

---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**JORGE EVANGELISTA CORREIA**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA  
VINHAÇA UTILIZANDO *OREOCHROMIS  
NILOTICUS* (PERCIFORMES: CICHLIDAE)  
COMO ORGANISMO TESTE**

Jorge Evangelista Correia

Avaliação da toxicidade da vinhaça utilizando *Oreochromis niloticus*  
(Perciformes: Cichlidae) como organismo teste

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

Co-orientador: Prof<sup>a</sup> Cintya Aparecida Christofolletti

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

Rio Claro

2012

574.5263 Correia, Jorge Evangelista  
C824a Avaliação da toxicidade da vinhaça utilizando *Oreochromis niloticus*  
(Perciformes: Cichlidae) como organismo teste / Jorge Evangelista  
Correia. - Rio Claro : [s.n.], 2012  
34 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado - Ciências  
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de  
Rio Claro

Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti  
Co-Orientador: Cintya Aparecida Christofolletti

1. Ecologia aquática. 2. Mutagênese ambiental. 3. Tilápia. 4.  
Micronúcleo. 5. Cometa. 6. Mutagenicidade. 7. Genotoxicidade. I. Título.

## **DEDICATÓRIA**

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

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

Aos meus amigos Leonardo (Boi) muito obrigado por me aguentar nesses quatro anos, muito obrigado pela amizade, pelos sustos, por tornar nossa república a melhor de todas as reps. Muito obrigado também Lucas (Laranjinha), Marcel, Gabriela Tibúrcio (Tibú), Gabriela Schonhaus (Nenis), Julia (Chapinha), Débora (Baby), Bianca (Bia), Ana Claudia (Matraca), Fernanda (Arisca) por todas as risadas e pelo companheirismo, vocês foram a família que eu escolhi ter em Rio Claro.

Muito obrigado aos meus amigos e colegas de turma Abigail (Biga), Ana (Tropeça), Alexandre (Piru), Aline, Antônio (Pó), Arthur (Fininho), Bruno (Febem) Daniela (Dani), Dayene, Elen, Fernanda, Gabriela Pessenda, Jussara (Mimo), Larissa (Carioca), Laryssa (Lary), Lais, Letícia (Le), Lídia (Brejela), Luá, Maria Luísa (Malu), Matheus (Tcherbi), Michelle (Fofoca), Paula Maldonado, Paula Bertoli (Pucca), Pedro Coca (Loló), Pedro Francisco (Garça), Poliana, Raquel, Renan (Zuado), Regiane, Vanessa (Fingers) e Verônica por fazerem que o CBI 2009 fosse a melhor turma de graduação que eu pudesse ter.

Agradeço também a todo o grupo de pesquisa do laboratório, Tamaris, Vinicius, Cristina, Janaína, Rafael, Annelise, Larissa, Julia, Ana Claudia e em especial a Cintya, minha fantástica co-orientadora, que sempre com paciência soube me ensinar e me corrigir, esse trabalho se deve muito aos seus esforços.

Por fim agradeço em especial a minha orientadora Carmem, por ser a melhor orientadora que eu poderia ter, por ter me aceitado mesmo com um monte de orientados, por ser um exemplo de pesquisadora e pessoa na qual eu me espelharei por toda vida acadêmica. Muito obrigado pela orientação e por tudo que eu aprendi e ainda aprenderei estando ao seu lado.

“As coisas findas muito mais que lindas essas ficarão”  
Carlos Drummond de Andrade.

## RESUMO

A contaminação de lagos e rios, por infiltração de resíduos dispostos no solo como fertilizantes, por exemplo, tem merecido destaque em todo o mundo, uma vez que tais compostos podem conter elementos tóxicos, causando alterações nos ecossistemas aquáticos e/ou terrestres. Dada a possível presença desses elementos nesses resíduos, é possível avaliarmos danos causados aos organismos expostos, por meio de mutações e quebras no material genético. Neste sentido, o trabalho apresentado teve como objetivo geral analisar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico da vinhaça, resíduo da transformação da cana-de-açúcar em álcool, usada como fertilizante, utilizando peixes (*Oreochromis niloticus* - Cichlidae) como organismo teste. Os indivíduos foram expostos a diferentes diluições de vinhaça na água e, posteriormente, foi realizada a análise dos seus eritrócitos utilizando o teste do micronúcleo associado às anormalidades nucleares e o ensaio do cometa. No primeiro bioensaio, as tilápias expostas as concentrações de vinhaça de 5% e 10% morreram após 48h. O número de eritrócitos micronucleados foi estatisticamente significativo para a vinhaça na concentração 1%, e também para as anormalidades nucleares broken-egg e broto, quando comparado aos controles negativo e positivo; foram significativos também os eritrócitos tipo lobed, quando comparado ao controle negativo. Os resultados obtidos no ensaio do cometa não foram significativos para a vinhaça 1% quando comparados ao controle negativo, devido ao alto índice de cometas com danos no controle, o que não é usual. O mesmo foi observado para as alterações do tipo “notched” e “blebbed”. No segundo bioensaio as análises químicas realizadas para a detecção de metais pesados na amostra de vinhaça, acusaram apenas a presença de cobre e cromo, esse último com concentração 89 vezes maior do que na primeira coleta. Diferentemente do primeiro bioensaio, os peixes expostos à diluição de 5% não morreram. Pelo teste do micronúcleo associado às outras anormalidades nucleares observou-se que a vinhaça foi mutagênica; em todas as concentrações os valores de micronúcleo foram significativos, com  $p < 0,05$ . As anormalidades mais encontradas foram “blebbed”, “notched”, seguida por “lobed”, as quais, todas obtiveram valores significativos para as concentrações de 2,5% e 5% de vinhaça. Brotos também foram significativos para as concentrações maiores. A concentração 1% apresentou resultado significativo para as anormalidades “blebbed” e “broken-egg”, esta última também foi significativa para a concentração 5%. Os resultados do ensaio do cometa foram significativos para todas as concentrações,

tanto para as classes de cometa quanto para o escore de danos. Os valores só não foram significativos nas classes 0 e 3 da concentração 1%. Portanto, os resultados evidenciaram um potencial mutagênico e genotóxico da vinhaça.

## ABSTRACT

Contamination of rivers and lakes, waste disposed by infiltration into the soil as fertilizer, for example, has been highlighted around the world, since such compounds can contain toxic elements, causing changes in aquatic and/or terrestrial ecosystem. Due to the possible presence of these elements in these wastes, it is possible assess damage to organisms exposed through breaks in genetic material and mutations. In this sense, this work aimed at exploring the cytotoxic, mutagenic and genotoxic vinasse potential, residue used as fertilizer, from the processing of sugar cane into alcohol, using fish (*Oreochromis niloticus* - Cichlidae) as a test organism. The individuals were exposed to different dilutions of vinasse in the water and later carried out analysis of their erythrocytes using the micronucleus test and nuclear abnormalities associated and the comet assay. In the first bioassay, tilapia exhibited 5% and 10% vinasse concentrations died after 48h. The number of micronucleated erythrocytes was statistically significant for the 1% vinasse concentration and also for nuclear abnormalities such as broken-egg and nuclear bud, when compared with negative and positive controls; were also significant lobed type erythrocytes, when compared to the negative control. The test results of the comet assay were not significant for 1% vinasse when compared to the negative control, due to the high rate of comets with damage control, which is unusual. The same was observed for changes as "notched" and "blebbed" type. In the second chemical analyzes conducted, the detection of heavy metals in the vinasse sample, charged only the presence of copper and chromium, the latter with a concentration 89 times higher than in the first test. Differentially the first bioassay, fish exposed to dilution of 5% did not die. At micronucleus test associated with other nuclear abnormalities observed that vinasse was mutagenic; at all concentrations micronucleus values were significant, with  $p < 0.05$ . The abnormalities more found were "blebbed", "notched", followed by "lobed", which all had significant values for concentrations of 2.5% and 5% of vinasse. Nuclear buds were also significant for the higher concentrations. A 1% concentration showed a significant result for "blebbed" and "broken-egg" abnormalities, the latter was also significant for the 5% concentration. The comet assay results were significant for all concentrations, for both classes of comet as damages for the score. The values were not significant only in classes 0 and 3 in 1% concentration. Therefore, the results showed a genotoxic and mutagenic potential of vinasse.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	09
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 A problemática da contaminação aquática e a vinhaça.....	11
2.2 <i>Oreochromis niloticus</i> como bioindicador de contaminação ambiental.....	13
2.3 Teste do micronúcleo e ensaio do cometa como ferramentas no monitoramento ambiental.....	14
3. OBJETIVOS.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Material biológico.....	16
4.2 Vinhaça como substância tóxica.....	17
4.2.1 Análises físico-químicas da vinhaça.....	17
4.3 Bioensaios com <i>O. niloticus</i> .....	17
4.4 Teste do micronúcleo e outras anormalidades nucleares em eritrócitos circundantes.....	17
4.5 Ensaio do cometa utilizando sangue periférico.....	18
5. RESULTADOS.....	19
5.1 Análises físico-químicas da vinhaça.....	19
5.2 Descrição dos resultados no teste do micronúcleo associado às anormalidades nucleares.....	21
5.3 Descrição dos resultados no ensaio do cometa.....	24
6. DISCUSSÃO.....	26
7. CONCLUSÃO.....	29
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

## 1. INTRODUÇÃO

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

A intervenção humana pode ser considerada como a maior responsável pela magnitude e frequência da disposição de contaminantes, uma vez que a sua geração e utilização como subproduto de atividades industriais ocorre em escala exponencial, gerando diversos impactos em nível local e global, levando a um estresse contínuo da natureza e, conseqüentemente, a efeitos agudos ou crônicos à saúde dos ecossistemas e do homem (BRAYNER, 1998).

Como o Brasil é rico em recursos hídricos, ainda há na população uma mentalidade de descaso e desperdício, sendo a água, devido sua propriedade como solvente universal, utilizada para descarte de efluentes urbanos e transporte de resíduos, que são muitas vezes tóxicos, levando a degradação dos ecossistemas aquáticos (WHITE; RASMUSSEN, 1998). Esses efluentes, principalmente os industriais, podem ter composições complexas podendo apresentar pesticidas e metais pesados, ocasionando sérios danos aos organismos (VEGA et al., 1996).

Os efluentes industriais constituem um dos poluentes que mais geram impactos ao meio ambiente; dentre estes, tem merecido destaque, os resíduos do setor agrário. Esse setor é muito forte no país e um dos que mais causam impacto ambiental, dada a sua natureza exportadora, a necessidade de grandes porções de terras, o uso excessivo de agrotóxicos e pesticidas e geração de grande quantidade de resíduos. Nesse sentido, é larga a contribuição da indústria sucroalcooleira ao considerarmos o impacto ambiental, uma vez que a mesma produz cerca de 16 bilhões de litros de etanol por ano para atender o mercado interno e externo, com 350 usinas operantes (UNICA, 2007; JUNIOR et al., 2008), sendo que para cada litro de etanol produzido é gerado cerca de 10 a 15 litros de vinhaça como resíduo. Para minimizar essa imensa quantidade de resíduo subproduzido, rico em matéria orgânica e nutrientes, a vinhaça passou a ser utilizada na fertirrigação da própria cultura de cana-de-açúcar.

Esse uso da vinhaça previne que a mesma seja despejada em rios de forma ilegal; no entanto, a vinhaça quando depositada no solo pode sofrer percolação/lixiviação, podendo chegar a cursos d'água, mas não na sua forma bruta. Entretanto, até mesmo um solo arenoso fino, que possui boa capacidade de retenção e condições moderadas de compactação (densidade aparente entre 1,5 e 1,67), permite o carreamento considerável de elementos aos rios e lagos (CALÇAS, 2001; HAMADA et al., 2002).

Frente ao grande crescimento industrial provocado pelo avanço da economia, a preservação dos recursos hídricos e o monitoramento de contaminações são fundamentais e necessários. Por isso é de extrema importância avaliar os efeitos tóxicos e genotóxicos da poluição e os efeitos dos contaminantes sobre os organismos vivos; para isso, técnicas que consigam medir esses efeitos são indispensáveis, uma vez que análises físico-químicas da água indicam somente a presença e a concentração dos poluentes (SMAKA-KINCL et al., 1996; MATSUMOTO et al., 2006).

Um teste amplamente utilizado é o teste do micronúcleo associados às anormalidades nucleares. Tal método detecta micronúcleos resultantes de quebras cromossômicas durante a divisão celular e/ou eventos de perda cromossômica resultantes de atrasos anafásicos (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003). Eritrócitos de peixes, por serem nucleados, são excelentes não só para a visualização dos micronúcleos, mas também para a observação de outras anormalidades nucleares, que parecem estar relacionadas com falhas na divisão celular, processo de morte celular, genotoxicidade e/ou mutagenicidade (CORMAK, 1991; FENECH, 2000), sendo assim complementar a análise de micronúcleos (SERRANO-GARCIA; MONTERO-MONTOYA, 2001; ÇAVAS; ERGENE-GOZÜKARA, 2005; SOUZA; FONTANETTI, 2006; HOSHINA et al., 2008).

Assim como o teste do micronúcleo, o ensaio do cometa é amplamente aceito pelas agências internacionais como um método padrão para avaliar danos no DNA em células individuais e tem sido usado em uma grande variedade de aplicações, incluindo o biomonitoramento humano e ambiental e estudos de genotoxicidade (COLLINS, 2004). É muito usado no campo da genética toxicológica, sendo utilizado em testes *in vitro* e *in vivo* com células de animais e plantas (FAUST et al., 2004). É uma técnica considerada rápida, economicamente viável, sensível e não necessita de muitas células para ser realizada; segundo Frenzilli et al. (2009), o ensaio do cometa é uma ferramenta amplamente utilizada no diagnóstico da genotoxicidade em ambientes aquáticos.

Além de técnicas apuradas que avaliem o potencial tóxico do poluente, é necessária também a utilização de organismos sensíveis, em ensaios de curto prazo, tais como plantas e animais aquáticos (MAJER et al., 2005). Assim sendo, o teste do micronúcleo, utilizando

peixes, tem demonstrado ser uma técnica *in vivo* útil para testes de genotoxicidade e tem potencial para o monitoramento *in situ* da qualidade da água (KIM; HYUN, 2006).

Neste sentido, considerando a importância da água para a vida e a relevância da contaminação dos recursos hídricos por resíduos industriais, dentre eles a vinhaça, que pode chegar ao ambiente aquático por despejo ou percolação, é imprescindível a realização desse estudo que tem por objetivo avaliar o potencial tóxico deste resíduo sobre um organismo aquático.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. A problemática da contaminação aquática e a vinhaça**

Nas últimas décadas o setor industrial cresceu exponencialmente e obteve um papel importantíssimo, não só na economia, como também na produção de resíduos. Até a década de 80, por falta de uma legislação ambiental mais rigorosa, muito desses resíduos eram destinados aos corpos d'água. Após a década de 80 houve uma maior preocupação com o meio ambiente e valorização da biodiversidade, caracterizando a fase holística da legislação (FARIAS, 2009).

Um setor que se desenvolveu muito durante a década de 80 foi o sucroalcooleiro, impulsionado pelo incentivo estatal por meio do programa Próalcool, com uma proposta alternativa ao uso dos derivados de petróleo, na tentativa de superar a crise e atender a demanda do mercado interno e externo. Assim, a indústria sucroalcooleira ganhou destaque não só na economia, como também na questão ambiental devido a enorme quantidade de resíduos que produz (PAOLIELLO, 2006).

A vinhaça, também conhecida por restilo ou vinhoto, principal resíduo da transformação da cana-de-açúcar em etanol, geralmente é ácida (pH: 3,5-5), de coloração castanho-escura, de odor incômodo aos humanos e com alto conteúdo orgânico (COD: 50-150 gL<sup>-1</sup>) (WALISZEWSKI et al., 1997; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011). A produção de etanol a partir de biomassa resulta em um considerável volume de vinhaça, com alto potencial poluidor (WILKIE et al., 2000). Em média, para cada litro de etanol são gerados de 10 a 15 litros de vinhaça como resíduo (CORTEZ, 1992; YESILADA, 1999; KUMAR; GOPAL, 2001). Atualmente, o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo (DEMATTE, 2004), com capacidade de produzir 16 bilhões de litros de etanol por ano (UNICA, 2007; JUNIOR et al., 2008).

Devido a uma legislação mais rigorosa e uma maior preocupação ambiental, a vinhaça que antes era jogada em rios, causando sérios problemas de poluição (SANTOS et

al., 1981; DEMATTÊ et al., 2004), atualmente é utilizada na fertirrigação da própria cultura de cana-de-açúcar, uma vez que esse resíduo apresenta grande quantidade de matéria orgânica, íons e micronutrientes essenciais para as plantas, possibilitando a fertilização de solos agricultáveis (MELO; SILVA, 2001).

A adoção da prática de fertirrigação consiste na infiltração da vinhaça *in natura* no solo, por meio da irrigação das culturas de cana-de-açúcar (CAMARGO et al., 2009). Diversos autores, como Resende (1979), Glória e Orlando Filho (1983), Ball-Coelho et al. (1993), Lyra et al. (2003) e Silva e Cabeda (2005) constataram efeitos benéficos da vinhaça sobre o solo, por levar a um aumento na retenção de umidade, porosidade, nível de potássio e condutividade elétrica. No entanto, em alguns casos, a aplicação da vinhaça tem sido contestada pelos seus efeitos no solo e nas águas subterrâneas (SILVA et al., 2007; GIANCHINI; FERRAZ, 2009). De acordo com vários autores, o despejo direto da vinhaça no solo pode causar sua salinização, lixiviação dos metais presentes no solo para as águas subterrâneas, alterações na qualidade do solo devido ao desbalanceamento dos nutrientes, principalmente do manganês (AGRAWAL; PANDEY, 1994), redução da alcalinidade e perda das culturas (KUMAR; VISWANATHAN, 1991), aumento da fitotoxicidade e odor incômodo (NAVARRO et al., 2000).

Embora os efeitos da vinhaça no solo e na agricultura sejam conhecidos, não se tem muitas informações a respeito dos efeitos biológicos induzidos pela vinhaça nos diferentes organismos, sejam eles do próprio solo ou dos ambientes aquáticos.

Estudos de toxicidade da vinhaça em drosófilas (*Drosophila melanogaster*) mostraram que a taxa de fecundidade dos ovos e a fertilidade de fêmeas, foram reduzidas consideravelmente com o aumento da concentração de vinhaça. Esse mesmo estudo mostrou que a vinhaça altera a longevidade dos indivíduos, sendo muito mais significativo em machos e na concentração de 50% (YESILADA, 1999).

Monteiro et al. (2011) avaliaram a redução da toxicidade da vinhaça tratada pelo fungo *Pleurotus sajor-caju* utilizando organismos aquáticos, como *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna*, *Daphnia similis* e *Hydra attenuata*, como organismos-teste. Houve reduções de 82,8% na DQO, 75,3% na DBO, 99,2% na coloração e 99,7% na turbidez da vinhaça, além de uma redução de sua toxicidade. Por outro lado, Kumar e Gopal (2001) avaliaram a toxicidade da vinhaça em peixes da espécie *Channa punctatus* em diferentes concentrações; os autores observaram grande produção de muco, redução nas proteínas e alta concentração de ácido lático em diferentes órgãos, como cérebro, fígado, rins e músculos.

## **2.2. *Oreochromis niloticus* como bioindicador para o monitoramento ambiental**

Diversos organismos-teste vêm sendo empregados na detecção de danos genotóxicos e mutagênicos, em avaliações de possíveis efeitos de contaminação, com base em alterações estruturais, formação de micronúcleos, danos no DNA, troca de cromátides irmãs ou análise de genes mutantes (PEÑA, 1996).

De acordo com Albuquerque (2007), o aumento da quantidade de contaminantes no ecossistema aquático necessita do entendimento do efeito biológico de xenobiontes na biota aquática. O reflexo do comprometimento ambiental de um ecossistema aquático pode ser evidenciado utilizando peixes, devido a seu alto nível trófico e a sua grande importância na dieta alimentar do ser humano. Estas características contribuem para que os peixes sejam espécies alvo para pesquisas de avaliação de impactos no ambiente aquático e/ou avaliação de risco, em que são utilizados como marcadores biológicos. Assim, peixes são intensamente utilizados como bioindicadores em avaliações de contaminação ambiental (FONTANETTI et al., 2012).

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

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

Segundo Girón-Pérez et al. (2007), a tilápia-do-nylo é um ótimo modelo para avaliação do ecossistema aquático e para realização de estudos toxicológicos. Os peixes,

como um todo, são excelentes para este tipo de estudo, pois possuem a capacidade de retirar, estocar e bioacumular compostos e/ou poluentes em seus organismos (STREIT, 1998); por possuírem essas propriedades, eles podem sinalizar o potencial perigo de novas substâncias químicas ou para a possibilidade de poluição ambiental.

Outros autores afirmam, ainda, que eles são considerados bons organismos teste para monitorar a qualidade da água, especialmente as espécies pequenas de aquário, que podem ser mantidas em laboratório e facilmente expostas às substâncias tóxicas, sendo utilizadas na avaliação da presença de substâncias com potencial de causar danos à saúde humana (HARSHBARGER; CLARK, 1990; AL-SABTI; METCLAFE, 1995). Por serem sensíveis a agentes toxicantes no meio aquático, os peixes vem se mostrando muito adequados para os estudos de genotoxicidade.

### **2.3. Teste do micronúcleo e ensaio do cometa como ferramentas no monitoramento ambiental**

O teste do micronúcleo é um ensaio citogenético comumente usado em vários sistemas biológicos, para o monitoramento de genotoxicidade ambiental (MERSCH; BEAUVAIS, 1997).

Micronúcleos são pequenas massas intracitoplasmáticas de cromatina com aparência de um pequeno núcleo, resultantes de quebras cromossômicas e/ou aneuploidia durante a divisão celular (AL-SABTI; METCALFE, 1995; GRISOLIA; STARLING, 2001). Durante a telófase, o envelope nuclear é formado ao redor do cromossomo inteiro ou do fragmento cromossômico perdido, que se descondensa e, gradualmente vai assumindo a morfologia de um núcleo interfásico, com exceção do tamanho, pois este é bem menor que o núcleo principal, razão pela qual é chamado de micronúcleo (FENECH, 2000).

Junto com a observação de micronúcleos, anormalidades nucleares também podem ser observadas e quantificadas. Descritas por Carrasco et al. (1990), as alterações morfológicas no envoltório nuclear em eritrócitos de peixes podem ser do tipo “blebbed”, núcleo que apresentam uma pequena evaginação nuclear, “lobed”, núcleo que apresenta uma grande evaginação nuclear, maior que os “blebbed”, e os “notched”, núcleos que apresentam invaginação pronunciada e vacuolização.

Contudo, ainda não é totalmente esclarecido o mecanismo de formação dessas alterações nucleares. Entretanto, estudos indicam que as anormalidades nucleares são induzidas em resposta a exposição a contaminantes (PALHARES; GRISOLIA, 2002; ERGENE et al., 2007).

O teste do micronúcleo tem sido aplicado, com sucesso, em eritrócitos de peixes (HOSE et al., 1987; GRISOLIA; STARLING, 2001; SOUZA; FONTANETTI, 2006); estas células por serem nucleadas, são excelentes para a realização deste teste, uma vez que podem ser facilmente marcadas como resultado de atividade clastogênica dos contaminantes (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Tem se mostrado uma técnica promissora *in vivo* para avaliar a mutagenicidade e a qualidade da água (AL-SABTI; METCALFE, 1995; GRISOLIA; STARLING, 2001).

Osman et al. (2011), Ozkan et al. (2011) e Ragugnetti et al. (2011) avaliaram o potencial genotóxico da água do rio Nilo, da substância Ibuprofen e doses subletais de cádmio, respectivamente, por meio do teste do micronúcleo em eritrócitos de *O. niloticus*, comprovando a eficácia do teste do micronúcleo e da tilápia como organismo teste.

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

O princípio básico do teste do cometa é a migração do DNA em uma matriz de agarose sob condições eletroforéticas. Quando observadas em microscópio, as células têm a aparência de um cometa, com cabeça (região nuclear) e uma cauda contendo os fragmentos de DNA que migraram em direção ao polo positivo (HARTMANN et al., 2003). Dessa forma, quanto maior a cauda do cometa maior foi o dano genético induzido no nucleóide. Portanto, o ensaio do cometa é capaz de detectar quebras no material genético das células (SINGH et al., 1988); entretanto, essas lesões são consideradas primárias e, dessa forma, são passíveis de reparo. Assim, podem ou não resultar em alterações genéticas (COLLINS et al., 1997).

A análise do ensaio do cometa pode ser realizada visualmente ou por meio do uso de programas específicos. Visualmente, as células podem ser classificadas de acordo com a categoria de migração da cauda em quatro classes (0, 1, 2 e 3), sendo que a classe 0 representa nenhum ou mínimo dano e a classe 3 representa máximo dano. É classificado em classe 0 quando não há migração de fragmentos de material genético (cauda); em classe 1, quando o tamanho da cauda do cometa não excede o diâmetro da cabeça; em 2 quando o tamanho da cauda é entre um a duas vezes o tamanho da cabeça e em classe 3, quando o tamanho da cauda é maior que duas vezes o tamanho da cabeça (COLLINS et al., 1997).

Vários autores como Kumar et al. (2010), Hoshina e Marin-Morales (2011) e Çavas (2011), utilizaram o ensaio do cometa para avaliar efeitos genotóxicos em peixes *Channa*

*punctatus*, *O. niloticus* e *Carassius auratus*, respectivamente. Todos observaram a eficácia do ensaio do cometa, constatando efeitos genotóxicos da atrazina em *C. auratus*, do inseticida malathion em *C. punctatus*, e do efluente de uma refinaria de petróleo de Paulínia em *O. niloticus*. Nos dois primeiros estudos também foram utilizados o teste do micronúcleo. Souza e Fontanetti (2012) também avaliaram a toxicidade da água do rio Paraíba do Sul próximo a uma refinaria de petróleo, utilizando o ensaio do cometa em eritrócitos de *O. niloticus*; os dados obtidos indicaram a presença de substâncias genotóxicas em dois pontos de coleta, no local de despejo do efluente da refinaria e na jusante do despejo.

Portanto, a utilização desses dois testes é fundamental para uma avaliação genotóxica e mutagênica, além de serem técnicas relativamente simples e rápidas.

### **3. OBJETIVOS**

Este projeto teve por finalidade avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico da vinhaça, em diferentes diluições, em eritrócitos de tilápias (*Oreochromis niloticus*).

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar o potencial citotóxico da vinhaça pela presença de células em processo de morte celular, no sangue periférico de tilápias;
- Avaliar o potencial genotóxico da vinhaça por meio do ensaio do cometa e pela presença de anormalidades nucleares em eritrócitos de tilápias;
- Avaliar o potencial mutagênico da vinhaça pela presença de eritrócitos micronucleados em tilápias, por meio do teste do micronúcleo.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1. Material biológico**

A espécie de peixe *O. niloticus* (Perciformes, Cichilidae), conhecida popularmente por tilápia-do-Nilo, foi utilizada neste trabalho como organismo teste. No bioensaio foram utilizados cinco espécimens por tratamento, totalizando 30 indivíduos, com tamanho médio de 10 cm, para evitar diferenças intra-específicas relacionadas ao tamanho e idade dos peixes. Os espécimes, oriundos de piscicultura, foram trazidos ao Departamento de Biologia, UNESP – campus de Rio Claro, onde foram aclimatados em tanque, a temperatura média de 23°C, com sistemas de filtragem e aeração.

#### **4.2. Vinhaça como substância tóxica**

A vinhaça foi coletada na Usina Santa Lucia, localizada na cidade de Araras-SP. Esse efluente foi mantido em câmara fria (4°C), no Departamento de Bioquímica e Microbiologia da UNESP de Rio Claro, até o início dos experimentos. Foram utilizadas duas amostras de vinhaça, uma coletada em 2010 e outra em 2011.

#### **4.2.1. Análises físico-químicas da vinhaça**

Análises físico-químicas da vinhaça bruta (sem diluição) foram realizadas pelo laboratório TASQA (Paulínia-SP), para avaliação dos parâmetros: pH, resíduo não filtrável total, dureza, condutividade elétrica, nitrogênio nitrato, nitrogênio nitrito, nitrogênio amoniacal, nitrogênio Kjeldhal, sódio, cálcio, potássio, magnésio, sulfato, fosfato total, DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e DQO (Demanda Química de Oxigênio), bem como os metais As, Ba, Cd, Cu, Cr, Hg, Mo, Ni, Pb, Se e Zn.

#### **4.3. Bioensaios com *O. niloticus***

Foram montados dois bioensaios em aquários, com capacidade de 30L cada. Em um deles, foi realizado o controle negativo, com 30 litros de água de poço artesiano. Para o controle positivo, foi injetada intraperitonealmente a substância ciclofosfamida, e os peixes também foram colocados em aquário com água de poço artesiano. No primeiro bioensaio foram utilizadas diluições de 1%, 5% e 10% de vinhaça. Já no segundo bioensaio, para compreender melhor os efeitos da vinhaça nos peixes, tendo em vista a alta taxa de mortalidade dos peixes no primeiro bioensaio, foi adicionada ao experimento a diluição de 2,5% de vinhaça. Portanto para os tratamentos, a vinhaça foi diluída em concentrações de 1%, 2,5%, 5% e 10%, tendo como base diluições similares de vinhaça utilizadas por Kumar e Gopal (2001) e Algur e Kadioglu (1992), na qual a vinhaça foi diluída para avaliação do impacto desta em peixes *Channa punctatus*, e para avaliação do crescimento, biomassa e produtividade primária em *Pisum sativum* e *Helianthus annuus*, respectivamente.

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

#### **4.4. Teste do micronúcleo e outras anormalidades nucleares com eritrócitos circulantes**

Na confecção das lâminas para o teste do micronúcleo e outras anormalidades nucleares, foi retirado aproximadamente 0,3 cm<sup>3</sup> de sangue, de cada peixe vivo, por meio de punção cardíaca, utilizando seringas heparinizadas. Após a punção, a agulha foi limpa

com papel absorvente, a fim de se evitar a contaminação do sangue com líquido corporal e/ou muco. A primeira gota foi descartada, também para evitar a contaminação do sangue, sendo utilizadas as gotas posteriores para a confecção das lâminas, por meio da técnica de esfregaço sangüíneo.

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

Na identificação de micronúcleos, alguns critérios foram adotados, segundo Huber et al. (1983): boa preservação e coloração do citoplasma e do núcleo; micronúcleo e o núcleo principal dentro do mesmo citoplasma; ausência de conexão entre núcleo e micronúcleo; o diâmetro máximo do micronúcleo não deve ultrapassar a metade do núcleo (se for maior, a célula foi considerada como binucleada); manutenção da esfericidade do núcleo e micronúcleo.

As outras anormalidades nucleares seguiram a classificação de Carrasco et al. (1990): “blebbed nuclei”, núcleos com uma evaginação relativamente pequena do envoltório nuclear, o qual aparenta conter eucromatina ou, algumas vezes, heterocromatina; “lobed nuclei”, núcleos com evaginações maiores que os “blebbeds”, mas sem a mesma delimitação; alterações morfológicas do núcleo também foram incluídas nesta categoria, por exemplo, aumento da superfície nuclear, formando múltiplos lóbulos, caracterizando um núcleo disforme; “notched nuclei”, núcleo com uma invaginação da membrana; ainda de acordo com este autor, núcleos “notched” parecem não conter material nuclear no local invaginado; “broken egg”, que podem estar unidos ao núcleo da célula principal por uma estrutura nucleoplasmática; “broto”, visualizado na periferia do núcleo e assim como os “broken egg” seriam o resultado do procedimento de expulsão do micronúcleo do núcleo principal da célula (KIRSCH-VOLDERS et al., 2002).

A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney, com nível de significância de 5%.

#### **4.5. Ensaio do cometa utilizando sangue periférico**

Para o ensaio do cometa, a metodologia utilizada foi a técnica alcalina, baseada em Singh et al. (1988) e Christofolletti et al. (2009). A princípio, as lâminas foram mergulhadas em agarose normal (ponto de fusão normal) 1,5% à 60°C, e posteriormente secas e armazenadas. Após a punção cardíaca, com seringas devidamente heparinizadas, uma amostra de 5 µL do sangue dos peixes foi diluída em 1.000 µL de PBS. As lâminas pré-gelatinizadas foram montadas com 10 µL da suspensão celular + 120 µL de agarose de

baixo ponto de fusão (0,5%) à 37°C. Posteriormente, foi adicionada uma lamínula sobre cada lâmina, levando-as à geladeira, por 20 minutos, para solidificação do gel. Decorrido este tempo, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram mantidas em solução de lise gelada e recém-preparada (1 mL de triton X-100, 20 mL de DMSO e 79 mL de solução de lise estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, pH 10,0-10,5), em geladeira, por no mínimo uma hora, protegidas da luz.

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

As lâminas foram acondicionadas à temperatura ambiente para a secagem e estocadas a seguir, para posterior análise.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Análises físico-químicas da vinhaça**

Pelas análises químicas realizadas no primeiro bioensaio, a vinhaça apresentou baixo pH, altos valores de DBO e DQO, bem como de potássio (2056 mg/L), como pode ser observado na tabela 1. No segundo bioensaio realizado, este resíduo também apresentou baixo pH, altos valores de DBO e DQO, bem como de potássio (3401 mg/L). Os valores obtidos para dureza e sulfato, comparando-se as duas coletas de vinhaça, foram bem distintos (Tabela 1).

**Tabela 1** – Características físico-químicas das duas amostras de vinhaça utilizadas.

<b>Parâmetro</b>	<b>Coleta 2010</b>	<b>Coleta 2011</b>	<b>Método</b>
<b>Amônia (mg/L)</b>	<LQ	<LQ	USEPA 440/5-85-001
<b>Cálcio (mg/L)</b>	719	671	SM21 3120 B
<b>Condutividade Elétrica (µs/cm)</b>	13530	15110	SM21 2510 B
<b>DBO (mg/L)</b>	5046	7941	SM21 5210 B
<b>DQO (mg/L)</b>	13380	25225	SM21 5220 D
<b>Dureza (mg CaCO<sub>3</sub>/L)</b>	2493	276	SM21 2340 B
<b>Fosfato total (mg/L)</b>	1,30	-	SM21 4500-P C
<b>Magnésio (mg/L)</b>	237	264	SM21 3120 B
<b>Nitrato (mg/L)</b>	1,30	1,49	SM21 4500- NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> F
<b>Nitrito (mg/L)</b>	0,008	0,033	SM21 4500- NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> B
<b>pH</b>	3,9	4,37	SM21 4500- H <sup>+</sup> B
<b>Potássio (mg/L)</b>	2056	3401	SM21 3120 B
<b>Resíduo não-filtrável (mg/L)</b>	2765	1800	SM21 2540 D
<b>Sódio (mg/L)</b>	50,2	114	SM21 3120 B
<b>Sulfato (mg/L)</b>	710	2993	SM21 4500- SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> E

LQ: limite de quantificação.

Em relação à presença de metais pesados, comparando as duas coletas de vinhaça realizadas observou-se que na primeira coleta, diferentes metais estavam presentes, em diferentes concentrações, como: bário, cobre, cromo, mercúrio, molibdênio, níquel e zinco. Diferentemente na segunda coleta, detectou-se apenas a presença de cobre e cromo (Tabela 2).

**Tabela 2-** Análises físico-químicas e de metais das duas amostras brutas de vinhaça.

<b>Parâmetro</b>	<b>Coleta 2010</b>	<b>Coleta 2011</b>	<b>Método</b>
<b>Arsênio</b>	<LQ	<LQ	SM21 3120B
<b>Bário</b>	0,41	<LQ	SM21 3120B
<b>Cádmio</b>	<LQ	<LQ	SM21 3120B
<b>Cálcio Total</b>	719	671	SM21 3120B
<b>Carbono Orgânico</b>	-	-	SSSA Cap40
<b>Chumbo</b>	<LQ	<LQ	SM21 3120B
<b>Cobre</b>	0,35	0,76	SM21 3120B
<b>Condutividade Elétrica (µs/cm)</b>	13530	15110	SM21 3120B
<b>Cromo</b>	0,04	3,56	SM21 3120B
<b>Enxofre Total</b>	1219	1681	SM21 3120B
<b>Fósforo Total</b>	-	207	SM21 3120B
<b>Magnésio Total</b>	237	264	SM21 3120B
<b>Mercúrio</b>	0,0019	<LQ	EPA 7470A
<b>Molibdênio</b>	0,008	<LQ	SM21 3120B
<b>Níquel</b>	0,03	<LQ	SM21 3120B
<b>Nitrato</b>	1,30	1,49	SM21 4500-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> E
<b>Nitrito</b>	0,008	0,03	SM21 4500-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> B
<b>Nitrogênio Amoniacal</b>	-	-	SM21 4500-NH <sub>3</sub> E
<b>Nitrogênio Kjeldahl</b>	267	171	SM21 4500-Norg B
<b>pH</b>	3,9	4,37	EPA 4095 C
<b>Potássio Total</b>	2056	3401	SM21 3120B
<b>Selênio</b>	<LQ	<LQ	SM21 3120B
<b>Sódio Total</b>	50,2	114	SM21 3120B
<b>Sólidos Totais</b>	-	-	SM21 2540B
<b>Sólidos Totais Voláteis</b>	-	-	SM21 2540B
<b>Teor de sólidos</b>	-	-	SM21 2540B
<b>Umidade</b>	-	-	SM21 2540B
<b>Zinco</b>	1,66	<LQ	SM21 3120B

**LQ:** Limite de quantificação;

## **5.2. Descrição dos resultados obtidos no teste do micronúcleo associado às anormalidades nucleares**

No primeiro bioensaio os peixes expostos às concentrações 5% e 10% morreram antes de completar 48 horas. Diferentemente do primeiro bioensaio, na repetição, os peixes da concentração 5% sobreviveram, o que pode ser explicado talvez pela diminuição da dureza da amostra e pela ausência de metais como o bário, mercúrio, molibdênio, níquel e

zinco, outrora quantificados pelas análises químicas da vinhaça utilizada no primeiro bioensaio.

Na análise dos eritrócitos micronucleados (Figura 1A) utilizados para avaliar o potencial mutagênico da vinhaça foi observado valores estatisticamente significativos quando comparados ao controle negativo, em ambos os bioensaios (Tabelas 3 e 4).

Comparativamente, os resultados obtidos na avaliação da genotoxicidade, entre o primeiro (Tabela 3) e o segundo bioensaios (Tabela 4) foram bem distintos. Eritrócitos com anormalidades tipo “notched” (Figura 1B) tiveram valores significativos apenas no segundo bioensaio, para as concentrações de 2,5% e 5% de vinhaça. Núcleos do tipo “blebbed” (Figura 1C) apresentaram valores estatisticamente significativos para todas as concentrações testadas, apenas no segundo bioensaio realizado. Os valores de eritrócitos portadores de núcleos do tipo “lobed” (Figura 1D) foram distintos entre os bioensaios; no primeiro, o controle positivo e a concentração de 1% de vinhaça foram considerados significativos, entretanto, no segundo, os valores foram significativos apenas nas concentrações de 2,5% e 5%. Assim como no primeiro bioensaio, os valores dos núcleos do tipo “broken-egg” (Figura 1E) foram significativos para a concentração de 1%, e também para 5%, no segundo bioensaio. Os brotos nucleares (Figura 1F), observados no segundo bioensaio, só não foram significativos na concentração 1%, ao contrário do obtido no primeiro bioensaio. Quando comparados ao controle positivo, todas as anormalidades foram significativas, com exceção do “broken-egg” apenas para a concentração mais alta, do segundo bioensaio.

Entretanto, em ambos os bioensaios realizados, as maiores concentrações apresentaram valores significativamente maiores para eritrócitos portadores de anormalidades nucleares e micronúcleos.

**Tabela 3** – Valores de média e desvio padrão de micronúcleos e anormalidades nucleares observados em eritrócitos de *O. niloticus*, expostos a vinhaça durante o primeiro bioensaio

Tratamento	MN	Notched	Blebbled	Lobed	Broken-egg	Binucleada	Broto
CN	0,4±0,54 <sup>#</sup>	97±16,4	55,22±20,1 <sup>#</sup>	9,4±3,8 <sup>#</sup>	0	0	0
CP	7,0±2,9 <sup>*a</sup>	105,4±41,78	82±18,3 <sup>*</sup>	20,4±4,7 <sup>*a</sup>	0	0,8±1,78	0
V1%	11,4±3,9 <sup>*a#</sup>	78,8±42,39	77,4±31,3	15,8±5,8 <sup>*</sup>	2,8±2,16 <sup>*#</sup>	0,2±0,44	11,3±11,79 <sup>*#</sup>

MN: micronúcleo; CN: controle positivo; CP: controle positivo; V1%: concentração de 1% de vinhaça.

\* valores estatisticamente significativos, pelo método de Mann-Whitney, com  $p < 0,05$ , quando comparados ao controle negativo.

<sup>a</sup> valores estatisticamente significativos, pelo método de Mann-Whitney, com  $p < 0,01$ , quando comparados ao controle negativo.

<sup>#</sup> valores estatisticamente significativos, pelo método de Mann-Whitney, com  $p < 0,05$ , quando comparados ao controle positivo.

**Tabela 4** – Valores de média e desvio padrão de micronúcleos e anormalidades nucleares observados em eritrócitos de *O. niloticus*, expostos a vinhaça durante o segundo bioensaio

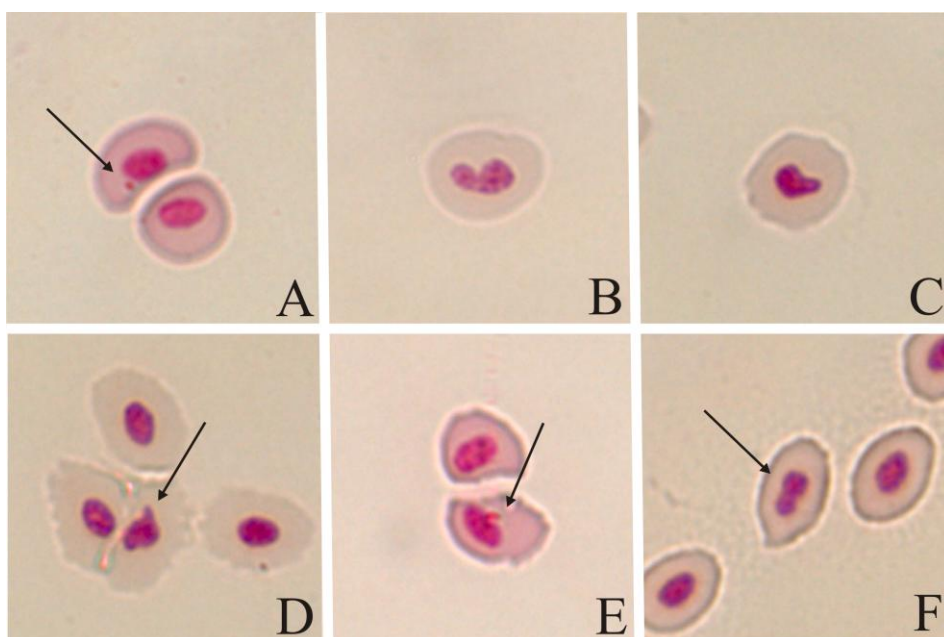
Tratamento	MN	Notched	Blebbled	Lobed	Broken-egg	Binucleada	Broto
CN	0	16,4±4,09	11,8±5,44	2,6±0,89	0,2±0,44	0	0,2±0,44
CP	3,6±1,14 <sup>*a</sup>	24,6±13,81	38±17,01 <sup>*</sup>	6,2±4,43	1±1,73	0	1,8±1,3 <sup>*</sup>
V1%	2,2±1,64 <sup>*a</sup>	25,4±18,46	40,6±27,3 <sup>*</sup>	4,2±2,04	2,4±2,19 <sup>*</sup>	0	3,66±4,13
V2,5%	4,2±1,48 <sup>*a</sup>	35,4±26,66 <sup>*</sup>	45,2±13,6 <sup>*a</sup>	8,2±5,89 <sup>*</sup>	1±1,41	0	3,8±2,77 <sup>*</sup>
V5%	5,4±0,54 <sup>*a#</sup>	59,8±18,83 <sup>*a#</sup>	64,6±14,17 <sup>*a#</sup>	17,2±6,05 <sup>*a#</sup>	1,8±1,3 <sup>*</sup>	0	6,4±2,88 <sup>*a#</sup>

MN: micronúcleo; CN: controle positivo; CP: controle positivo; V1%: concentração de 1% de vinhaça; V 2,5%: concentração de 2,5% de vinhaça; V5%: concentração de 5% de vinhaça.

\* valores estatisticamente significativos, pelo método de Mann-Whitney, com  $p < 0,05$ , quando comparados ao controle negativo.

<sup>a</sup> valores estatisticamente significativos, pelo método de Mann-Whitney, com  $p < 0,01$ , quando comparados ao controle negativo.

<sup>#</sup> valores estatisticamente significativos, pelo método de Mann-Whitney, com  $p < 0,05$ , quando comparados ao controle positivo.



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

### 5.3. Descrição dos resultados obtidos no ensaio do cometa

Nos bioensaios foram analisados, aproximadamente, 100 nucleóides de cada peixe para a determinação da frequência das classes de cometas. A frequência de nucleóides em cada classe de migração e o escore do dano foram utilizados como parâmetros para a avaliação da genotoxicidade. Para esta avaliação foram observadas todas as classes de migração dos cometas (Figura 2).

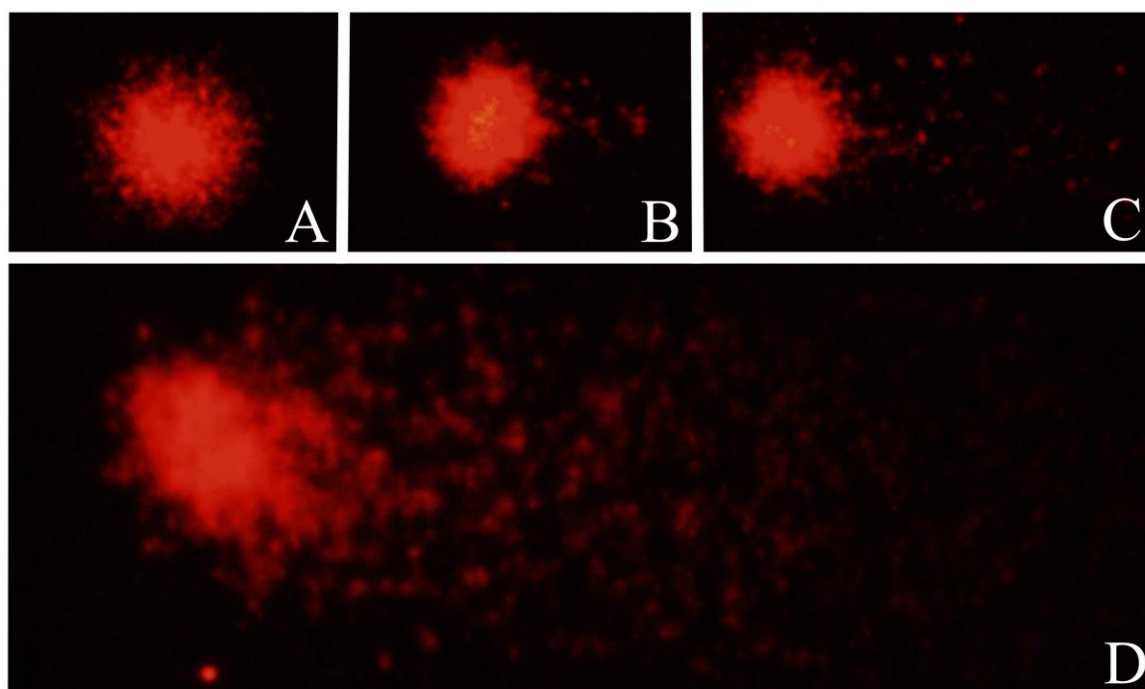
No primeiro bioensaio, examinando a distribuição dos cometas em cada classe, foram observados valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, apenas para os animais do controle positivo (Tabela 5).

**Tabela 5:** Média e desvio padrão de nucleóides com cometa e escore de danos em *O. niloticus* expostos à 1% de vinhaça, por 96 horas durante o primeiro bioensaio

Tratamento	Com Cometa	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Escore
CN	86,6±7,36	14,8±7,46	26±8,51	34,8±6,90	25,8±13,21	173±28,87
CP	99,4±2,70*	2,6±2,07*	10,2±5,06*	31,4±14,70*	57,8±20,09*	246,4±27,21*
V1%	96,4±4,63	7,4±4,87	24,2±4,65	39,6±3,57	30,2±6,05	194±18,66

CN: controle positivo; CP: controle positivo; V1%: concentração de 1% de vinhaça.

\* valores estatisticamente significativos, pelo método de Mann-Whitney, com  $p < 0,05$ , quando comparados ao controle negativo.



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

Diferentemente, no segundo bioensaio, apenas os cometas de classe 0 e 3 da concentração de 1% de vinhaça não foram significativos (Tabela 6). Os valores obtidos no segundo bioensaio revelaram um aumento no escore de danos de acordo com o aumento da concentração de vinhaça. Foi observado também valores maiores de cometas classe 3, com resposta dose-dependente.

**Tabela 6:** Média e desvio padrão de nucleóides com cometa e escore de danos em *O. niloticus* expostos às diferentes diluições de vinhaça, por 96 horas durante o segundo bioensaio

Tratamento	Com Cometa	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Escore
CN	66,4±8,64	35,6±9,44	31,8±8,31	17,4±7,43	17,2±4,32	113,2±17,76
CP	92,4±3,13*	10,8±1,92*	14,6±3,97*	27,6±7,12*	50,2±9,95*	220,4±13,46*
V1%	76,2±9,09*	25,4±8,82	21±5,33*	26,6±2,96*	28,6±12,75	115±31,93*
V 2,5%	81,8±4,96*	23,2±8,10*	17,2±4,6*	27±5,09*	37,6±10,01*	184±18,46*
V5%	88,8±6,83*	13,2±7,85*	14±1,22*	23,6±1,51*	51,2±7,25*	214,8±21,79*

CN: controle positivo; CP: controle positivo; V1%: concentração de 1% de vinhaça; V 2,5%: concentração de 2,5% de vinhaça; V5%: concentração de 5% de vinhaça.

\* valores estatisticamente significativos, pelo método de Mann-Whitney, com  $p < 0,05$ , quando comparados ao controle negativo.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo foram feitos dois bioensaios para avaliar o possível efeito tóxico de diluições de vinhaça. No primeiro, os peixes foram expostos a diluições de 1%, 5% e 10%, com base em estudos de Kumar e Gopal (2001) e Algur e Kadioglu (1992); porém provavelmente, à alta quantidade de matéria orgânica, os altos valores de DBO e DQO, e também à presença de alguns metais como níquel, mercúrio, bário e molibdênio, os peixes das concentrações 5% e 10% morreram, em menos de 48h. Já na repetição do bioensaio, tento em vista a mortandade dos peixes nas concentrações mais altas, foi adicionada ao desenho experimental uma diluição de 2,5%, para melhor compreensão dos possíveis efeitos tóxicos da vinhaça. Durante esse bioensaio, os peixes da concentração 10% não sobreviveram, muito provavelmente, devido à alta carga orgânica e alta DBO e DQO do efluente. Entretanto, diferentemente do primeiro bioensaio, os peixes da concentração 5% sobreviveram. Pelos resultados obtidos nas análises químicas, infere-se que a morte dos peixes da concentração 5%, no primeiro bioensaio, pode ter sido decorrente da presença de diferentes metais pesados, em diferentes concentrações, não detectados nas análises do segundo bioensaio.

Alguns autores afirmam que, muitas vezes, a vinhaça apresenta valores de metais pesados muito abaixo daqueles detectáveis pelo método analítico empregado (CAMIOTTI et al., 2007), porém como já foi descrito nas análises metais como bário,

cobre, cromo, mercúrio, molibdênio, níquel e zinco foram encontrados em concentrações relativamente altas.

Os efeitos deletérios dos metais pesados nos organismos são comprovados por muitos estudos. Steinkellner et al. (1998) afirmaram que muitos dos metais pesados podem provocar efeitos toxicológicos agudos e serem carcinogênicos. Como exemplo, tem-se o níquel, o qual demonstrou ser capaz de produzir efeitos adversos e/ou carcinogênicos aos humanos e animais (COOGAN et al., 1989; SUNDERMAN, 1989; OBONE et al., 1999).

Na avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade das diluições de vinhaça, por meio do teste do micronúcleo e outras anormalidades nucleares, observou-se que os valores de eritrócitos micronucleados apresentaram-se significativos para todas as concentrações testadas, em ambos os bioensaios realizados. No primeiro bioensaio, os valores de micronúcleos foram maiores do que os obtidos no segundo, provavelmente, devido a presença de diferentes metais como o bário, o cromo, o níquel (em concentração acima do permitido pela CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), mercúrio e molibdênio, detectados pelas análises químicas da primeira coleta e não observados na segunda. Tais resultados reforçam a importância das análises químicas de misturas complexas, tal como a vinhaça, pois podem auxiliar no esclarecimento dos efeitos observados nos organismos expostos e demonstrar que há uma variação de elementos químicos, o que deve ser considerado para a sua disposição na agricultura.

Embora todos os metais detectados pelas análises químicas na primeira coleta não o tenham sido para a segunda, observou-se que a concentração de cromo detectada na amostra de vinhaça da segunda coleta foi bem maior que a primeira. De acordo com a literatura, os íons cromo na sua forma trivalente são altamente benéficos, porém no seu estado de oxidação VI, esse elemento é classificado como mutagênico e carcinogênico em animais (QUEIROZ FERREIRA, 2002; MATSUMOTO et al., 2006). Uma vez que o efluente em estudo provém de uma destilaria, formas oxidadas desse elemento seriam extremamente possíveis.

Em relação as anormalidades nucleares, as mais encontradas foram os eritrócitos portadores de núcleos do tipo “notched”, “blebbed” e “lobed”, sendo esses significativos e em maior número nas maiores concentrações de vinhaça (2,5% e 5%). As anormalidades “broto” e “broken-egg” também foram significativas na maior concentração. De acordo com Grisolia (2005), essas anormalidades nucleares podem decorrer de alterações na estrutura do DNA, como quebras de fita simples ou quebras de fita dupla e da formação de adutos (ligação covalente de um elemento ou composto químico com as bases nitrogenadas do DNA), entre outros. Ainda de acordo com esse mesmo autor, uma provável causa da iniciação do câncer pode ser a formação dessas anormalidades nucleares, como resultado

da interação de compostos genotóxicos com o DNA. Caso não ocorra o reparo desta lesão, esta pode ser propagada para as células filhas. Assim, estas células podem permanecer latentes por muitos anos, acumulando novos danos, ou ainda, sofrerem uma exposição posterior a um agente promotor. As altas taxas de micronúcleos e outras anormalidades indicam prováveis efeitos mutagênicos e genotóxicos, respectivamente, principalmente nas concentrações maiores.

Os resultados obtidos pelo ensaio do cometa foram muito distintos, quando comparados os bioensaios realizados. Enquanto no primeiro não houve resultados significativos para a concentração de vinhaça 1%, no segundo, apenas os cometas de classe 0 e 3 da vinhaça 1% não foram significativos. Para as demais concentrações, tanto para nucleóides de classe 3, quanto para o escore da danos, observou-se uma relação dose-dependente. Por se tratar de um efluente cuja composição química pode variar, seus efeitos também podem ter alguma diferença, frente à presença/ausência e a concentração de metais pesados, o que contribui na obtenção dos diferentes resultados. Outro fator que pode ter contribuído para essa diferença nos resultados foi o lote de peixes utilizados no primeiro bioensaio, o qual estudos de morfologia realizados nas brânquias destes mesmos indivíduos revelaram a presença de parasitas (bactérias). Sabe-se que as bactérias produzem toxinas que irão fragilizar os peixes tornando-os vulneráveis à ação de fungos patogênicos.

Tendo em vista o cenário mundial, onde há crescente preocupação com o meio ambiente e valorização de combustíveis “verdes”, a perspectiva de crescimento do setor sulcroalcooleiro aumentam. Portanto, monitorar os efeitos dos efluentes na natureza é de extrema importância. Os resultados sugerem precaução no uso indiscriminado de vinhaça nos canais; embora esse resíduo possa atuar como fertilizante e ser benéfico para as plantas, esse efluente também pode ser lixiviado ou sofrer percolação no perfil de solo e chegar a corpos d’água ou lençóis subterrâneos, podendo contaminar assim o meio aquático, principalmente por metais pesados, que são conhecidamente mutagênicos e carcinogênicos.

O potencial tóxico da vinhaça tem que ser levado em consideração ao utilizar esse efluente diretamente no meio ambiente. Os dados obtidos neste estudo corroboram os de outros trabalhos, que afirmam que a vinhaça deve ser aplicada no meio com mais cautela e não apenas como um efluente que pode ser reaproveitado, dada elevada quantidade subproduzida de vinhaça - 160 bilhões de litros ao ano (JUNIOR et al., 2008).

## 7. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos no teste do micronúcleo e outras anormalidades em eritrócitos circulantes e no ensaio do cometa em peixes da espécie *O. niloticus*, expostos a três diferentes concentrações de vinhaça, pode-se concluir que:

- A concentração de 10% foi letal aos peixes, provavelmente devido a sua alta DBO, DQO e alta quantidade de matéria orgânica.
- A vinhaça nas concentrações 1%, 2,5% e 5% foi mutagênica, devido a significativa taxa de micronúcleos observados.
- As concentrações de 1%, 2,5% e 5% apresentou potencial genotóxico, frente às diversas anormalidades nucleares e a frequência de cometas observadas, sendo observada uma relação dose-dependente.
- Os valores significativos de frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares comprovaram que o teste do micronúcleo constitui uma metodologia eficiente na detecção dos potenciais mutagênico e genotóxico da vinhaça.
- Os valores significativos de frequência de cometas das diferentes classes para o segundo bioensaio comprovaram que o ensaio do cometa constitui uma metodologia eficiente na detecção do potencial genotóxico da vinhaça.
- *Oreochromis niloticus* se mostrou um eficiente organismo teste para o biomonitoramento de recursos hídricos contaminados pela vinhaça.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

ALGUR, O.F.; KADIOGLU, A.; The effects of vinasse on the growth, biomass and primary productivity in pea (*Pisum sativum*) and sunflower (*Helianthus annuus*). **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.39, p.139-144, 1992.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D.; Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, Amsterdam, v.323, p.121-135, 1995.

AL-SHAMSI, L.; HAMZA, W.; EL-SAYED, A.-F. Effects of food sources on growth rates and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v. 9, p. 447-455, 2006.

BALL-COELHO, B.; TIESSEN, H.; STEWART, J.W.B.; SALCEDO, I.H.; SAMPAIO, E.V.S.B. Residue management effects on sugarcane yield and soil properties in Northeastern Brazil. **Agronomy Journal**, Madison, v.85, p.1004-1008, 1993.

BRAYNER, F.M.M. **Determinação de taxas de retenção de metais-traço por sedimentos orgânicos em um viveiro de piscicultura em área estuarina e urbana.** São Carlos. Tese (Doutorado) – Escola de engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, 1998.

CALÇAS, D. A. N. Q. P. **Atenuação da Carga Orgânica do Chorume de Aterro Sanitário em Solos Arenosos Compactados.** 2001. p. 117 (Dissertação de Mestrado), Faculdade de Engenharia de Bauru, UNESP, Bauru-SP.

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

CAMILOTTI, F.; MARQUES, M.O.; ANDRIOLI, I.; DA SILVA, A.R.; JUNIOR, L.C.T.; NOBILE, F.O. Acúmulo de metais pesados em cana-de-açúcar mediante a aplicação de lodo de esgoto e vinhaça. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 27, n.1, p.284-293, 2007.

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

CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce.** Jaboticabal: FUNEP, p.81-86, 1992.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v.74, p.264-271, 2005.

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

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Variáveis de qualidade das águas**. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp#cobre>. Acessado em: 21/10/2011.

CHARO-KARISA, H.; KOMEN, H.; REZK, M. A.; PONZONI, R. W.; VAN ARENDONK, J. A. M.; BOVENHUIS, H. Heritability estimates and response to selection for growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in low-input earthen ponds. **Aquaculture**, v. 261, p. 479-486, 2006.

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

COLLINS, A. R. *et al.* The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research**, Amsterdam v. 375, n. 2, p. 183-193, 1997.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v.26, p.249–261, 2004.

COOGAN, T.P., LATTA, D.M., SNOW, E.T., COSTA, M. Toxicity and carcinogenicity of nickel compounds. **CRC Critical Reviews in Toxicology**, v. 19, p. 341–384, 1989.

CORMAK, D.H. (Ed.). Hams Histologia, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 5 e 35, 1991.

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

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

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

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

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**, 2011 DOI: 10.1177/0734242X10387313

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

FAUST, F.; KASSIE, F.; KNASMULLER, S.; BOEDECKER, R.H.; MANN, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. **Mutation Research**, v.566, p.209–229, 2004.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v.455, p.81–95, 2000.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B.P. The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, v.681, n.1, p.80-92, 2009.

FONTANETTI, C.S.; SOUZA, T.S.; CHRISTOFOLETTI, C. A. The role of biomonitoring in the quality assessment of water resources. In.: BILIBIO, C.; HENSEL, O.; SELBACH, J. (Org.). **Sustainable water management in the tropics and subtropics and cases studies in Brazil – vol. 3**. Fundação Universidade Federal do Pampa: UNIKASSEL. pp.975-1006, 2012.

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

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

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

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

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

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

HAMADA, J.; CASTILHO FILHO, G.S.; FARIA, S.; CINTRA, F.H. Aplicabilidade de processos físico e físico-químico no tratamento do chorume de aterros sanitários. In: VI Simpósio Luso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Vitória-ES, 2002. Disponível em: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/sibesa6/cxxiii.pdf> Acesso em: 12/03/2012

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

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

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

HOSHINA, M.M., ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. **Mutation Research**, v.656, p.44-48, 2008.

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

HUBER, R.; STRENT, S.; BAUCHINGER, M. The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry. **Mutation Research**, v.111, p.185-193, 1983.

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

KIM, I.; HYUN, C. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.64, p.288-297, 2006.

KIRSCH-VOLDERS M.; VANHAUWAERT A.; BOECK M. D.; DECORDER I.

Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, v.504, p. 137-148, 2002.

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE Jr., M.; KIRCHNER, S.; LORGE, E.; MORITA, T.; NORPPA, H.; SURRALLE, J.; VANHAUWAERT, A.; WAKATA, A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research**, v.540, p.153-163, 2003.

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

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

KUMAR, S.; VISWANATHAN, L. Production of biomass, carbon dioxide, volatile acids, during distillery waste treatment by bacterial strains. **Enzyme Microbial Technology**, New York, v.13, n.2, p.179-187, 1991.

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

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

MAJER, B.J.; GRUMMT, T.; UHL, M.; KNASMULLER, S. Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment. **Acta Hydrochim. Hydrobiology**, v.33, p.45–55, 2005.

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

MELO, A. S. S. A.; SILVA, M. P. Estimando o valor da “externalidade positiva” do uso da vinhaça na produção de cana de açúcar: um estudo de caso. Disponível em: <[http://www.ecoeco.org.br/conteudo/publicacoes/encontros/iv\\_en/ Mesa4/2.pdf](http://www.ecoeco.org.br/conteudo/publicacoes/encontros/iv_en/ Mesa4/2.pdf)> Acessado em 14 de Fevereiro de 2012.

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

MERSCH, J; BEAUVAIS, M.N. The micronucleus assay in the *Zebra mussel*, *Dreissena polymorpha*, to *in situ* monitor genotoxicity in freshwater environments. **Mutation Research**, v. 393, p. 141-149, 1997.

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

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**, Piracicaba, v.44, p.132-137, 2011.

MONTEITH, D.K.; VASTONE, J. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of the DNA damage. **Mutation Research**, v.345, n.3-4, p.97-103, 1995.

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

NAVARRO, A.R.; SEPÚLVEDA, M.C.; RUBIO, M.C. Bio-concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses. **Waste Management**, v.20, p. 581-585, 2000.

OBONE, E., CHAKRABARTI, S.K., BAI, C., MALICK, M.A., LAMONTAGNE, L., SUBRAMANIAN, K.S.. Toxicity and bioaccumulation of nickel sulfate in Sprague–

Dawley rats following 13 weeks of subchronic exposure. **Journal of Toxicology Environmental Health**. v. 57, p. 379–401, 1999.

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

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

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

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

PAOLIELLO, J. M. M.; SILVA, C. L.. **Aspectos ambientais e potencial energético no aproveitamento de resíduos da indústria sulcroatoolceira**. 2006. 174 páginas. (Dissertação de Mestrado), Faculdade de Engenharia de Bauru, UNESP, Bauru-SP.

PEÑA, L.F. **Uso do teste de micronúcleo em eritrócitos circulantes de peixes para a monitoração de um local do rio Tibagi e avaliação da genotoxicidade de agrotóxicos em bioensaios**. 1996. 199 f. Dissertação (mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.

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

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

RAGUGNETTI, M.; ADAMS, M.L.; GUIMARÃES, A.T.B.; SPONCHIADO, G.; VASCONCELOS, E.C.; OLIVEIRA, C.M.R. Ibuprofen Genotoxicity in Aquatic Environment: An Experimental Model Using *Oreochromis niloticus*. **Water, Air and Soil Pollution**. v.218, p.361-364, 2011.

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

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

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

SERRANO-GARCIA, L.; MONTERO-MONTOYA, R. Micronuclei and chromatine buds are related genotoxic events. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.38, p.38–45, 2001.

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

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

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

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M.J. The aveluation of the waste, surface and group water quality using the Allium test procedure. **Mutation Research**, Slovenia, v.368, p.171-179, 1996.

SOUZA V.H.E.; SOARES, C.H.L.; CANTAGALLI, L.B.; VICENTINI, V.E.P. **Utilização de testes citogenéticos para avaliação de mutagênese ambiental**. 2005. Disponível em: <<http://www.pec.uem.br/dcu/Trabalhos/6laudadas/SOUZA,%20Vitor%20Hugo%20Enumo%20de.pdf>>. Acesso em: 14/02/2012.

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

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

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

STEINKELLNER, H., MUN-SIK, K., HELMA, C., ECKHER, S., MA, T.H., HORAK, O., et al. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.31, p. 183-191, 1998.

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

SUNDERMAN Jr., F.W. Mechanisms of nickel carcinogenesis. **Scandinavian Journal of work, environment and health**, v. 15, p. 1–12, 1989.

UNICA – União da Indústria da cana-de-açúcar do estado de São Paulo. Produção de álcool do Brasil. UNICA, 2007. Disponível em: <http://www.portalunica.com.br/portalunica/index.php?Secao=referência&SubSecao=estatísticas&SubSacao=produção%20Brasil&id=%20and%id=9> Acesso em: 21/02/12.

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

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

WHITE, P.A.; RASMUSSEN J.B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface Waters. **Mutation Research**, v.410, p.223-236, 1998.

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

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