemas aquáticos e terrestres. Diversos estudos para a avaliação da toxicidade da vinhaça bruta têm conciliado o uso de diferentes bioindicadores com as análises físico-químicas para melhor compreender a toxicidade desse resíduo, já bem evidenciada em diferentes organismos vivos. Tendo em vista a toxicidade causada por este resíduo, inúmeros métodos físicos, químicos e biológicos têm sido empregados em seu tratamento no intuito de diminuir sua toxicidade. Nesse contexto, o presente estudo teve por objetivo investigar a toxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar fitorremediada por meio de um sistema híbrido de tratamento, empregando diferentes bioindicadores e biomarcadores. Foram empregados *Allium cepa* (cebola) para avaliar fitotoxicidade, por meio da germinação e crescimento de raiz, e a citogenotoxicidade, por meio da análise de aberrações cromossômicas e presença de micronúcleos nas células meristemáticas das raízes. Diplópodos (*Rhinocricus padbergi*) foram utilizados para análises histopatológicas que evidenciam a toxicidade no intestino médio desses animais. Colêmbolos (*F. candida*) foram empregados para avaliação da ecotoxicidade por meio dos testes padronizados de comportamento de fuga e reprodução. Os resultados do presente trabalho indicam que a vinhaça fitorremediada foi mais tóxica nos níveis biológicos mais basais (celular e tecidual) em *A. cepa* e *R. padbergi*. Apesar da vinhaça fitorremediada ter atraído os colêmbolos, provavelmente, devido a sua alta quantidade de matéria orgânica, não reduziu a reprodução dos colêmbolos. Com base nos dados presentes na literatura que evidenciam a toxicidade da vinhaça bruta, infere-se com os resultados do presente estudo que a vinhaça fitorremediada apresenta um menor potencial tóxico, mas ainda pode provocar danos nos organismos empregados no presente estudo.

Palavras-chave: Toxicidade, genotoxicidade, histologia, comportamento de fuga, teste de reprodução.

ABSTRACT

Although alcohol can be produced from various raw materials, its production using sugar cane is quite significant, especially in Brazil. On average, during the production of alcohol, 13 liters of vinasse are produced for each liter generated. The main source of destination of this residue is the fertigation of agricultural soils. However, due to its physicochemical characteristics, the use of vinasse in fertigation can pose risks to aquatic and terrestrial ecosystems. Several studies to evaluate the toxicity of raw vinasse have reconciled the use of different bioindicators with the physicochemical analyzes to better understand the toxicity of this residue, already well evidenced in different living organisms. In view of the toxicity caused by this waste, numerous physical, chemical and biological methods have been employed in its treatment in order to reduce its toxicity. In this context, the present study aimed to investigate the toxicity of phytoremediated sugarcane vinasse through a hybrid treatment system, employing different bioindicators and biomarkers. *Allium cepa* (onion) were used to evaluate phytotoxicity by germination and root growth, and cytogenotoxicity by analysis of chromosomal aberrations and presence of micronuclei in meristematic root cells. Diplopods (*Rhinocricus padbergi*) were used for histopathological analysis showing the midgut toxicity of these animals. Collembolans (*F. candida*) were used to evaluate ecotoxicity by standardized escape and reproduction behavior tests. The results of the present study indicate that phytoremediated vinasse was more toxic at the most basal biological levels (cellular and tissue) in *A. cepa* and *R. padbergi*. Although phytoremediated vinasse attracted the collembolans, probably, due to its high amount of organic matter, it did not reduce the collembolans reproduction. Based on the literature data that show the toxicity of raw vinasse, it can be inferred from the results of the present study that phytoremediated vinasse presents a lower toxic potential, but may still cause damage to the organisms used in the present study.

Keywords: Toxicity, genotoxicity, histology, avoidance, reproduction test.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	Toxicidade da vinhaça em diferentes bioindicadores.....	11
2.2	Tratamentos realizados em vinhaça	12
2.3	<i>Allium cepa</i> como bioindicador e biomarcadores utilizados nessa espécie	14
2.4	Diplópodos como bioindicadores e as ferramentas de análise neste grupo.....	15
2.5	Colêmbolos como bioindicadores e testes padronizados.....	16
3	OBJETIVOS.....	18
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1	Fitotoxicidade em <i>A. cepa</i>	19
4.2	Citogenotoxicidade em <i>A. cepa</i>	20
4.3	Bioensaio com <i>Rhinocricus padbergi</i>	22
4.3.1	Histologia para avaliação da toxicidade em diplópodos.....	24
4.4	Bioensaio com <i>Folsomia candida</i> para análise de ecotoxicidade	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	Análises físico-químicas	28
5.2	Fitotoxicidade em <i>A. cepa</i>	30
5.3	Citogenotoxicidade em <i>A. cepa</i>	31
5.4	Toxicidade em diplópodos	33
5.5	Ecotoxicidade em colêmbolos	37
6	CONCLUSÃO	40
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

A produção de etanol empregando a cana-de-açúcar como matéria prima teve um forte incentivo durante a década de 1970, com o lançamento do Programa Nacional do Alcool (PróAlcool) em novembro de 1975, cujo objetivo foi diminuir as importações de petróleo e estimular o uso de etanol como combustível (CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2013; GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008).

Inicialmente, o incentivo ao aumento de produção de etanol nas biorrefinarias visava vantagens econômicas. No entanto, nos anos seguintes devido ao aumento da preocupação mundial com a problemática da poluição ambiental, os biocombustíveis surgem como uma fonte de energia que causa menos prejuízos ao meio ambiente, além de usarem matérias primas renováveis; desta forma a indústria de etanol ganhou destaque e consolidou-se mundialmente (FUESS; RODRIGUES; GARCIA, 2017; GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008).

O uso de biocombustíveis em substituição aos combustíveis fósseis vem aumentando e tem se demonstrado vantajoso tanto do ponto de vista econômico como na redução do impacto ambiental. O etanol é produzido mundialmente a partir de diferentes matérias primas, tais como, milho, cana-de-açúcar, beterraba, sorgo, entre outras (FUESS; GARCIA, 2014; FUESS; RODRIGUES; GARCIA, 2017; HOAURAU *et al.*, 2018). No Brasil a cana-de-açúcar é a matéria prima mais empregada na produção de etanol.

A vinhaça, popularmente conhecida por restilo, vinhoto ou garapão, é um dos principais resíduos da transformação da cana-de-açúcar em etanol. A cada litro de álcool produzido são gerados de 9 a 14 litros de vinhaça; este resíduo possui em geral, pH ácido (3,5-5,4), alta demanda química e bioquímica oxigênio (DQO/DBO), com valores médios de (50-150 g L⁻¹) e (40-50 g L⁻¹), respectivamente, devido a sua alta taxa de conteúdo orgânico; este resíduo apresenta coloração marrom escuro pela presença de melanoidinas (CHOWDHARY; RAJ; BHARAGAVA, 2018; CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2013; ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2011).

Considerando uma produção média de 13 litros de vinhaça para cada litro de álcool produzido, estima-se com base nos dados atuais que a produção mundial de etanol passará de 122 bilhões, para 134 bilhões em 2024 (OECD/FAO, 2015) e 143 bilhões em 2028 (OECD/FAO, 2019), então, serão produzidos, respectivamente, cerca de 1.742 (HOAURAU *et al.*, 2018) e 1.859 bilhões de litros desse resíduo.

A principal destinação da vinhaça é a utilização na fertirrigação; no entanto, este uso apesar de economicamente vantajoso, tem comprometido e contaminado os recursos aquáticos e o solo, devido a sua alta carga de matéria orgânica, seu baixo pH, bem como pela frequência

de disposição deste resíduo no solo (PERUZZO *et al.*, 2018). De acordo com Fuess, Rodrigues e Garcia (2017), embora alguns estudos indiquem efeitos benéficos do uso da vinhaça como fertilizante em aplicações de curto prazo, em casos de disposição frequente, os primeiros impactos ambientais causados são o processo de salinização do solo e uma sobrecarga orgânica, causada pela grande quantidade de sais e matéria orgânica. Outro ponto importante é a contaminação por metais presentes neste resíduo que podem causar efeitos fitotóxicos nas áreas fertirrigadas.

A poluição causada pela vinhaça é uma questão ambiental bastante relevante uma vez que esta pode alterar as características físico-químicas do solo e de corpos d'água (CHOWDHARY; RAJ; BAHIRAGAVA, 2018; MOHANA; ACHARYA; MADAMWAR, 2009). Neste sentido, estudos que avaliem seus efeitos em diferentes organismos são fundamentais e preditivos.

Estes estudos têm sido realizados por pesquisadores de diferentes países (CHOWDHARY; RAJ; BAHIRAGAVA, 2018; HOAURAU *et al.*, 2018); diversos estudos de pesquisadores brasileiros têm demonstrado a toxicidade de amostras de vinhaça de cana-de-açúcar para diferentes organismos, tais como, invertebrados de solo (ALVES *et al.*, 2015; CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2016, COELHO *et al.*, 2017), peixes (CORREIA *et al.*, 2017a, 2017b ; MARINHO *et al.*, 2014) e plantas (GARCIA *et al.*, 2017; PEDRO-ESCHER *et al.* 2016; PEDRO-ESCHER; MAZIVIERO; FONTANETTI, 2014;).

De acordo com o exposto, a contaminação ambiental causada pelo descarte da vinhaça bruta no meio ambiente é crítica. Portanto, é imprescindível que este resíduo seja tratado adequadamente antes de sua disposição no ambiente. Este tratamento pode ser realizado empregando diferentes processos físicos, químicos e/ou biológicos, em conjunto ou separadamente, com o objetivo de melhorar a efetividade do tratamento (CHOWDHARY; RAJ; BAHIRAGAVA, 2018; MARCATO *et al.*, 2019).

Para a avaliação da toxicidade de determinada substância, composto ou amostra ambiental, o uso de bioensaios em conjunto com análises físico-químicas é bastante importante. Nestes estudos são utilizados diferentes bioindicadores associados a diversos biomarcadores empregados em diferentes níveis biológicos.

Neste sentido, vale a pena salientar que diferentes tipos de organismos são atualmente utilizados como bioindicadores, ou seja, espécies sentinelas que são usadas como indicadores para avaliação da qualidade ambiental dos possíveis efeitos de riscos naturais ou de origem antropogênica.

Os vegetais, por serem receptores biológicos diretos de poluentes, constituem um importante material para o biomonitoramento de possíveis contaminantes ambientais. As plantas *Allium cepa* (cebola) (LEME; MARIN-MORALES, 2009), *Tradescantia* spp (MISIK *et al.*, 2011) e *Vicia faba* (fava) (IQBAL, 2016) são principalmente empregadas na avaliação de biomarcadores de citotoxicidade e genotoxicidade de diferentes contaminantes (SILVEIRA *et al.*, 2017) e misturas complexas (BHAT *et al.*, 2019); diversas espécies vegetais são empregadas em testes de toxicidade padronizados e creditados pela *International Organization for Standardization* (ISO, 2004) e *United States Environmental Protection Agency* (USEPA, 1996); que avaliam germinação, crescimento de raiz e desenvolvimento inicial das plantas.

Artrópodes da fauna terrestre de hábitos saprófagos tais como, isópodos, colêmbolos e diplópodos estão entre os organismos mais adequados para avaliar os efeitos da acumulação de substâncias tóxicas presentes no solo, devido ao seu contato direto com contaminantes ali presentes (GRÄFF *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 2014).

De acordo com Souza *et al.* (2014) os diplópodos possuem alta eficiência na acumulação de metais pesados em seus tecidos, por isso podem ser usados como indicadores ecológicos de poluição de solo. Nestes organismos, as alterações morfológicas são utilizadas como biomarcadores na investigação de compostos químicos específicos e no monitoramento de efeitos agudos e crônicos. A análise histológica e ultra-estrutural tem se tornado uma ferramenta amplamente utilizada em estudos com invertebrados, com o objetivo de investigar danos causados por substâncias tóxicas (CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2016; FONTANETTI *et al.*, 2010).

Testes utilizando colêmbolos para a avaliação de risco ambiental foram padronizados pela ISO, incluindo testes de fuga (ISO 17512-2:2011) e testes de reprodução (ISO 11267:1999) (SCHAEFER, 2003; HÖS *et al.*, 2012). Estes invertebrados são escolhidos para tais testes por possuírem a capacidade de evitar solos contaminados e por serem resistentes, sensíveis, de baixo custo e ecologicamente relevantes (NATAL-DA-LUZ *et al.*, 2004). Os testes de reprodução tornam-se importantes para estudos ecotoxicológicos devido a sua influência na dinâmica populacional (DENNEMAN; STRAALLEN, 1991), enquanto que os testes de fuga tornam-se uma alternativa devido ao seu curto período e sua alta sensibilidade (HUND-RINKE *et al.*, 2003).

Diante do exposto, este projeto teve como objetivo geral avaliar o potencial tóxico de amostras de vinhaça após tratamento por fitorremediação, utilizando bioindicadores vegetais e animais, uma vez que a prática de fertirrigação é bastante utilizada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Toxicidade da vinhaça em diferentes bioindicadores

Em 1999, Yesilada observou que a vinhaça induziu a diminuição da taxa de fecundidade dos ovos e na fertilidade de fêmeas de drosófilas (*Drosophila melanogaster* - Diptera).

Kumar e Gopal (2001) avaliaram a toxicidade de diferentes concentrações de vinhaça em *Channa punctatus* (Pisces). Outros estudos posteriores em peixes também comprovaram a toxicidade desse resíduo. Em tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas a diluições de 5 e 10% de vinhaça de cana-de-açúcar foi observada alta mortalidade dos peixes, comprovando sua toxicidade (MARINHO *et al.*, 2014; CORREIA *et al.*, 2017). Em diluições menores (1, 2,5, 5 e 10%), Marinho *et al.* (2014) por meio de análises em fígado concluíram que a vinhaça tem um potencial tóxico e citotóxico dose-dependente em corpos de água e que o fígado é fortemente afetado quando há exposição aguda a este contaminante. Correia *et al.* (2017a) em estudo das brânquias dos peixes, observaram modificações morfológicas no tecido branquial e um aumento significativo de células mucosas em todas as diluições de vinhaça testadas.

Além da toxicidade observada em meio aquático, testes realizados com vinhaça em bioindicadores terrestres também indicaram potenciais riscos quando lançada no solo.

Ensaio realizado com espécies padronizadas de invertebrados terrestres expostas às amostras de vinhaças de diferentes origens mostraram que as amostras provenientes de destilarias industriais foram mais tóxicas, do que a produzida em laboratório. A relação entre a toxicidade de cada amostra de vinhaça e o tipo de solo resultou em valores de toxicidade específicos para cada espécie. Desta forma, os autores concluíram que a disposição de vinhaça em solos tropicais deveria considerar a sensibilidade dos invertebrados de solo (ALVES *et al.*, 2015). Testes com diplópodos, grupo representativo da macrofauna do solo, também foram empregados na avaliação do potencial tóxico desse resíduo (CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2016; COELHO *et al.*, 2017).

Em estudo realizado com *A. cepa* (cebola), Souza *et al.* (2013a) adicionaram vinhaça de cana-de-açúcar a solo de *landfarming* proveniente do tratamento de resíduos de petróleo e observaram efeitos clastogênicos das amostras. Os autores inferiram que, provavelmente, houve a liberação dos metais adsorvidos na matéria orgânica potencializada pela vinhaça.

Christofoletti, Pedro-Escher e Fontanetti (2013) testaram a toxicidade em solo, da vinhaça de cana-de-açúcar e de um biossólido, em amostras isoladas e combinadas, por meio do teste com *A. cepa*, antes e depois do bioprocessamento por diplópodos. Após o

bioprocessamento, as autoras observaram redução dos níveis de genotoxicidade e mutagenicidade dos dois resíduos, desta forma concluíram que os diplopódos podem ser uma alternativa viável para o gerenciamento de resíduos.

Pedro-Escher, Maziviero e Fontanetti (2014) avaliaram a ação da vinhaça de cana-de-açúcar empregando *Tradescantia pallida*, por meio do teste de micronúcleo (Trad-MCN). Os autores testaram três concentrações de vinhaça diluída em água (12,5, 25 e 50%); os resultados obtidos mostraram que a maior concentração foi capaz de induzir formação de micronúcleos de forma significativa quando comparada ao controle negativo, por isso os autores sugeriram cautela no uso da vinhaça como fertilizante, embora seja uma prática economicamente viável.

Em uma análise geral fica claro que são necessárias medidas específicas para uma reutilização mais adequada da vinhaça. Essas medidas incluem a aplicação de processos de tratamento, caracterização mais específica da vinhaça quanto a área de cultivo e estação, para a definição de metodologias mais adequadas para calcular a taxa de aplicação segura do resíduo (FUESS; RODRIGUES; GARCIA, 2017).

2.2 Tratamentos realizados em vinhaça

O uso da vinhaça na fertirrigação do solo tem como principal vantagem o baixo custo para destinação deste resíduo (CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2013; REIS; HU, 2017) e alguns estudos indicam outros benefícios como o aumento da produtividade nas aplicações a curto prazo. A justificativa para o uso da vinhaça como fertilizante é a presença de macro e micronutrientes, principalmente dos elementos químicos potássio, fosfato e nitrogênio em sua composição (FUESS; GARCIA, 2017; FUESS, RODRIGUES; GARCIA, 2014).

No entanto, há um consenso na literatura de que o uso da vinhaça na fertirrigação traz potenciais riscos à saúde dos ecossistemas aquáticos e terrestres e para os organismos ali estão presentes (CHOWDHARY; RAJ; BAHARAGAVA, 2018; HOURAU *et al.*, 2018). Diante dos potenciais efeitos tóxicos causados pela vinhaça, inúmeras tecnologias estão sendo estudadas e desenvolvidas com o objetivo tanto de diminuir a quantidade, quanto de mitigar a carga de substâncias/compostos tóxicos desse resíduo de composição complexa (ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2011; MOHANA; ACHARYA, MADAMWAR, 2009; HOAURAU *et al.*, 2018). O tratamento da vinhaça pode ser realizado por meio de processos físicos-químicos e/ou biológicos, separados ou combinados (MARCATO *et al.*, 2019).

Como forma de diminuir a presença de sólidos suspensos e a carga de substâncias orgânicas presentes na vinhaça destacam-se os processos químicos, tais como a

coagulação/floculação que objetivam a formação de partículas maiores que facilitam a decantação destes compostos. Também para a redução da carga orgânica presente neste resíduo, pode ser empregado o método físico de adsorção com o uso de substâncias adsorventes como o carvão ativado, além de processos físicos de oxidação, por meio de oxidação úmida, fotocatalise ou ozonização (CHOWDHARY; RAJ; BAHIRAGAVA, 2018; HOURAU *et al.*, 2018).

Alternativas com menor custo também têm sido estudadas, tal como a correção de pH utilizando hidróxido de sódio (BOTELHO *et al.*, 2012) e cal (CORREIA *et al.*, 2017b). Botelho *et al.* (2012) avaliaram a toxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar em microcrústaceos *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia magna* e no peixe *Danio rerio*, antes e depois de ajuste de pH. Os autores observaram uma diminuição na mortalidade desses organismos após a correção para um pH neutro. Correia *et al.* (2017b) avaliaram a eficácia do tratamento da vinhaça pela correção de seu pH utilizando cal, produto relativamente barato e comumente utilizado para corrigir pH do solo. Os autores observaram nos tratamentos com vinhaça bruta um potencial genotóxico, pois houve indução de taxas significativas de micronúcleo em tilápias (*Oreochromis niloticus*) e mortalidade elevada; no entanto, nas amostras de vinhaças tratadas, com pH neutro/alcalino houve uma menor taxa de micronúcleos e redução da mortalidade.

Nos tratamentos biológicos destacam-se principalmente os processos microbiológicos anaeróbios (HOARAU *et al.*, 2018) que podem reduzir a toxicidade da vinhaça por meio da biodegradação de compostos orgânicos (BOTELHO *et al.*, 2012).

A eficiência dos diferentes processos de tratamento, conforme os descritos acima, em reduzir a toxicidade da vinhaça têm sido comumente avaliada por meio de estudos ecotoxicológicos com organismos bioindicadores, pois estas avaliações refletem o aumento ou diminuição da toxicidade geral de todos os compostos presentes nas amostras testadas (BOTELHO *et al.*, 2012; CORREIA *et al.*, 2017b; MARCATO, 2019; MONTEIRO *et al.*, 2011).

Marcato *et al.* (2019) desenvolveram um sistema híbrido de tratamento, combinando métodos biológicos e físico, para otimizar as características físico-químicas da vinhaça, visando a diminuição de seu potencial tóxico, mas com a possibilidade de manutenção de seu potencial fertilizante. Os resultados da caracterização físico-química demonstraram que o sistema proposto foi capaz de reduzir componentes reconhecidamente tóxicos, tais como altos valores de DBO e DQO, sólidos suspensos totais e de macro e micronutrientes. Marcato (2019) avaliou a toxicidade em peixes do resíduo após o tratamento pelo sistema híbrido e

constatou que as alterações que os órgãos alvos estudados (brônquias e fígado) não sofreram alterações significativas. Diante desses resultados, concluiu-se que o sistema híbrido foi capaz de diminuir o potencial tóxico da vinhaça.

2.3 *Allium cepa* como Bioindicador e biomarcadores utilizados nessa espécie

Allium cepa tem sido indicado como um eficiente organismo teste de citotoxicidade, genotoxicidade e instabilidade cromossômica devido às características que possui, facilidade de cultivo e manuseio, disponibilidade ao longo do ano, bem como por possuir cromossomos grandes e em pequeno número ($2n=16$), o que facilita a observação de danos cromossômicos e distúrbios do ciclo mitótico (FISKESJO, 1985; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Dentre as principais respostas, consideradas excelentes biomarcadores em cebola, utilizadas na avaliação da qualidade ambiental, estão o índice mitótico, alterações na estrutura e número cromossômico, micronúcleos e troca de cromátides irmãs.

O índice mitótico (IM) é caracterizado pelo número total de células em divisão no ciclo celular e tem sido usado na avaliação da citotoxicidade de inúmeros agentes (SRIVASTAVA; MISHRA, 2009; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009; CHRISTOFOLETTI; PEDRO-ESCHER; FONTANETTI, 2013).

Alterações nas estruturas cromossômicas podem ter diversas origens: (1) quebras no DNA, (2) inibição da síntese de DNA e erros no mecanismo de replicação e (3) segregação anormal dos cromossomos. Todos estes processos podem ocorrer espontaneamente ou pela ação de xenobióticos (BONCIU *et al.*, 2018). Para avaliação dessas aberrações, muitos tipos de aberrações cromossômicas (AC) são considerados nas diferentes fases da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase). No entanto, estas análises não são simples, e exigem conhecimento sobre as fases de divisão e possíveis anormalidades. As Aberrações cromossômicas de uma maneira geral são divididas em clastogênicas, que de uma forma simples significa lesões nos cromossomos, e aneugênicas, que são distúrbios na segregação dos cromossomos durante o processo de divisão celular (SHARMA; PANNEERSELVAM, 1990), sendo este um parâmetro indicador de genotoxicidade (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Micronúcleos (MN) são encontrados como pequenos corpos extracelulares resultantes de quebra cromossômica (fragmentos acêntricos) e/ou cromossomos inteiros que não atingiram os polos do fuso durante a divisão celular (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2011). Além disso, MN podem ser resultantes do processo de poliploidização, originando estes corpúsculos a partir da eliminação do excesso de DNA do núcleo principal na tentativa de restaurar as

condições normais de ploidia, são induzidos espontaneamente ou por ação de xenobióticos (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). Os resultados significativos com este teste fornecem fortes evidências de genotoxicidade sistêmica da substância química avaliada (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003). Micronúcleos são biomarcadores de eventos genotóxicos e de instabilidade cromossômica (FENECH *et al.*, 2011), que se não forem reparados pelas células podem gerar futuras mutações.

Uma metodologia simples, sensível e rápida para avaliar a toxicidade aguda de diferentes substâncias químicas para plantas é por meio de estudos toxicológicos com sementes, com o objetivo de avaliar germinação e crescimento de raiz (MISIK *et al.*, 2014; PALMIERI *et al.*, 2014). A germinação das sementes é uma fase importante no ciclo de desenvolvimento vegetativo (RAHOUI; CHAOUI; EL FARJANI, 2008); portanto, avaliar a inibição da germinação de sementes expostas a contaminantes neste estágio, é a melhor maneira de entender os mecanismos tóxicos dos contaminantes ambientais para as plantas (LIU *et al.*, 2012).

De acordo com Bhat *et al.* (2019) *A. cepa* é um excelente bioindicador vegetal para avaliar a toxicidade de resíduos e efluentes industriais, pois possibilita a avaliação de diferentes biomarcadores, tanto os macroscópicos, germinação e crescimento de raiz, como os microscópicos, tais como alterações cromossômicas e nucleares nas células meristemáticas.

2.4 Diplópodos como bioindicadores e as ferramentas de análise neste grupo

Intimamente envolvidos com os processos de decomposição, fragmentação orgânica e consequente formação do solo, os hábitos alimentares destes macrodetritívoros possibilita a transferência de cerca de 60 a 90% de matéria orgânica para o meio ambiente onde se encontram e, desse modo, aumentam a área de superfície disponível à atividade microbiana, a qual viabiliza a dinâmica de nutrientes no solo. Este processamento microbiano subsequente da matéria orgânica é um componente crítico no desenvolvimento do solo resultando na mineralização dos nutrientes necessários para o crescimento das plantas (BUENO-VILLEGAS *et al.*, 2004; SNYDER; HENDRIX, 2008; MASSE *et al.*, 2017; BUCH *et al.*, 2018).

As contribuições destes invertebrados como ferramentas de monitoramento se expressam desde análises de presença de metais como cádmio, chumbo, zinco e mercúrio (READ; MARTIN, 1990; KÖHLER; ALBERTI, 1992; ZANGER *et al.*, 1996; BUCH, *et al.*, 2018), em avaliações de possíveis contaminações de solos com diversas substâncias (SOUZA *et al.*, 2011; MERLINI *et al.*, 2012; CHRISTOFOLETTI *et al.*, CHRISTOFOLETTI *et al.*,

2012; 2013a; b; 2016; COELHO *et al.*, 2017), em avaliações de degradação ambiental, bem como da restauração de áreas ecológicas degradadas, utilizando-se de uma ampla variedade de testes (SNYDER; HENDRIX, 2008; MALEQUE; MAETO; ISHII, 2009; BOWIE *et al.*, 2019).

O intestino médio tem sido um dos órgãos alvo para estudos, visto que o mesmo possui um importante papel nos processos de detoxificação e excreção de xenobióticos, pois funciona como uma barreira, impedindo que compostos tóxicos ou não essenciais, alcancem o restante do corpo (HOPKIN *et al.*, 1985; TRIEBSKORN *et al.*, 1991; KÖHLER, TRIEBSKORN, 1998; GODOY, FONTANETTI, 2010; NOGAROL, FONTANETTI, 2010, 2011). Todavia, ao ingerirem solo ou alimentos altamente contaminados, compostos indesejáveis podem ultrapassar a barreira criada pelo epitélio, promovendo diversas alterações.

Alterações tissulares no intestino médio de diplópodos expostos a vinhaça foram estudadas por Christofolletti *et al.* (2016) utilizando a análise histopatológica sob microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão e por Coelho *et al.* (2017) utilizando a imunomarcagem de HSP70. Estes estudos demonstraram respostas danosas do organismo frente ao resíduo.

2.5 Colêmbolos como bioindicadores e testes padronizados

A utilização de espécies de invertebrados de solo em testes de ecotoxicidade em complemento as análises físico-químicas possibilitam a investigação dos efeitos da biodisponibilidade de poluentes presentes no solo; esses organismos são reconhecidamente sensíveis a alterações causadas pelo homem no ambiente terrestre (ALVES *et al.*, 2015; ALVES; CARDOSO, 2016).

Diferentes espécies de invertebrados de solo possuem testes padronizados pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) e pela ISO, tais como minhocas (*Eisenia andrei* e *E. fetida*), colêmbolos (*Folsomia candida* e *F. fimetaria*), enquitreídeos (*Enchytraeus albidus* e *E. crypticus*), ácaros (*Hypoaspis aculeifer*) e isópodos (*Porcellio scaber* e *Porcellionides pruinosus*).

Os colêmbolos compreendem um grupo de microartrópodes pertencentes à mesofauna do solo, que possuem um papel importante como reguladores dos processos de decomposição; se alimentam de hifas de fungos, material vegetal em decomposição e predam microfauna do solo (JÄNSCH, AMORIM; RÖMBKE, 2005). A espécie *Folsomia candida* é a mais utilizada

nos testes de padronizados de ecotoxicologia no comportamento de fuga – ISO 17512-2 (2011) e na reprodução - ISO 11267 (1999) destes animais.

O teste de comportamento de fuga é importante como ferramenta de triagem da toxicidade de diferentes substâncias presentes no solo, pois os organismos tendem a evitar solos contaminados, tendo em vista que existe uma relação direta entre a biodisponibilidade de contaminantes no solo e sua qualidade como habitat para estes organismos (ISO, 2011; NATAL-DA-LUZ *et al.*, 2008).

O teste de reprodução tem o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes doses de uma substância, composto ou ainda, de amostras ambientais de solo contaminadas, sobre a quantidade de juvenis gerados a partir da exposição de 10 indivíduos adultos ao final do período de exposição (28 dias). Neste ensaio os organismos ficam expostos aos contaminantes por via dérmica e alimentar (ISO, 1999).

Os dois ensaios acima relatados têm sido amplamente utilizados para avaliação da qualidade de solo, seja pela adição de diferentes contaminantes ao solo (CHELINHO *et al.*, 2012; de SANTO *et al.*, 2018, 2019; ALVES *et al.*, 2015) ou ainda na investigação de amostras ambientais de solo contaminado (NIEMEYER *et al.* 2010, 2015).

3 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo geral avaliar a toxicidade de vinhaça da cana-de-açúcar após fitorremediação por aguapé, obtida por um sistema híbrido de tratamento (MARCATO *et al.*, 2019) utilizando diferentes biomarcadores e bioindicadores.

Os objetivos específicos consistiram em:

- Avaliar o potencial fitotóxico do resíduo por meio de testes de germinação e crescimento de raiz em *Allium cepa*.
- Avaliar o potencial citotóxico e genotóxico por meio das análises da frequência dos índices mitóticos, de aberrações cromossômicas, anormalidades nucleares e de micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa*.
- Analisar o potencial tóxico do resíduo em um representante da fauna edáfica por meio da histopatologia do intestino médio do diplópodo *Rhinocricus padbergi*.
- Avaliar a ecotoxicidade da vinhaça tratada através dos testes de comportamento de fuga e de reprodução padronizados pela ISO utilizando a espécie *Folsomia candida* (Collembola).

4 MATERIAL E MÉTODOS

A amostra de vinhaça utilizada neste estudo foi obtida por meio de um sistema híbrido de tratamento, desenvolvido pela Profa. Dra. Ana Claudia de Castro Marcato (MARCATO *et al.*, 2019). O sistema desenvolvido consistiu em três etapas: 1º) um período de estabilização da vinhaça; 2º) procedimento de filtração e 3º) a fitorremediação da vinhaça com *Eichhornia crassipes* (aguapé). O ensaio do sistema de tratamento híbrido foi conduzido em triplicata. Desta forma a amostra de vinhaça avaliada no presente estudo foi uma amostra composta formada por partes iguais de três amostras de vinhaça fitorremediada por 15 dias proveniente do sistema híbrido.

Após coletadas, as amostras de vinhaça fitorremediada por 15 dias foram armazenadas em câmara fria, até a montagem dos bioensaios.

A caracterização físico-química da vinhaça foram realizadas pelo laboratório ASL Análise Ambiental (Rio Claro, São Paulo, Brasil).

A caracterização de amostras de vinhaça foi baseada no conteúdo de oligoelementos (Al, Sb, As, Ba, B, Cd, Pb, Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Hg, Mo, Ni, Ag, Se, V, Zn), no potencial agrônomo (carbono orgânico, condutividade elétrica, nitrito, nitrogênio, nitrogênio Kjeldahl, nitrogênio amoniacal, sódio total, potássio total, cálcio total, magnésio total óxido de potássio, sólidos suspensos totais) e DQO (Demanda Química de Oxigênio) e DBO (Demanda Biológica de Oxigênio).

4.1 Fitotoxicidade em *A. cepa*

Para a realização deste estudo foram utilizadas sementes da variedade baia periforme de *A. cepa* da marca Isla[®], de mesmo lote, dentro do prazo de validade e livre de agrotóxicos.

O bioensaio foi realizado em placas de Petri previamente lavadas com detergente, água de torneira, acetona, água de torneira, solução de ácido nítrico 10% e finalmente enxaguadas em água de torneira e água destilada; conforme recomendação da norma ABNT NBR 15537 (2014).

Como substratos foram utilizados papéis de filtro; 30 sementes foram submetidas à germinação em estufa BOD, com temperatura controlada de 22°C±1, com fotoperíodo 12h:12h (luz:escuro) as quais foram germinadas diretamente em 5 mL de seis diluições de vinhaça de cana-de-açúcar fitorremediada por 15 dias (2,5, 5, 10, 20, 40 e 80%).

A substância utilizada para o controle positivo (CP) foi sulfato de zinco heptahidratado (0,3 M). O controle negativo (CN) foi realizado com água destilada. O ensaio foi realizado em cinco réplicas distribuídas aleatoriamente em estufa BOD, com exposição de 120 horas.

A quantidade de sementes germinadas após 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88 e 96 h de exposição foi contabilizada. Para o cálculo do índice de velocidade de germinação foi adotado a fórmula:

$$[(N_1 \times 1) + (N_2 - N_1) \times \frac{1}{2} + (N_3 - N_2) \times \frac{1}{3} + (N_y - (N_y - 1) \times \frac{1}{N_y})],$$

Onde N_y é o número de sementes germinadas no período (PALMIERI *et al.*, 2014; GARCIA *et al.*, 2019).

Transcorridas as 120 h foram mensurados os comprimentos das raízes utilizando paquímetro digital; o total de sementes germinadas ao final do período de exposição também foi contabilizado.

A partir do número de total de sementes germinadas ao final do bioensaio calculou-se a porcentagem de germinação, utilizando-se da expressão matemática: % sementes germinadas = [número de sementes germinadas/ total de sementes distribuídas] x 100.

É importante destacar aqui que o parâmetro de germinação adotado no presente estudo, tanto para avaliação da velocidade de germinação, como do total de sementes germinadas ao final do bioensaio, foi a protusão de raiz, ou seja, o conceito bioquímico/fisiológico de germinação.

Os testes Shapiro-Wilk e Levene foram empregados para avaliar a normalidade e a homogeneidade dos dados, respectivamente. Após a verificação de que os dados atendiam os pressupostos de normalidade e de homogeneidade de variâncias realizou-se o teste paramétrico ANOVA (*Analysis of Variance*) um critério, seguido dos pós-teste de Dunnett para comparação dos grupos tratados com o controle negativo ($p < 0,05$).

4.2 Citogenotoxicidade em *A. cepa*

O bioensaio foi realizado em placas de Petri, previamente higienizadas, contendo 70 sementes submetidas à germinação em estufa BOD em placas de Petri com papel de filtro, com temperatura controlada de 22°C, as quais foram germinadas diretamente na amostra de vinhaça fitorremediada por 15 dias e sua diluição em água (50%). Para o controle positivo foi utilizado o agente alquilante metil metano sulfonato, de ação clastogênica ($7,7 \times 10^{-3} \mu\text{L mL}^{-1}$), o controle negativo foi realizado com água destilada. O ensaio foi realizado em triplicata. A exposição foi realizada por 5 dias, tempo de exposição que possibilitou que as raízes atingissem tamanho suficiente para favorecer as posteriores análises citogenéticas (1,5-2cm). As sementes que não germinaram foram quantificadas. As raízes foram fixadas em Carnoy 3:1 (3 partes álcool etílico PA:1 parte de ácido acético glacial PA) por 6 h, sendo, após este

período, transferidas para um novo Carnoy, onde ficaram conservadas em geladeira até sua utilização.

Para realizar as análises citogenéticas, as raízes foram submetidas à reação de Feulgen (MELLO; VIDAL, 1978) com uma hidrólise ácida em HCl 1N a 60°C, durante 10 minutos, seguida de uma lavagem em água destilada. Logo após, foram colocadas em reativo de Schiff, por duas horas. Na confecção das lâminas foi utilizado carmim acético 2% para facilitar o espalhamento das células e para contraporar o citoplasma. Todas as lâminas foram obtidas, submetendo os meristemas radiculares a um esmagamento suave entre lâmina e lamínula. As lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas foram montadas em Entellan®, para serem posteriormente observadas.

Foram analisadas 300 células meristemáticas de *A. cepa* por lâmina. Quinze lâminas foram observadas por réplica e cada tratamento e controles negativo e positivo, cerca de 4.500 células para cada réplica. Após a análise das três réplicas, aproximadamente, 13.500 células por tratamento foram analisadas para se determinar e comparar as frequências de células em intérfase, em processo de divisão celular e com as frequências de possíveis alterações que podem ser encontradas, tais como, anormalidades nucleares, aberrações cromossômicas e micronúcleos, de acordo com os seguintes parâmetros e cálculos (SOUZA *et al.*, 2017) descritos abaixo.

A citotoxicidade foi avaliada pelo índice mitótico (IM) pela seguinte fórmula:

$$\text{IM} = \text{Número de células em divisão} / \text{Total de células observadas} \times 100$$

A genotoxicidade foi avaliada pela obtenção do índice de genotoxicidade (IGen) de células portadoras de aberrações cromossômicas (AC) e anormalidades nucleares (AN), seguindo a fórmula:

$$\text{IGen} = \text{Número de células com AC e AN} / \text{Total de células observadas} \times 100$$

A ocorrência de células portadoras de micronúcleos (MN) foi registrada para avaliar genotoxicidade e instabilidade cromossômica; estes eventos se não forem reparados pelas células podem gerar futuras mutações, a frequência de MN (FMN) foi calculada por meio da seguinte fórmula:

$$\text{FMN} = \text{Número total de células com MN} / \text{Total de células observadas} \times 100$$

Os testes Shapiro-Wilk e Levene foram empregados para avaliar a normalidade e a homogeneidade dos dados, respectivamente. Os dados não atenderam a estes pressupostos para realização de um teste paramétrico, então aplicou-se a transformação matemática usando raiz quadrada ($x+1$), no entanto, mesmo após a transformação dos dados, estes continuaram não atendendo os pressupostos para realização de um teste paramétrico. Assim, no presente

estudo para as análises de citogenotoxicidade foi empregado o teste não paramétrico de análise de variância de Kruskal-Wallis com pós-teste de Duun ($p < 0,05$).

4.3 Bioensaio com *Rhinocricus padbergi*

O solo utilizado como solo controle e para aplicação da amostra de vinhaça fitorremediada foi coletado no Campus da UNESP (Universidade Estadual Paulista) na cidade de Rio Claro, São Paulo, Brasil. A coleta foi realizada a uma profundidade de cerca de 0-20 cm, peneirado (4 mm), seco ao ar e posteriormente caracterizado.

A caracterização da amostra de solo natural foi realizada pelo Laboratório de Análises Ambientais São Lucas, Eurofins-ASL. Os parâmetros avaliados foram: matéria orgânica, carbono orgânico total, pH, concentração de potássio, capacidade de troca catiônica, condutividade elétrica e granulometria.

Após a coleta das amostras de vinhaça fitorremediada por 15 dias foi realizada a caracterização dos parâmetros físico-químicos relevantes da vinhaça para aplicação no solo como fertilizante e de metais pelo Laboratório de Análises Ambientais São Lucas, Eurofins-ASL. O detalhamento destes dados encontra-se em Marcato *et al.* (2019). No presente trabalho estes dados estão disponíveis na tabela 1, na seção resultados e discussão.

Espécimes adultos de *R. padbergi* com cerca de 6 cm de comprimento foram utilizados no presente estudo. Estes espécimes foram coletados no campus da UNESP, Rio Claro e previamente mantidos por 30 dias em terrários com solo proveniente do local de origem desses animais; como alimento foram disponibilizadas raízes em decomposição. Os animais foram mantidos em sala com temperatura controlada de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$, com fotoperíodo 12h:12h (luz:escuro).

Após as análises físico-químicas do solo e da vinhaça fitorremediada por 15 dias foram feitos cálculos da quantidade máxima permitida de aplicação de vinhaça no solo prevista na Norma P4.231 da CETESB Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2015).

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

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

Sendo: **0,05** = 5% da CTC do solo. **CTC** = Capacidade de Troca Catiônica, expressa em cmolc/dm^3 ; **Ks** = concentração de potássio no solo, expresso em cmolc/dm^3 , à profundidade de 0 a 0,80 metros; **3744** = constante para transformar os resultados da análise de fertilidade, expressos em cmolc/dm^3 ou meq/100cm^3 , para kg de potássio em um volume de 1 (um) hectare por 0,80 metros de profundidade; **185** = massa, em kg, de K_2O extraído pela

cultura por hectare, por corte; **kvi** = concentração de potássio na vinhaça, expressa em kg de K_2O /m³.

Valor médio de potássio das três amostras de vinhaça fitorremediadas por 15 dias provenientes do sistema híbrido foi de 1.069 mg. Sabendo que podemos assumir a conversão abaixo:

1 mg de K _____ 1,205 mg de K_2O

1.069 mg de K _____ x de K_2O

$X = 1.288,145 \text{ mg/L de } K_2O \text{ ou } 1,288145 \text{ kg/m}^3 \text{ de } K_2O = K_{vi}$.

$CTC = 5,34 \text{ cmolc/dm}^3$;

$K_s = 0,14 \text{ cmolc/dm}^3$;

3744 é uma constante;

e 185 é massa em kg de K_2O .

Resolvendo:

$m^3 \text{ vinhaça/ha} = [(0,05 \times 5,34 - 0,14) \times 3744 + 185] / 1,288145$

$m^3 \text{ vinhaça/ha} = [(0,267 - 0,14) \times 3744 + 185] / 1,288145$

$m^3 \text{ vinhaça/ha} = [0,127 \times 3744 + 185] / 1,288145$

$m^3 \text{ vinhaça/ha} = [475,488 + 185] / 1,288145$

$m^3 \text{ vinhaça/ha} = 660,488 / 1,288145$

$m^3 \text{ vinhaça/ha} = 512,7435188$

Conversões:

$1 \text{ m}^3 = 1000 \text{ dm}^3$, portanto, $512,7435188 \text{ m}^3 \text{ vinhaça/ha}$ é igual a $512.743 \text{ dm}^3 \text{ vinhaça/ha}$.

$512.743 \text{ _____ } 1 \text{ ha} \text{ _____ } 8 \times 10^6 \text{ dm}^3$

$X \text{ _____ } \text{dm}^3$

$8 \times 10^6 \cdot X = 512.743$

$X = 512.743 / 8 \times 10^6$

$X = 64.092,5 \times 10^6 \text{ dm}^3 = 0,060925 \text{ L}$.

Considerando novamente a área, o volume e a densidade dos terrários, temos:

$1 \text{ dm}^3 \text{ _____ } 0,0640925 \text{ L}$

$5,0625 \text{ dm}^3 \text{ _____ } X$

$X = 0,06409 \times 5,0625$

$X = 0,32446 \text{ L ou } 324,46 \text{ mL}$.

Este volume de 324,46 mL de vinhaça seria para uma coluna de solo de 10 cm, mas no presente estudo tínhamos uma coluna de solo de 6,5 cm, convertendo:

$$324,46 \text{ mL} \times \frac{6,5 \text{ cm}}{10 \text{ cm}}$$

$$X = 210,99 \text{ mL}$$

$$10 X = 2.108,99$$

$$X = 2.108,99 / 10$$

$$X = 210,89 \text{ mL em uma coluna de 6,5 cm de solo.}$$

O ensaio foi montado em três réplicas com os seguintes tratamentos: controle (solo controle + 20 diplópodos); 100% da dosagem máxima de vinhaça segunda a Norma P4.231 (solo controle $\pm$ 210,90 mL de vinhaça fitorremediada por 15 dias + 20 diplópodos) e 50% da dosagem máxima (solo controle $\pm$ 105,45 mL de vinhaça fitorremediada por 15 dias + 20 diplópodos).

4.3.1 Histologia para avaliação da toxicidade em diplópodos

Após o período de exposição (42 dias), três indivíduos de cada terrário foram anestesiados com éter e dissecados para a retirada do intestino médio. Os cortes do intestino médio foram fixados em solução Bouin aquoso e paraformaldeído 4% por 48 h. Após a fixação, o material foi colocado em solução tampão fosfato de sódio (PBS pH=7,4) durante 24 h e mantido em geladeira. O material foi desidratado em soluções de etanol 70, 80, 90 e 95%, durante 20 minutos cada banho. Posteriormente, o material foi processado seguindo rotina histológica para inclusão em resina. Os blocos foram seccionados com o auxílio de micrótomo Leica RM 2245; as secções foram hidratadas e recolhidas em lâminas. Após secagem, as lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris por 10 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos para a reação; em seguida foram coradas com eosina aquosa por 5 minutos e lavadas em água. Após secagem, as lâminas foram montadas em Entellan[®], para posterior análise.

A histologia do intestino médio foi qualitativamente descrita e as alterações histopatológicas foram analisadas semi quantitativamente para cada animal. Seguindo o protocolo estabelecido por Christofolletti *et al.* (2016), os danos celulares no intestino médio de cada um dos diplópodos avaliados foram classificados de acordo com o fator de importância histopatológica (w) como: mínima (1), moderada (2) e acentuada (3). Foram

atribuídos escores (*a*) de 0 a 6 para classificar a extensão de cada alteração histopatológica, estabelecendo como (0) sem alteração, (2) pouca alteração, (4) alteração moderada e (6) alteração grave; valores intermediários a esses também podem ser atribuídos. Logo, para cada indivíduo foi possível o cálculo de dano das diferentes alterações seguindo a fórmula abaixo:

$$I (\text{indivíduo}) = a (\text{score recebido}) \times w (\text{fator de importância})$$

Os testes Shapiro-Wilk e Levene foram empregados para avaliar a normalidade e a homogeneidade dos dados, respectivamente. Após a verificação de que os dados atendiam os pressupostos de normalidade e de homogeneidade de variâncias realizou-se o teste paramétrico ANOVA (*Analysis of Variance*) um critério, seguido dos pós teste de Dunnett para comparação dos grupos tratados com o controle negativo ($p < 0,05$).

4.4 Bioensaio com *F. candida* para análise de ecotoxicidade

Os testes de comportamento de fuga e reprodução com colêmbolos foram realizados no Laboratório de Ecologia e Ecotoxicologia de Solo do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra (Portugal).

Espécimes do colêmbolo *F. candida* com 10 a 12 dias de vida, foram mantidos em laboratório a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo 12 horas claro/12 horas escuro.

Somente na realização destes bioensaios foi utilizada uma amostra de vinhaça de cana-de-açúcar bruta, ou seja, sem nenhum tipo de tratamento; a amostra foi coletada na usina e armazenada a 4°C até a montagem dos bioensaios. A caracterização físico-química da amostra de vinhaça de cana-de-açúcar bruta encontra-se na tabela 1, na seção resultados e discussão.

O solo utilizado nos testes de fuga e reprodução foi o solo artificial tropical 10% (SAT), preparado em laboratório de acordo com protocolo proposto para tais testes. A mistura foi composta de 10% de fibra de coco, 20% de caulino em pó e 70% de areia fina (OECD, 1984) Após o preparo da quantidade total de solo necessária para os dois ensaios mediu-se o valor do pH do solo utilizando solução de KCl 1M na seguinte proporção: peso da amostra de solo/volume de solução KCl 1 M (1:5). Após a obtenção do valor de pH do SAT, fez-se necessária a construção de uma curva de valores de pH do SAT com adição de diferentes porcentagens de carbonato de cálcio (CaCO_3) para corrigir o pH e encontrar dessa forma a quantidade necessária de CaCO_3 para deixar o valor do pH do SAT em $6 \pm 0,5$, valor recomendado pela ISO. Neste caso foi utilizada uma porcentagem de 0,05% de CaCO_3 para correção do pH do SAT até o valor recomendado.

A avaliação da capacidade máxima de retenção de água do solo, *water holding capacity* (WHC) do solo foi obtida de acordo com a ISO 11268-2:1998, onde o tubo e o papel filtro recomendados nessa norma foram substituídos por cadinhos com pedra porosa de porosidade 1 (100-160 μm).

O SAT do presente estudo apresentou um valor de WHC de 70,8% e de acordo com a ISO nos testes com espécies padronizadas de invertebrados de solo deve-se utilizar um valor de 40-60% da WHC do solo. Neste estudo a porcentagem empregada no teste de comportamento de fuga e reprodução foi a de 60% da WHC que representa 42,48% ou 42,48g de água a cada 100g de solo.

As diluições de vinhaça bruta e fitorremediada para cada uma das sete doses testadas (1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 60%) foram obtidas a partir da combinação de diferentes proporções de água (%) e amostras de vinhaça (%) de modo a atingir os 60% da WHC.

O teste de fuga com *F. candida* foi realizado de acordo com os procedimentos descritos no ISO 17512-2 (ISO, 2011). No teste com colêmbolos foram empregados potes plásticos opacos para evitar a incidência de luz direta (9 cm de diâmetro e 6 cm de altura), com 30g de solo tratado em um compartimento e do outro lado foi adicionada a mesma quantidade de solo controle. As divisórias plásticas foram removidas após a adição das amostras de solo em cada compartimento, e então 20 colêmbolos com idade entre 10-12 dias (originados de culturas sincronizadas), foram colocados na linha central entre os dois compartimentos. Os animais não foram alimentados durante o ensaio. Após 48h, o conteúdo de cada compartimento foi cuidadosamente transferido para outro recipiente e submerso em água. Gotas de corante azul foram adicionadas a mistura de solo e água para aumentar o contraste entre os colêmbolos flutuantes e superfície do meio. Posteriormente, os colêmbolos flutuantes (adultos sobreviventes) foram contabilizados. O ensaio foi realizado em cinco réplicas

O teste de reprodução com *F. candida* seguiu os procedimentos descritos pelo ISO11267 (ISO, 1999). Recipientes cilíndricos de vidro foram preenchidos com 30g de solo tratado com as diferentes diluições das amostras de vinhaça ou com solo controle. Dez colêmbolos com idade entre 10-12 dias (originados de culturas sincronizadas), foram colocados em cada unidade experimental, logo, os recipientes foram fechados totalmente. Cinco réplicas foram feitas para cada tratamento. Após 14 dias do início do teste, a cada réplica foi adicionado aproximadamente 2 mg fermento biológico seco, como alimento. Os recipientes foram abertos semanalmente, para permitir a troca de gases. Ao final de 28 dias, cada réplica de solo foi submersa em água, para favorecer a flutuação dos indivíduos. Gotas

de corante azul foram adicionadas a mistura de solo com água para aumentar o contraste e facilitar a contagem dos adultos e juvenis (flutuantes). As réplicas foram então fotografadas como descrito por Alves *et al.* (2014). Os indivíduos foram contabilizados por meio das imagens digitais usando o software Image J.

Os testes Shapiro-Wilk e Levene foram empregados para avaliar a normalidade e a homogeneidade dos dados do teste de reprodução, respectivamente. Após a verificação de que os dados atendiam os pressupostos de normalidade e de homogeneidade de variâncias realizou-se o teste paramétrico ANOVA (*Analysis of Variance*) um critério, seguido dos pós-teste de Dunnett para comparação dos grupos tratados com o controle negativo ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises físico-químicas

Os resultados da caracterização físico-química da vinhaça fitorremediada por 15 dias demonstraram que o sistema de tratamento proposto foi capaz de reduzir componentes reconhecidamente tóxicos, tais como altos valores de DBO e DQO, sólidos suspensos totais e de macro e micronutrientes (Tabela 1), conforme demonstrado pelos por Marcato *et al.* (2019); no estudo citado também é possível encontrar maiores detalhes das propriedades físico-químicas da amostra original de vinhaça e de suas variações ao longo das diferentes etapas que constituíram o sistema híbrido de tratamento, assim como uma discussão mais detalhada.

Para o ensaio da avaliação de ecotoxicidade com colêmbolos foi adicionada uma amostra de vinhaça bruta além da amostra de vinhaça fitorremediada; o objetivo da adição da amostra de vinhaça bruta foi ter uma vinhaça controle com as características físico-químicas típicas normalmente encontradas nesse resíduo (Tabela 1), para então, ao final do ensaio, ser possível fazer uma comparação entre a amostra fitorremediada e uma amostra bruta utilizada como controle.

Tabela 1- Caracterização dos parâmetros físico-químicos relevantes da vinhaça para aplicações no solo como fertilizante e de metais.

Parâmetros	Vinhaça Fitorremediada 15 dias¹	Vinhaça Bruta²
Fósforo total (mg/L)	13,94±1,23	–
Nitrato (mg/L)	3,19±1,69	–
Nitrito (mg/L)	0,16±0,07	–
Nitrogênio Amoniacal (mg/L)	0,47±0,41	5,39
Nitrogênio Total (mg/L)	21,87±3,49	233
pH	7,99±0,28	4,32
Sólidos totais suspensos (mg/L)	218,67±89,63	2.600
Cálcio (mg/L)	226±20,42	576
Potássio (mg/L)	1.069±79,57	1727
Sódio (mg/L)	41,77±1,2	<1,0
Sulfato (mg/L)	<10,00	1903
DBO	675±138,87	11.635
DQO	3.077,67±248,57	28.220
Condutividade eletrolítica (µS/cm)	3.828,33±41,10	10.970
Dureza calculada (mg CaCO ₃ /L)	1.217,57±111	1.381
Arsênio (mg/L)	0,05±0,06	<0,005
Bário (mg/L)	0,19±0,04	0,169
Cádmio (mg/L)	<0,001	<0,001
Cobre (mg/L)	0,01±0,01	0,088
Cromo (mg/L)	0,01±0	0,016
Mercúrio (mg/L)	<0,0002	<0,0002
Molibdênio (mg/L)	<0,005	0,01
Níquel (mg/L)	0,022±0,02	0,016
Chumbo (mg/L)	<0,005	<0,005
Selênio (mg/L)	<0,005	<0,005
Zinco (mg/L)	0,05±0,06	0,225

¹ Média ± desvio padrão da caracterização dos parâmetros físico-químicos relevantes da vinhaça para aplicações no solo como fertilizante e de metais, adaptado de Marcato *et al.* (2019);

² Amostra de vinhaça bruta utilizada apenas nos ensaios de ecotoxicidade com colêmbolos;

- Dados não quantificados.

5.2 Fitotoxicidade em *Allium cepa*

As diluições de 2,5% e 10% de vinhaça de cana-de-açúcar fitorremediada por 15 dias aumentaram a taxa de germinação e a velocidade de germinação, sendo os valores estatisticamente significativos em comparação ao controle negativo. Já o controle positivo conforme esperado teve efeito contrário. As duas maiores diluições, 40% e 80%, diminuíram o crescimento de raiz de modo estatisticamente significativo, conforme apresentado na tabela 2.

A germinação de sementes é um processo fisiológico e bioquímico que pode ser afetado por diversos fatores ambientais (BHARAGAVA; CHANDRA, 2010). A germinação é considerada um parâmetro para avaliação de efeito letal, tendo em vista que a inibição ou diminuição da germinação dos grupos tratados ao final do ensaio em comparação com o controle deve-se ao fato da morte do embrião (SOBREIRO; RONCO, 2004).

No presente trabalho, observou-se que as diluições da vinhaça fitorremediada testadas não inibiram ou diminuíram a germinação de modo significativo, resultado diferente dos já descritos na literatura para amostras de vinhaça bruta e diluídas em água (v/v). Garcia *et al.* (2017) avaliaram a toxicidade e genotoxicidade de diluições de vinhaça de cana-de-açúcar e de laranja bruta em *A. cepa*. Os resultados de germinação demonstraram que as diluições maiores que 5% foram tóxicas, por inibirem totalmente a germinação. Ramana *et al.* (2002) avaliaram a germinação de sementes de diferentes espécies expostas a de vinhaça diluída em água destilada (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50%, 75% e 100%) e observaram que as diluições acima de 50% inibiram a germinação das espécies.

De acordo com Chowdhary; Raj; Bharagava (2018) a inibição da germinação pode estar relacionada a alta taxa de sais e sólidos suspensos totais presentes na vinhaça bruta. No presente estudo conforme pode ser observado na tabela de caracterização físico-química, pode-se observar valores de sulfato ($<10,00$ mg/L) e de sólidos suspensos totais ($218,67 \pm 89,63$) (TABELA 1), menores do que os valores geralmente encontrados para estes parâmetros em amostras de vinhaça bruta (CHOWDHARY; RAJ; BHARAGAVA, 2018; FUESS; GARCIA, 2014; REIS; RU, 2017).

O índice de velocidade de germinação (IVG) é um outro parâmetro para avaliação de fitotoxicidade de diferentes substâncias (GARCIA *et al.*, 2019; LUTTERBECK *et al.*, 2015; PALMIERI *et al.*, 2014). No presente estudo pode-se observar que não houve inibição da velocidade de germinação em relação ao controle negativo; pelo contrário, duas das menores diluições aumentaram a velocidade de germinação sendo este dado estatisticamente significativo. Infere-se então que os resultados aqui encontrados para a velocidade de

germinação devem também estar relacionados à diminuição de parâmetros reconhecidamente tóxicos para sementes presentes em amostras brutas de vinhaça e que aparecem reduzidos na amostra de vinhaça fitorremediada.

O estímulo da taxa e da velocidade de germinação no presente estudo pode também estar relacionado a presença de matéria orgânica na amostra, que embora também esteja presente em amostras brutas podem ter seu efeito de estímulo reduzido com a interação entres os diferentes componentes, uma vez que a vinhaça é uma amostra complexa.

O crescimento de raiz é capaz de evidenciar efeito subletal de diferentes efluentes e resíduos industriais (AGUIAR; ANDRADE-VIEIRA; DAVID, 2016; CHARLES *et al.* 2011; YOUNG *et al.*, 2012). No presente estudo houve uma redução no crescimento de raiz nas maiores diluições. Garcia *et al.* (2019) também observaram inibição significativa do crescimento de raiz de cebola nas maiores diluições testadas (40%, 80% e 100% v/v) de vinhaça de laranja aplicada em solo.

Tabela 2- Média e desvio padrão da taxa de germinação, do índice de velocidade de germinação de sementes e do crescimento de raiz de cebola após a exposição a diferentes diluições de vinhaça de cana-de-açúcar fitorremediada por 15 dias.

Tratamentos	Parâmetros		
	Germinação (%)	IVG	Crescimento de raiz
CN (água destilada)	58±7,67	2,51±0,75	16,90±0,81
CP (ZnSO ₄ 7H ₂ O)	12,66±3,65*	0,14±0,09	-
2,5%	75,33±13,03*	4,31±1,11*	19±1,32
5%	73,33±8,81	3,41±0,37	17,40±1,80
10%	77,33±7,22*	3,86±0,20*	17,60±1,43
20%	66±15,70	3,37±0,60	17,1±1,05
40%	70,66±9,83	3,32±0,51	14±0,54*
80%	70,66±7,22	3,33±0,40	13,5±2,77*

CN: Controle negativo; CP: Controle positivo; 2,5, 5, 10, 20, 40 e 80%: diluições das vinhaças; IVG: Índice de velocidade de germinação. - sem dados mensuráveis.

*Estatisticamente maior em comparação ao controle negativo; ** Estatisticamente menor em comparação ao controle negativo ANOVA/Dunnett (p<0,05).

5.3 Citogenotoxicidade em *A. cepa*

Apenas a diluição de 50% de vinhaça fitorremediada foi capaz de reduzir o índice mitótico de maneira estatisticamente significativa. No entanto, tanto a amostra de vinhaça

fitorremediada sem diluição (100%) como a sua diluição de 50% induziram genotoxicidade e aumento na frequência de micronúcleos estatisticamente significativo (Tabela 3).

O índice mitótico (IM) é um parâmetro que tem sido amplamente utilizado para avaliar a citotoxicidade de diferentes substâncias (de SOUZA *et al.*, 2016, SILVEIRA *et al.*, 2017); por definição o IM representa o número de células que estão em processo de divisão celular e interfere diretamente no crescimento de determinado órgão após o término de sucessivas divisões celulares (ARAGÃO *et al.*, 2015; HARASHIMA; SCHNITTGER, 2010). Dessa forma, a diminuição do IM pela diluição de vinhaça fitorremediada (50%) no presente estudo está relacionado com a diminuição do crescimento de raiz por diluições relativamente próximas (40 e 80%) observado no teste para avaliação da fitotoxicidade conforme já apresentados neste estudo (Tabela 2).

A genotoxicidade induzida pela vinhaça fitorremediada em 50% e sem diluição (100%) no presente estudo parece estar relacionada a efeitos aneugênicos, ou seja, o resíduo pode alterar de alguma forma as fibras do fuso mitótico, pois, metáfases com aderência cromossômica foi a aberração cromossômica mais encontrada nas células de raízes expostas nas duas doses testadas; a alteração nuclear observada em maior número foi broto; a indução de micronúcleos (MN) também ficou bastante evidente.

As metáfases com aderências cromossômicas são caracterizadas pelo alto nível de condensação do DNA devido à ação de agentes tóxicos na estrutura do DNA ou nas proteínas a ele associadas (EL-GHAMERY *et al.*, 2003). Este tipo de aberração cromossômica é um indicativo de ação tóxica no DNA e, provavelmente, pode resultar em futuras quebras no material genético (AGUIAR; ANDRADE-VIEIRA; DAVID, 2016; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009).

Tendo em vista que foi observada a indução de micronúcleos infere-se que estes podem ter sido também induzidos por ação aneugênica, pois de acordo com Fernandes; Mazzeo e Marin-Morales (2007, 2009) e Kirsch-Volders *et al.* (2011), dois dos três mecanismos de formação dos micronúcleos têm relação com disfunção nas fibras do fuso, os MN formados a partir da perda de um cromossomo inteiro (aneuploidia) ou ainda resultantes da eliminação do excesso de material genético causado por poliploidização. E os brotos observados no presente estudo podem ser os precursores dos MNs conforme inferido por Fernandes; Mazzeo; Marin-Morales (2007).

Outros estudos já avaliaram os efeitos da vinhaça de cana-de-açúcar no DNA de *A. cepa* (GARCIA *et al.*, 2017; PEDRO-ESCHER *et al.*, 2016) e *Tradescantia pallida* (PEDRO-ESCHER; MAZIVIERO; FONTANETTI, 2014). O efeito genotóxico causado pela vinhaça

de cana-de-açúcar também foi observado nos estudos citados, confirmados pela presença de diferentes aberrações cromossômicas, brotos e micronúcleos. Embora a vinhaça seja uma mistura complexa, os autores relacionaram os efeitos genotóxicos encontrados, principalmente à presença de metais nas amostras.

Tabela 3- Média e desvio padrão das porcentagens de germinação, do índice mitótico (IM), do índice de genotoxicidade (IGen) e da frequência de micronúcleos (FMN) de sementes e células meristemáticas de raiz de cebola após a exposição a amostras de vinhaça de cana-de-açúcar fitorremediada por 15 dias.

Tratamentos	Parâmetros			
	Germinação	IM	IGen	FMN
CN (água destilada)	70±8,92	15,69±3,14	0,13±0,18	0,21±0,41
CP (MMS)	74,76±2,97	15,74±2,96	0,81±0,59*	2,67±1,12*
100%	78,09±7,86	15,19±4,15	0,86±0,43*	0,71±0,70*
50%	80,47±7,86	13,49±2,90*	0,63±0,34*	0,38±0,46*

CN: Controle negativo; **CP:** Controle positivo; MMS (metil metano sulfonato); 100% vinhaça fitorremediada por 15 dias sem diluição e 50% diluída em água destilada 1:1 (v:v).

* Estatisticamente significativo em comparação ao controle negativo ($p < 0,05$), por meio do teste de Kruskal-Wallis/Dunn.

5.4 Toxicidade em diplópodos

Os animais do grupo controle apresentaram um padrão histológico típico do intestino médio (Fig 1A, B) conforme descrito para a espécie *R. padbergi* por Fantazzini; Fontanetti e Camargo-Mathias (2002). O intestino médio é constituído por um epitélio pseudoestratificado com os núcleos das células localizados na porção mediana. O epitélio é composto por células absorptivas, secretoras e regenerativas. As células absorptivas compõem a maior parte do epitélio e as regenerativas se localizam na região basal. Observa-se um bordo em escova bem definido voltado para o lúmen; nesta região a presença de uma membrana peritrófica é evidente. O epitélio se apoia em uma espessa membrana basal e em seguida, observa-se uma camada muscular contínua. Logo abaixo estão presentes as células hepáticas, que possuem formato irregular, núcleos esféricos, com presença de grânulos no citoplasma.

Em todos os grupos expostos foram observadas alterações histológicas no intestino médio dos animais. No epitélio foram observadas as seguintes alterações: aumento na taxa de renovação epitelial (Figuras 1C), dilatação do espaço intercelular (Figura 1C) e desorganização epitelial (Figura 1 C, F). Nas células hepáticas foi observado: degradação da célula (Figura 1C, F) e aumento na presença de grânulos citoplasmáticos (Figura 1E).

A análise estatística demonstrou que o aumento na taxa de renovação nos indivíduos expostos a amostra de vinhaça fitorremediada diluída a 50% foi significativo; neste grupo também foi estatisticamente significativo o aumento da presença de grânulos nas células hepáticas. Os indivíduos expostos a amostra sem diluição (100%) apresentaram degradação das células hepáticas de maneira estatisticamente significativa (Tabela 4).

Os diplópodos são animais saprófagos, cosmopolitas, que colonizam diferentes camadas de solo, participando do processo de formação do mesmo, constantemente revolvendo-o; durante este processo, ingerem boa parte do, passando este conteúdo por seu trato digestivo. Uma vez que esses animais mantêm íntimo contato com o solo e os resíduos ali presentes, a utilização destes, juntamente com a análise histopatológica de seu intestino médio, local onde ocorre a digestão desses animais, fornecem uma análise importante sobre os impactos que a vinhaça, ou outros resíduos e substâncias, podem promover no solo ou nos organismos ali presentes.

No presente estudo, foi observada a dilatação dos espaços intercelulares entre as células epiteliais em diferentes organismos; embora esta alteração não tenha se mostrado estatisticamente significativa, ela indica perda de adesão celular, caso haja a formação, bem como a ampliação dos espaços intercelulares, isso pode refletir em efeitos iniciais de processo de morte celular, uma vez que os complexos funcionais de adesão foram rompidos permitindo a formação destes espaços e consequente separação das células (STEINLY; BEREBAUM, 1985; REY *et al.*, 1999). Este processo reflete em um processo de renovação celular, comum nos epitélios de revestimento, como o observado aqui nos animais do grupo controle (Tabela 4).

A renovação celular indica que ocorreu uma lesão tecidual, onde ocorre a substituição de células com a finalidade de manter a integridade e funcionalidade do epitélio; este é um processo ocorre fisiológico normal, devido ao crescimento e divisão de células regenerativas (HOPKIN, READ, 1992). Porém, o aumento na taxa de renovação epitelial, como foi observado no presente estudo nos animais expostos a vinhaça fitorremediada diluída a 50% (Tabela 4), indica a indução de uma injúria ao epitélio, bem como uma tentativa de eliminação de qualquer composto que esteja causando tal injúria; as células epiteliais expostas a diferentes contaminantes estão sujeitas a alterações que podem levar à morte, representando uma alternativa do organismo do animal em compensar o dano sofrido após a ingestão de solo contaminado (SOUZA; FONTANETTI, 2011).

Este tipo de resposta foi observado também por outros autores em estudos utilizando diplópodos expostos a diferentes substratos impactados como lodos de esgoto de diferentes

origens (doméstico e industrial) (NOGAROL; FONTANETTI, 2010; GODOY; FONTANETTI, 2010; BOZZATTO; FONTANETTI, 2012; CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2016) e solo com adição do herbicida trifluralina (MERLINI *et al.*, 2012).

As células hepáticas atuam ativamente na desintoxicação do organismo quando este é prejudicado por toxicantes (KÖHLER, 2002). Na tentativa de manter a homeostase e o equilíbrio iônico do organismo, estas células absorvem metais e demais substâncias. A degradação destas células observada no presente estudo sinaliza a reação destas frente à exposição à vinhaça. Associada a esse fato está também o aumento dos grânulos citoplasmáticos observado nestas células no grupo exposto a vinhaça fitorremediada diluída a 50%; provavelmente, estas células desempenharam sua função até que a concentração da vinhaça excedesse o limite de desintoxicação das células hepáticas, levando-as a falência nos animais do grupo exposto a vinhaça sem diluição.

Observações semelhantes foram feitas por Godoy e Fontanetti (2010), Nogarol e Fontanetti (2010) e Perez e Fontanetti (2011) em diplópodos expostos a lodo de esgoto e por Merlini *et al.* (2012) em animais expostos ao herbicida trifluralina. Outros estudos apontam a reação das células hepáticas frente a agentes contaminantes, o que sugere uma resposta do tecido, perante aos agentes estressores, mediando e defendendo as células (FONTANETTI *et al.*, 2006).

Diante do observado pode-se sugerir que a fitorremediação não foi totalmente suficiente na eliminação dos compostos tóxicos da vinhaça quando utilizada em solo, uma vez que foram observadas alterações importantes no intestino médio destes bioindicadores terrestres, que comprometeriam o desempenho do órgão responsável pela digestão destes animais. Em contrapartida, Marcato (2019) observou uma sensível melhora no potencial tóxico em exposição em meio aquático, em estudos realizados em tilápias (*Oreochromis niloticus*).

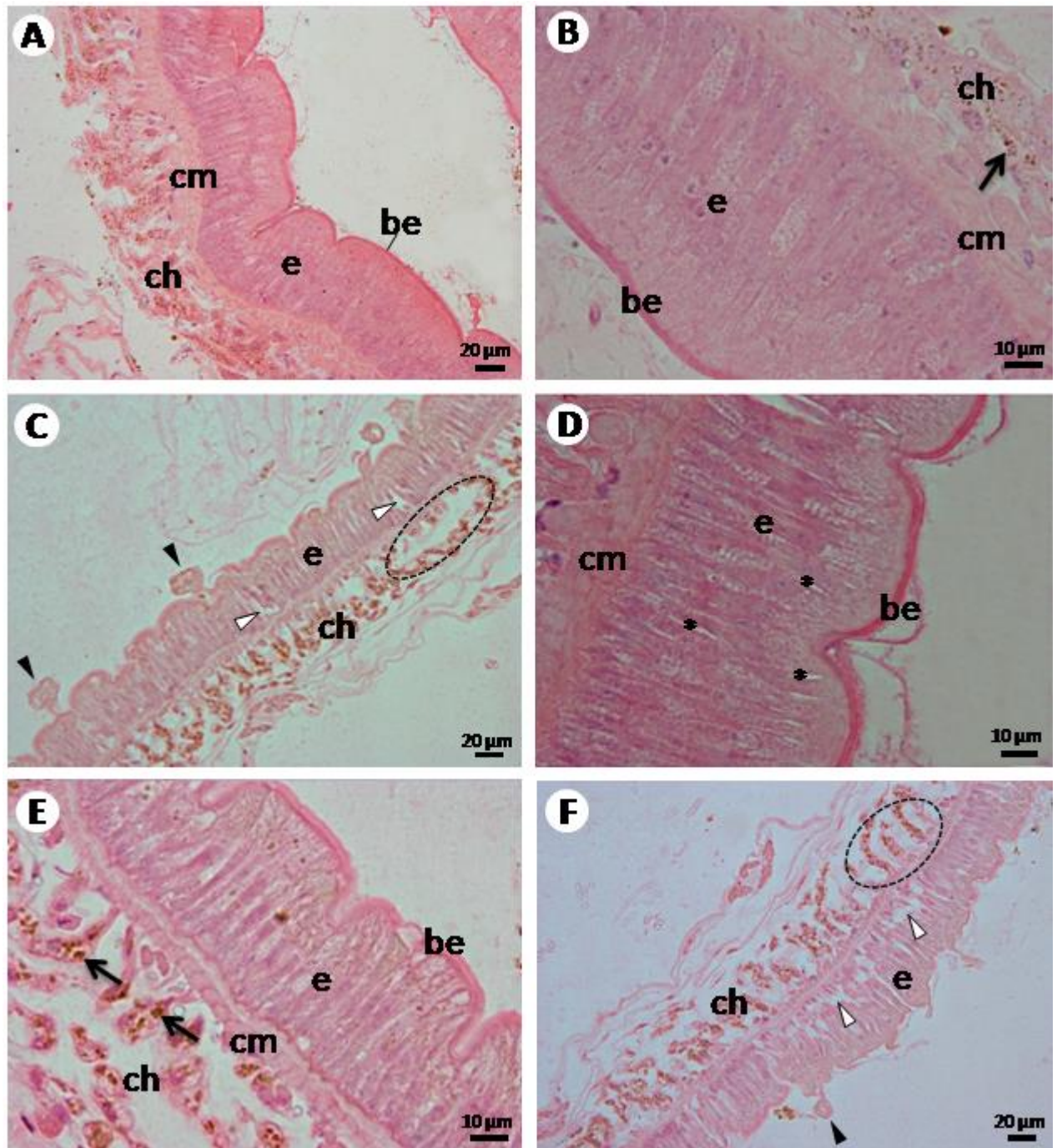


Figura 1. Padrão histológico do intestino médio do diplópodo *Rhinocricus padbergi* e alterações histopatológicas observadas em indivíduos expostos a vinhaça fitorremediada. A-B. Grupo controle. C-D. Animais expostos a vinhaça fitorremediada sem diluição. E-F. Animais expostos a vinhaça fitorremediada diluída a 50%.

be: bordo em escova; cm: camada muscular; ch: célula hepática; e: epitélio; cabeça de seta preta: renovação epitelial; cabeça de seta branca: desorganização epitelial; *: dilatação do espaço intercelular no epitélio; seta: grânulos citoplasmáticos; destaque pontilhado: degradação de célula hepática.

Tabela 4- Média e desvio padrão de alterações histopatológicas observadas no intestino médio do diplopóda (*Rhinocricus padbergi*) expostos a vinhaça fitorremediada por 42 dias.

Alterações histopatológicas	Tratamentos		
	GC	100%	50%
Renovação epitelial	1,87±0,64	3,14±1,34	3,66±1,5*
Desorganização epitelial	0,62±1,18	1,57±1,98	3±2,36
Dilatação do espaço intercelular epitélio	1,5±1,69	1,28±1,88	0
Acúmulo de grânulos células hepáticas	1,75±2,49	4,57±2,5	6,33±1,5*
Degeneração células hepáticas	0	3,85±5,11*	0

GC: Grupo Controle; 100 e 50% doses de vinhaça fitorremediada testadas de acordo com a norma P4.231 da CETESB;

*Estatisticamente significativo em comparação ao grupo controle negativo ANOVA/Dunnett ($p < 0,05$).

5.5 Ecotoxicidade em colêmbolos

Para o teste de comportamento de fuga os animais se distribuíram de maneira uniforme no controle duplo, com valor de $p=0,4393$ para o teste exato de Fisher bilateral (Two-tailed). Os organismos não apresentaram comportamento de fuga nos solos misturados com as amostras de vinhaça bruta e fitorremediada, pelo contrário, ficou evidenciada uma preferência dos animais pelo solo oferecido, resultado evidenciado pela maioria dos valores das médias do cálculo da porcentagem de comportamento de fuga serem negativos, conforme mostra a figura 2.

As diluições de vinhaça bruta 30 e 40% do WHC reduziram a reprodução de modo estatisticamente significativo e a maior diluição (60%) causou a mortalidade de todos os adultos. Por outro lado, as diluições de 20 e 30% de vinhaça fitorremediada aumentaram o número de juvenis significativamente (Figura 3).

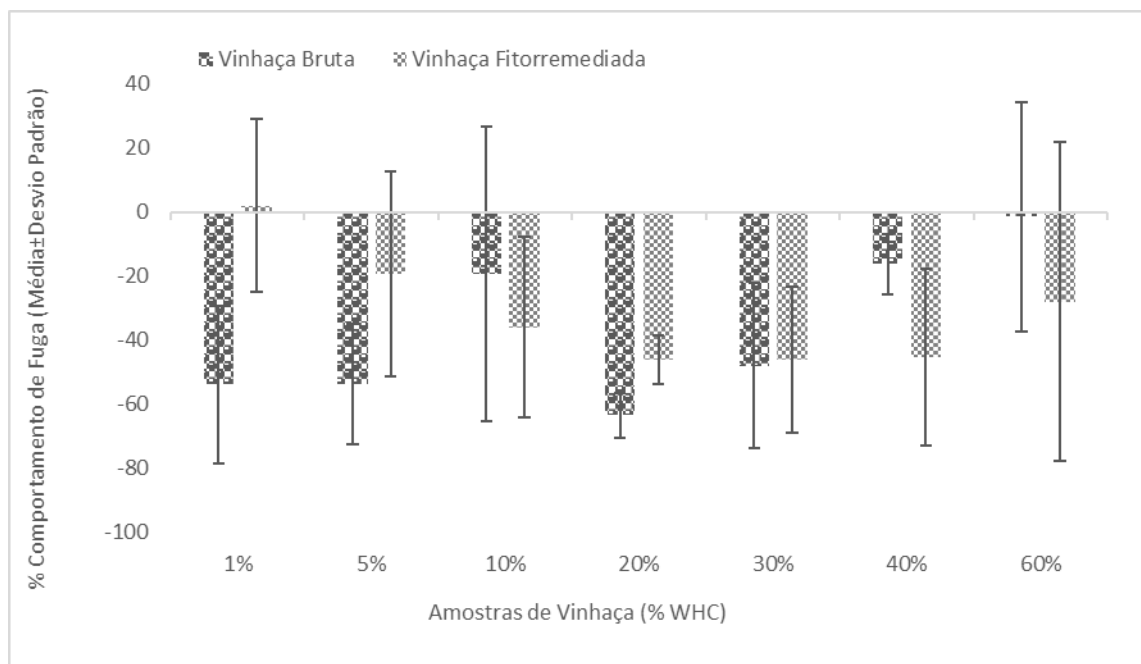


Figura 2. Resposta do teste de comportamento de fuga (média $\pm$ desvio padrão) de colêmbolos (*Folsomia candida*) expostos a diferentes diluições de vinhaça bruta e fitorremediada.

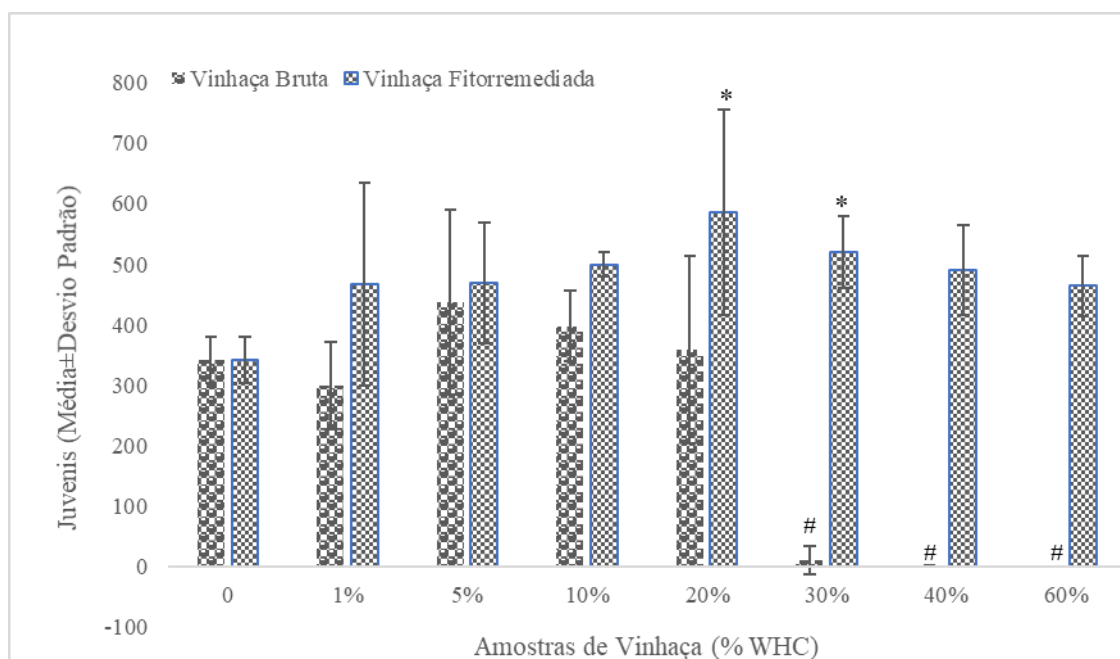


Figura 3. Reprodução (barras: média (média $\pm$ desvio padrão) de colêmbolos (*Folsomia candida*) expostos a diferentes diluições de vinhaça bruta e fitorremediada. * Número de juvenis significativamente maior que o controle; # número de juvenis significativamente menor que o controle ANOVA/Dunnett ($p > 0,05$).

No presente estudo foi observado que no teste de comportamento de fuga houve preferência dos animais pelo solo tratado com as amostras de vinhaça bruta e fitorremediada (valores negativos, figura 2), provavelmente, isso se deve ao fato da grande presença de matéria orgânica presente na vinhaça. Essa preferência pelo solo tratado com alta presença de

matéria orgânica foi discutido por Natal-da-Luz *et al.* (2008) em estudo da ecotoxicidade de amostras de lodo de esgoto em *F. candida*; de acordo com o autores, a alta presença de matéria orgânica pode mascarar o efeito tóxico do lodo de esgoto, pois a matéria orgânica é responsável por atrair os animais para o solo tratado; os autores comentam ainda que testes de reprodução empregando estas mesmas amostras poderiam evidenciar a toxicidade do lodo de esgoto.

No presente trabalho, no teste de reprodução a vinhaça bruta claramente diminuiu a reprodução dos animais e a maior dose testada (60% WHC do solo) causou mortalidade dos adultos. Desta forma, os resultados do presente estudo do teste de reprodução com colêmbolos corroboram com a inferência feita acima por Natal-da-Luz *et al.* (2008). Por outro lado, nos grupos expostos as diluições da vinhaça fitorremediada houve um estímulo da reprodução, provavelmente induzido também pela presença de matéria orgânica e pela minimização realizada pelo processo de fitorremediação de outros parâmetros físico-químicos reconhecidamente tóxicos.

Em ensaios realizados com espécies padronizadas de invertebrados terrestres expostas às amostras de vinhaças de diferentes origens, duas amostras provenientes de destilaria (VA e VB) e uma produzida em laboratório (VC) aplicadas em três tipos de solo diferentes, latossolo vermelho (LV), latossolo vermelho-amarelo (LVA) e solo artificial tropical (SAT) (ALVES *et al.*, 2015). Os resultados do teste de comportamento para os colêmbolos demonstraram que os animais evitaram os latossolos (LV e LVA) na maior concentração testada das amostras de vinhaça provenientes das destilarias (VA e VB), enquanto no SAT os animais evitaram somente a VB em sua maior concentração. Para o teste de reprodução, os autores observaram diminuição da reprodução apenas no latossolo vermelho tratado com as amostras de vinhaça VA e VB na maior concentração. Para o latossolo LVA e SAT somente a maior concentração da vinhaça B apresentou efeito na diminuição da reprodução.

Diante do exposto, pode-se inferir que a vinhaça fitorremediada é menos tóxica, pois a amostra bruta testada no presente trabalho diminuiu a reprodução em SAT e nos resultados obtidos com a amostra bruta proveniente da destilaria B em SAT no estudo realizado por Alves *et al.* (2015) o comportamento de fuga e a diminuição da reprodução foram observados na maior concentração testada.

6 CONCLUSÃO

Por meio do presente estudo pode-se concluir:

- A vinhaça fitorremediada não apresentou efeito letal sob as sementes de *A. cepa*, pois nenhuma das diluições testadas inibiram a germinação. No entanto, as maiores doses testadas (40 e 80%) no ensaio de fitotoxicidade tiveram um efeito de toxicidade subletal, uma vez que diminuiu o crescimento de raiz.
- A vinhaça fitorremediada não reduziu os valores de índice mitótico, indicando assim que não foi citotóxica para as células meristemáticas das raízes de *A. cepa*. Entretanto, a vinhaça foi genotóxica, tendo em vista que induziu a formação de aberrações cromossômicas e alterações nucleares.
- Nos diplópodos (*Rhinocricus padbergi*) a vinhaça fitorremediada foi tóxica, pois induziu alterações histopatológicas no intestino médio desses animais.
- Os colêmbolos (*F. candida*) não evitaram o solo tratado com as diferentes doses de vinhaça fitorremediada e bruta. No teste de reprodução a vinhaça fitorremediada não apresentou efeito negativo, mas duas doses de vinhaça bruta reduziram o número de juvenis significativamente e a maior dose testada de vinhaça bruta causou a mortalidade de todos os indivíduos adultos.
- Por fim, destaca-se que embora a vinhaça fitorremediada seja menos tóxica diante da comparação dos resultados aqui obtidos com os dados dos efeitos de vinhaça bruta já descritos na literatura, é possível perceber que a amostra fitorremediada ainda apresentou efeitos tóxicos nos níveis biológicos mais basais (celular e tecidual) nos organismos *A. cepa* e *R. padbergi*. No entanto, Marcato (2019) avaliou a toxicidade em peixes da mesma amostra de vinhaça fitorremediada e não constatou alterações histopatológicas significativas nos órgãos alvos estudados (brânquias e fígado).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L. L.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; DAVID, J. A. O. Evaluation of the toxic potential of coffee wastewater on seeds, roots and meristematic cells of *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.133, p. 366–372, 2016.

ALVES, P. R. L.; CARDOSO, E. J. B. N. Overview of the standard methods for soil ecotoxicology testing. In: LARRAMENDY, M; SOLONESKI, S (Ed.). **Invertebrates: Experimental Models in Toxicity Screening**. Croatia: InTech, 2016. p. 35-56.

ALVES, P. R. L.; CARDOSO, E. J. B. N.; MARTINES, A. M.; SOUSA, J. P.; PASINI, A. Seed dressing pesticides on springtails in two ecotoxicological laboratory tests. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 105, p. 65–71, 2014.

ALVES, P. R. L.; NATAL-DA-LUZ, T.; SOUSA, J. P.; CARDOSO, E. J. B. N. Ecotoxicological characterization of sugarcane vinasses when applied to tropical soils. **Science of the Total Environment**, v.526, p. 222-232, 2015.

ARAGÃO, F.B.; ANDRADE-VIEIRA, L.F.; FERREIRA, A.; COSTA, A.V.; QUEIROZ, V.T.; PINHEIRO, P.F. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on *Lactuca sativa* L. **Allelopathy Journal**, vol. 35, pp. 259–272. 2015

BHAT, S. A. G.; CUI, F. L; VIG, A. PAL. Biomonitoring of genotoxicity of industrial wastes using plant bioassays. **Bioresource Technology Reports**, v. 6, p. 207–216, 2019.

BONCIU, E.; FIRBAS, P.; FONTANETTI, C. S.; WUSHENG, J.; KARAISSMAILIĞLU, M. C.; LIU, D.; MENICUCCI, F.; PESNYA, D. S.; POPESCU, A.; ROMANOVSKY, A. V.; SCHIFF, S.; ŚLUSARCZYK, J.; DE SOUZA, C. P.; SRIVASTAVA, A.; SUTAN, A.; PAPINI, A. An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. **Caryologia**, 71, p. 191-209, 2018.

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

BOWIE, M. H.; STOKVIS, E.; BARBER, K.; MARRIS, J.; HODGE, SIMON. Identification of potential invertebrate bioindicators of restoration trajectory at a quarry site in Hunua, Auckland, New Zealand. **New Zealand Journal of Ecology**, v. 43, p.1-11, 2019.

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.

BUCH, A. C.; SISINNO, C. L. S.; CORREIA, M. E. F.; SILVA-FILHO, E. V. Food preference and ecotoxicological tests with millipedes in litter contaminated with mercury. **Science of the Total Environment**, v. 633, p. 1173-1182. 2018.

BUENO-VILLEGAS, J.; SIERWALD, P.; BOND, J. E. Diplopoda. IN: Bousquets, J. L., J. J. Morrone, O.Y. Ordóñez & I.V. Fernández (eds), **Biodiversidad, taxonomía y**

biogeografia de artrópodos de México, IV, 569-599, 2004.

CHARLES, J.; SANCEY, B.; MORIN-CRINI, NADIA; BADOT, P. M.; DEGIORGI, F.; TRUNFIO, G.; CRINI, G. Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 2057–2064, 2011.

CHELINHO, S.; LOPES, I.; NATAL-DA-LUZ, T.; DOMENE, X.; TENORIO NUNES, M. E.; ESPÍNDOLA, E. L.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J. P. Integrated ecological risk assessment of pesticides in tropical ecosystems: A case study with carbofuran in Brazil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, p. 437-445. 2012.

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

CHRISTOFOLETTI, C. A.; FRANCISCO, A.; PEDRO-ESCHER, J.; GASTALDI, V. D.; FONTANETTI, C.S. Diplopods as soil bioindicators toxicity after application of residues from sewage treatment plants and ethanol industry. **Microscopy and Microanalysis**, v.22, p.1098-1110, 2016.

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

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**, v. 224, p. 1523, 2013.

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

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.

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.

DENNEMAN, C.A.J.; STRAALLEN, N.M. The toxicity of lead and copper in reproduction tests using the oribatid mite *Platynothrus peltifer*. **Pedobiologia**, v. 35, p. 305-311, 1991.

De SANTO, F. B.; RAMOS, G. A FILHO, A. M. R.; MARCHIORO C. A.; NIEMEYER, J. C. Screening effects of metsulfuron-methyl to collembolans and earthworms: the role of

adjuvant addition on ecotoxicity. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, 24143-24149, 2018.

De Santo, F. B.; Guerra, N.; Vianna, M. S.; Torres, J. P. M.; MARCHIORO C. A.; NIEMEYER, J. C Laboratory and field tests for risk assessment of metsulfuron-methyl-based herbicides for soil fauna. **Chemosphere**, v. 222, p. 645-655, 2019.

de SOUZA, C. P.; GUEDES, T. A.; FONTANETTI, C. S. Evaluation of herbicides action on plant bioindicators by genetic biomarkers: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, p. 694, 2016.

EL-GHAMERY, A. A.; EL-KHOLY, M. A.; EL-YOUSER, M. A. A. Evaluation of cytological effects of Zn^{2+} in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. **Mutation Research**, v. 537, p. 29-41. 2003.

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

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

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

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLS, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J., NORPPA; H., EASTMOND; D. A., TUCKER J. D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, 26, 125– 132. (2011).

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.88, p. 252-259. 2007.

FERNANDES, T. C. C., MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent- Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1680-1686. 2009.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standart in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.

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

FONTANETTI, C. S.; TIRITAN, B.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Mineralized bodies in the fat body of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). **Brazilian Journal of Morphological Science**, v. 23, p.487–493. 2006.

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

FUESS, L. T.; RODRIGUES, I. J.; GARCIA, M. L. Fertirrigation with sugarcane vinasse: Foreseeing potential impacts on soil and water resources through vinasse characterization, **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 52, p. 1063-1072, .2017.

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

GODOY, J. A. P; FONTANETTI, C. S. Diplopods as bioindicators of soils: analysis of midgut of individuals maintained in substract containing sewage sludge. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 210, p. 389-398, 2010.

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

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, v. 36, p. 2086–2097. 2008.

HARASHIMA, H., SCHNITTGER, A., The integration of cell division, growth and differentiation. **Current Opinion Plant Biology**, v. 13, 66-74. 2010.

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

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

HÖSS, S.; AHLF, W.; BERGTOLD, M.; BLUEBAUM-GRONAU, E.; BRINKE, M.;DONNEVERT, G.; MENZEL, R.; MÖHLENKAMP, C.; RATTE, H.T.; TRAUNSPURGER, W.; DANWITZ, B.; PLUTA, H.J. Interlaboratory comparison of a standardized toxicity test using the nematode *Caenorhabditis elegans* (ISO 10872). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, 2012.

HUND-RINKE, K.; ACHAZI, R.; RÖMBKE, J.; WARNECKE, D. Avoidance test with *Eisenia fetida* as indicator for the habitat function of soils: results of a laboratory comparison test. **Journal of Soils & Sediments**, v. 3, n. 1, p. 7-12, 2003.

IQBAL, M. *Vicia faba* bioassay for environmental toxicity monitoring: a review. **Chemosphere**, v. 144, p. 785–802. 2016.

ISO-International Organization for Standardization. **(ISO 17512-2:2011) Soil Quality: Avoidance Test for Determining the Quality of Soils and Effects of Chemicals on Behavior. Part 2: Test With Collembolans (*Folsomia candida*)**. ISO, Geneva (ISO 17512 2), 2011.

ISO- International Organization for Standardization. **Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora – Part 1: Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth. No. 11269–1**: 2004.

ISO-International Organization for Standardization. **(ISO 11267:1999) Soil quality: Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants**. ISO, Geneva (ISO 11267), 1999.

JÄNSCH, S.; AMORIM, M. J.; RÖMBKE, J. Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. **Environmental Reviews**, v. 13, n. 2, p. 51-83, 2005.

KIRSCH-VOLDERS, M.; PLAS, G.; ELHAJOUJI, A.; LUKAMOWICZ M.; GONZALEZ, L.; LOOCK, K. V.; DECORDIER, 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.

KÖHLER, H.R.; ALBERTI, G. The Effect of Heavy Metal Stress on the Intestine of Diplopods. **Ber. Nat. Med.** v. 10, p. 257-267, 1992.

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

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

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p.71- 81, 2009.

LIU, S.; YANG, C.; XIE, W.; XIA, C; FAN, P. The effects of cadmium on germination and seedling growth of *Suaeda salsa*. **Procedia Environmental Sciences**, v. 16 p. 293-298, 2012.

LUTTERBECK, C. A.; KERN, D. I.; MACHADO, E. L.; KÜMMERER, K. Evaluation of the toxic effects of four anti-cancer drugs in plant bioassays and its potency for screening in the context of waste water reuse for irrigation. **Chemosphere**, v. 135, p. 403–410, 2015.

MALEQUE, M. A.; MAETO, K.; ISHII, H. T. Arthropods as bioindicators of sustainable forest management, with a focus on plantation forests. **Applied Entomology and Zoology**, v. 44, p 1-11, 2009.

MARCATO, A. C. C. **Utilização de um sistema híbrido de tratamento para biorremediação da vinhaça e avaliação da sua toxicidade por meio de análises**

histológicas e moleculares. 2019. 129f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas- Biologia Celular e Molecular), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Rio Claro, 2019.

MARCATO, A. C. C.; SOUZA, C. P. PAIVA, A. B. EISMANN, C. E.; NAVARRO, F. F.; CAMARGO, A. F. M.; MENEGÁRIO, A. A.; FONTANETTI, C.S. Hybrid treatment system for re-mediation of sugarcane vinasse, **Science of the Total. Environment**, v. 659, 115–12, 2019.

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.

MASSE, P. S. M.; FIEMAPONG, A. R. N.; VANDENSPIEGEL, D.; GOLOVATCH, S. I. Diversity and distribution of millipedes (Diplopoda) in the Campo Ma'an National Park, Southern Cameroon. **African Journal of Ecology**, v. 56, 73-80, 2017.

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 padbergi* (Diplopoda). **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 1361-1369, 2012.

MIŠÍK, M.; MA, T-H.; NERSESYAN, A.; MONARCA, S., KIM; J. K.; KNASMUELLER, S. Micronucleus assays with *Tradescantia* pollen tetrads: an update. **Mutagenesis**, v. 26, p. 215-221. 2011.

MIŠÍK, M.; PICHLER, C.; RAINER, B.; FILIPIC, M.; NERSESYAN, A; KNASMUELLER, S.; Acute toxic and genotoxic activities of widely used cytostatic drugs in higher plants: Possible impact on the environment. **Environmental Research**, v.135, p.196-203. 2014.

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

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

NATAL-DA-LUZ, T.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J.P. Avoidance tests with collembola and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.23, p. 2188-2193, 2004.

NATAL-DA-LUZ, T.; RÖMBKE, J.; SOUSA, J.P.; Avoidance tests in site-specific risk assessment – Influence of soil properties on the avoidance response of Collembola and earthworms. **Environmental. Toxicology. And Chemistry**, v. 27, 1112-1117. 2008.

NATAL-DA-LUZ, T.; TIDONA, S.; VAN GESTEL, C. A. M.; MORAIS, P. V.; SOUSA, J.P.; The use of Collembola avoidance tests to characterize sewage sludges as soil amendments. **Chemosphere**, v. 77, p. 1526-1533, 2009.

NIEMEYER, J. C.; MOREIRA-SANTOS, M.; NOGUEIRA, M. A.; CARVALHO, G. M.; RIBEIRO, R.; DA SILVA, E. M.; SOUSA, J. P. Environmental risk assessment of a metal-contaminated area in the Tropics. Tier I: screening phase. **Journal of Soils and Sediments**, v.10, p. 1557-1571. 2010.

NIEMEYER, J. C.; MOREIRA-SANTOS, M.; RIBEIRO, R., RUTGERS, M.; NOGUEIRA, M. A.; DA SILVA, E. M.; SOUSA, J. P. Ecological risk assessment of a metal-contaminated area in the tropics. Tier II: Detailed assessment. **PloS One**, v. 10(11), p. 1-25, 2015.

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. Ultraestructural 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.

OECD- Organisation for Economic Co-operation and Development. Food and Agriculture Organization of the United Nations **OECD-FAO Agricultural Outlook 2015**. OECD Publishing, Paris. 2015.

OECD- Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD/FAO (2019), **OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-2028**. OECD Publishing, Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 2019.

PALMIERI, M. J.; LUBER, J.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; DAVIDE, L. C. Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research**, v.763, p.30–35, 2014.

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

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

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.

PERUZZO, V. V.; SACHETT, F. H.; TORRES, A. P. R.; SOUZA, M. P.; BEAL, L. L. Influence of sulfide on the evaluation of methane production through the degradation of sugarcane vinasse. **Scientia cum Industria**, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2018.

RAHOUI, S.; CHAOUI, A.; EL FERJANI, E. Differential sensitivity to cadmium in germinating seeds of three cultivars of faba bean (*Vicia faba* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, 451-456, 2008.

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.

REIS, C. R.; HU, B. Vinasse from sugarcane ethanol production: better treatment or better utilization? **Frontiers in Energy Research**, v. 5, p. 1-7, 2017.

REY, D.; PATOU, M. P.; MEYRAN, J. C.; Histopatological effects of tannic acid on the midgut epithelium of some aquatic diptera larvae. **Journal of Invertebrate Patology**, v. 73, p. 173-181, 1999.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. 355 p.

SCHAEFER, M. Behavioural endpoints in earthworm ecotoxicology – evaluation of diferente test systems in soil toxicity assessment. **Journal of Soils & Sediments**, v. 3, p. 79-84, 2003.

SHARMA, C.B.S.R.; PANNEERSELVAN, N. Genetic toxicology of pesticides in higher plant systems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 9, p. 409-442, 1990.

SILVEIRA, G. L.; LIMA, M. G. F.; DOS REIS, G. B.; PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIEIRA, L. F., Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, 178, 359-367. 2017.

SNYDER, B. A.; HENDRIX, P. F.; Current and Potential Roles of Soil Macroinvertebrates (Earthworms, Millipedes, and Isopods) in Ecological Restoration. **Restoration Ecology**, v. 16, p. 629-636, 2008.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). In: G. Castillo (ed.) **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. Canadá: IDRC/IMTA, 2004, p. 71-79.

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

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

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

SRIVASTAVA, K.; MISHRA, K. K. Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 93, p. 8-12, 2009.

STEINLY, B. A.; BERENBAUM, M. Histopatological effects of tannins on the midgut epithelium of *Papilo polyxenes* and *Papilo glaucus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 39, p. 3-9, 1985.

TRIEBSKORN, R.; KÖHLER, H. R.; ZANH, T.; VOGT, G.; LUDWING, M.; RUMPF, S.; KRATZMANN, M.; ALBERTI, G.; STORCH, V. Invertebrate cells as targets for hazardous substances ziet. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, Hamburg, v. 78, p. 277-287, 1991.

USEPA- United States Environmental Protection Agency. **Ecological effects test guidelines (OPPTS 850.4200): Seed germination/root elongation toxicity test**. 1996

YOUNG, B. J.; RIERA, N. I.; BEILY, M. E., BRES, P. A.; CRESPO, D. C., RONCO, A. E. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 182–186, 2012.

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.

ZANGER, M.; ALBERTI, G.; KUHN, M.; KÖHLER, H.R. The stress-70 protein family in diplopods: induction and characterization. **Journal of Comparative Physiology B**, v.165, p. 622-627, 1996.