

---

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

---

**LUIZA FIGUEIREDO SARDINHA**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA VINHAÇA TRATADA  
UTILIZANDO FÍGADO DE PEIXES *Oreochromis niloticus*  
COMO MODELO**

LUIZA FIGUEIREDO SARDINHA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA VINHAÇA TRATADA  
UTILIZANDO FÍGADO DE PEIXES *Oreochromis niloticus*  
COMO MODELO**

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

Co-orientador: Ana Claudia de Castro Marcato

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 Bacharela e  
Licenciada em Ciências Biológicas.

Rio Claro  
2017

574.82 Sardinha, Luiza Figueiredo  
S244a Avaliação da toxicidade da vinhaça tratada usando fígado  
de peixes *Oreochromis niloticus* como modelo / Luiza  
Figueiredo Sardinha. - Rio Claro, 2017  
47 f. : il., tabs., fots.

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

Orientadora: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

Coorientadora: Ana Claudia de Castro Marcato

1. Histologia. 2. Tilápia. 3. Histopatologia. 4.  
Ecotoxicologia. 5. Vinhaça. I. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus, por todas as bênçãos concedidas e pelo amparo espiritual em todos os momentos durante estes cinco anos;

Agradeço aos meus pais, Maria Elizabete Mantuani de Figueiredo Sardinha e Erasmo Carlos Sardinha, por serem incríveis e terem permitido a realização de mais um sonho, respeitando minhas decisões e me dando todo o suporte necessário à conquista dos meus objetivos;

Agradeço à minha família por todo o apoio, que mesmo à distância, não falhou nos momentos mais urgentes.

Agradeço ao meu namorado, Lucas Baldin, que em pouco tempo conseguiu demonstrar o real significado de companheirismo e por todos os momentos de amor, amadurecimento e paciência.

Agradeço a todos os meus amigos, mas de forma especial, a República Bagaceira (Murillo Papais, Caio Belucci, Eduardo Misina, Leonardo Yamashiro, Lucas Baldin, Lucas Brinatti, Rodrigo Campos, Pedro Zanin e Victor Albuquerque) pelo acolhimento e pelos momentos maravilhosos que me tornaram agregada desta casa; agradeço ainda, Caroline Mafra, Gabriela Mestriner Zambone, Maria Luisa Fonseca, Raquel Gasparini Martins e Rômulo Bortolozzo, pela amizade indescritível e por toda a união.

Agradeço a minha orientadora, Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti, por ter dado a oportunidade de conhecer a Ecotoxicologia Aquática e a área acadêmica e por todo o suporte durante estes três anos em que fiz parte de seu grupo de pesquisa; o meu obrigada, ainda, a este grupo, pela parceria e pelos momentos de trabalho e lazer compartilhados;

À minha co-orientadora, Ana Cláudia de Castro Marcato, minha eterna gratidão ao apoio em todos os trabalhos, mas principalmente, pela companhia e amizade fora da instituição; e por ter dividido, além de um apartamento, alegrias e tristezas diariamente.

Agradeço a UNESP e a todos os professores, como um todo, que possibilitaram o meu engrandecimento profissional e pessoal.

Por fim, agradeço a FAPESP pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Com o aumento da população e, conseqüentemente, do consumo e das atividades industriais, a integridade dos ecossistemas aquáticos tem sido ameaçada, uma vez que são os principais receptores de efluentes tóxicos, tal como a vinhaça. A vinhaça, subproduto da produção de álcool a partir da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), é utilizada, principalmente no Brasil, como fertilizante. Esta substância apresenta significativo poder poluente aos recursos hídricos devido à sua alta concentração de matéria orgânica. Os peixes são excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, pois alertam sobre o potencial perigo de substâncias químicas ou sobre a possibilidade da poluição ambiental. Várias respostas observadas nestes organismos são excelentes biomarcadores, como por exemplo, a histopatologia do fígado, órgão que possui capacidade de acumular substâncias por exposição direta a poluentes presentes nas águas de rios e mares, ou por exposição indireta, por meio da cadeia alimentar do ecossistema. Diante do exposto, este projeto teve por finalidade analisar a toxicidade da vinhaça em diferentes diluições utilizando análises histológica e histoquímicas no fígado de peixes da espécie *Oreochromis niloticus*, expostos em ensaios laboratoriais. As análises físico-químicas da água dos aquários, após adição da vinhaça tratada (correção do pH com cal), indicaram aumento do pH e redução considerável dos níveis de DBO e DQO. Durante o bioensaio não houve mortalidade dos peixes. As análises histoquímicas para a detecção de proteínas e de polissacarídeos não mostraram alteração neste estudo, quando comparadas ao grupo controle. Nas análises histológicas, as alterações estatisticamente significativas foram degeneração hidrópica, perda de integridade citoplasmática dos hepatócitos, perda de limite citoplasmático dos hepatócitos e desorganização do tecido hepático. O aparecimento destas anormalidades sugere que a vinhaça apresenta potencial tóxico mesmo após tratamento para ajuste de pH.

## SUMÁRIO

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                               | 6  |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>                                    | 9  |
| 2.1 A problemática da contaminação da água                         | 9  |
| 2.2 A vinhaça                                                      | 10 |
| 2.3 Peixe como bioindicador para monitoramento ambiental           | 14 |
| 2.4 Histopatologia do fígado como biomarcador da poluição aquática | 16 |
| <b>3. OBJETIVOS</b>                                                | 19 |
| 3.1 Objetivo geral                                                 | 19 |
| 3.2 Objetivos específicos                                          | 19 |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>                                       | 19 |
| 4.1 Materiais Biológicos                                           | 19 |
| 4.2 Vinhaça                                                        | 19 |
| 4.3 Métodos                                                        | 20 |
| 4.3.1 Análise físico-química da vinhaça                            | 20 |
| 4.3.2 Bioensaios com <i>O. niloticus</i>                           | 20 |
| 4.3.3 Dissecção dos animais                                        | 20 |
| 4.3.4 Técnica para análise histológica                             | 20 |
| 4.3.5 Técnicas para análises histoquímicas                         | 21 |
| 4.3.6 Documentação e interpretação dos resultados                  | 21 |
| <b>5. RESULTADOS</b>                                               | 23 |
| 5.1 Análises físico-químicas da vinhaça                            | 23 |
| 5.2 Observação do bioensaio                                        | 23 |
| 5.3 Análise histológica                                            | 23 |
| 5.4 Análise histoquímica                                           | 24 |
| <b>6. DISCUSSÃO</b>                                                | 24 |
| <b>7. CONCLUSÃO</b>                                                | 27 |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                               | 28 |
| <b>9. ANEXOS</b>                                                   | 42 |

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 9.1 Anexo A – Tabela 1 ..... | 42 |
| 9.2 Anexo B – Tabela 2 ..... | 43 |
| 9.3 Anexo C – Tabela 3 ..... | 44 |
| 9.4 Anexo D – Tabela 4 ..... | 45 |
| 9.5 Anexo E – Figura 1 ..... | 46 |
| 9.6 Anexo F – Figura 2 ..... | 47 |



## 1. INTRODUÇÃO

A integridade dos ambientes aquáticos e bacias hidrográficas está diretamente relacionada ao uso e manejo da água, que além de sua versatilidade, é essencial ao desempenho de funções vitais dos seres vivos (MERTEN; MINELLA, 2002). Assim, os ecossistemas aquáticos são caracterizados de acordo com a complexidade dos diferentes usos da água pelo homem, sendo destinados desde o abastecimento de água, navegação, geração de energia, irrigação, agricultura, até a harmonia paisagística (von SPERLING, 1993). Desta forma, os meios de utilização deste recurso estimulam significativamente a degradação ambiental e a disponibilidade de água com alta qualidade, acarretando múltiplos problemas ao seu aproveitamento (PEREIRA, 2004).

O uso urbano e a atividade industrial podem perturbar um ambiente aquático e os seres vivos dele dependentes, por exemplo, com o despejo de efluentes. Esses, que podem conter substâncias tóxicas como pesticidas e metais (VEGA, 1996), são capazes de causar graves consequências para a saúde humana, principalmente à população residente em áreas próximas de despejo (HOUK, 1992) como o câncer, anomalias reprodutivas e malformações congênitas (MORAES, 2002).

A toxicidade aguda representa o primeiro nível de impacto no ecossistema aquático. Sabendo-se que diversas descargas industriais contêm variadas substâncias que são capazes de reduzir, em longo prazo, a sobrevivência de um organismo (WHITE, 1996), faz-se necessário o aprimoramento do modo de utilização destes resíduos, que frequentemente têm sido lançados indiscriminadamente ao meio ambiente.

O uso de biocombustíveis a partir de fontes renováveis é um desafio global (ALVES et al., 2015) e, visto seu baixo impacto ambiental, é essencial para a redução da emissão dos gases de efeito estufa e da dependência de combustíveis fósseis (SAVAGE, 2011). Neste setor, a cana-de-açúcar é considerada uma grande alternativa, devido a produção de etanol em larga escala e seus respectivos produtos, revelando-se muito importante ao agronegócio brasileiro (CONAB, 2017).

Com a expansão da indústria sucroalcooleira, há também, um aumento de agrosresíduos, causando impactos significativos ao meio ambiente. Desta forma, o monitoramento destes efluentes é de suma importância, visto que são produzidos em larga escala e que seu descarte e reutilização podem ser realizados de forma inadequada (MARINHO et al., 2014).

A vinhaça, popularmente conhecida como vinhoto, restilo ou garapão é o líquido residual da fermentação do álcool. Além da possibilidade de sofrer percolação e atingir lençóis

freáticos, lagos e rios (GEMTOS et al., 1999; FREIRE; CORTEZ, 2000; GIANCHIN; FERRAZ, 2009; LAIME et al., 2011), quando disponibilizada no solo em altas proporções, pode acarretar o comprometimento da qualidade da produção sucroalcooleira e a salinização do solo (SILVA et al., 2007a).

Diante do grande estímulo do governo à produção do álcool como combustível, o volume de vinhaça produzido tem aumentado significativamente. Além disso, em virtude de seus elevados níveis de matéria orgânica, da sua diluição de potássio e da interferência que podem causar nas propriedades físico-químicas e biológicas no solo, a vinhaça tem sido utilizada de modo intensificado como fertilizante, no aprimoramento dos solos no manejo das lavouras (DEMATTE et al., 2004; SILVA, 2006; AZEREDO, 1983; SANTOS, 2010).

O volume de vinhaça gerado pelas usinas é de 10 a 15 litros para cada litro de álcool produzido (CORTEZ, 1992; YESILADA, 1999; KUMAR; GOPAL, 2001). Do total de cana-de-açúcar da safra de 2016/2017, foram produzidos aproximadamente 27,3 bilhões de litros de álcool (ÚNICA, 2017), gerando um total aproximado de 273 bilhões de litros de vinhaça. Assim, levando-se em consideração a potencialidade de seus efeitos tóxicos e que o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo (DEMATTE, 2004; CONAB, 2017), a incipiência e a viabilidade técnica e econômica de seu tratamento no país são de grande importância (CABELLO, 2009).

Segundo a literatura, a vinhaça pode ser tratada tanto por processos biológicos ou físico-químicos, que podem reduzir a toxicidade pela degradação de componentes orgânicos. Os processos físico-químicos normalmente envolvem reagentes para oxidar compostos orgânicos, enquanto que os tratamentos biológicos são classificados como técnicas aeróbicas ou anaeróbicas (BOTELHO et al., 2012). Alguns tratamentos e usos alternativos vêm sendo desenvolvidos, como sua reciclagem na fermentação, fertirrigação, concentração por evaporação e produção de energia e levedura (CHRISTOFOLETTI et al., 2013a).

Assim, tem-se examinado dados disponíveis para o seu melhor conhecimento a partir da caracterização de sua composição química para usos alternativos no Brasil, além de seus efeitos sob as propriedades dos solos, germinação de sementes, e seu uso como bioestimulante e contaminante ao meio ambiente (CHRISTOFOLETTI et al., 2013b).

Ensaio ecotoxicológicos em laboratório que utilizam organismos teste, como diplópodos, moluscos, anfíbios e peixes (MARCATO et al., 2014; FRANCISCO et al., 2015; ANSOAR-RODRÍGUEZ et al., 2016; CHRISTOFOLETTI et al., 2016; NOGAROL et al., 2016; CORREIA et al., 2017a, b), têm sido utilizados como ferramentas fundamentais na avaliação dos riscos potenciais dos resíduos para o meio ambiente. Estes testes permitem uma

avaliação integrada de toxicidade que contempla os efeitos antagônicos dos contaminantes, além de indicarem o efeito dos subprodutos oriundos da degradação de contaminantes nos resíduos, complementando as análises químicas tradicionais (PANDARD et al., 2006; DOMENE et al., 2007; WILKE et al., 2008; NATAL-DA-LUZ et al., 2009a, 2009b; MOSER; RÖMBKE, 2009; CESAR et al., 2014).

Considerando que as respostas e efeitos biológicos não podem ser previstos apenas por análises químicas (MONFERRÁN et al., 2011), os biomarcadores têm sido utilizados como uma ferramenta confiável para avaliar o impacto de diversas substâncias em ambientes aquáticos (VAN DER OOST et al., 2003; BENINCÁ et al., 2012). Os organismos bioindicadores carregam informações sobre seu habitat natural e são capazes de responder aos estágios iniciais da exposição aos xenobióticos presentes no meio ambiente (FRANZLE, 2003; LI et al. 2010).

Os peixes vêm sendo cada vez mais utilizados no monitoramento aquático, devido sua alta sensibilidade às alterações no meio ambiente e seu potencial de detectar riscos associados à contaminação do meio (LAKRA; NAGPURE, 2009). As análises histopatológicas nestes animais permitem a rápida detecção de lesões em diferentes órgãos que desempenham funções vitais, expostos a diferentes contaminantes químicos (JOHNSON et al., 1993; AU, 2004; LAKRA; NAGPURE, 2009).

O fígado é a maior glândula dos vertebrados e é o órgão responsável pelo armazenamento de nutrientes que serão utilizados por outros órgãos. Este é constituído por hepatócitos com núcleos esféricos, dispostos em cordões concêntricamente arranjados ao redor de capilares sanguíneos (sinusóides), sendo, portanto, muito irrigado. As células hepáticas possuem funções vitais, como a metabolização de proteínas, lipídios e carboidratos (glicogênio), processamento e armazenamento dos nutrientes absorvidos no trato digestivo, desintoxicação do organismo, hematopoese durante a fase larval, além de estarem envolvidas na produção de anticorpos (VERLAG, 1982; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Entre os peixes teleósteos, como a tilápia do Nilo (*O. niloticus*), o fígado é o principal órgão de biotransformação de xenobióticos orgânicos (HEALTH, 1995; HINTON, 2001). Diversos estudos relatam que alterações histopatológicas deste órgão estão intimamente relacionadas com o acúmulo de toxinas durante o processo de desintoxicação e consequente degeneração dos hepatócitos, que acaba por limitar as funções vitais do fígado, prejudicando o organismo como um todo (SIMONATO et al., 2008; JIRAUNGKOOSKUL et al., 2002). Hinton et al. (1992) relataram que a relação entre danos em peixes e poluição ambiental pode

ser detectada observando a histopatologia do fígado, uma vez que este órgão pode exibir diversas alterações morfológicas em condições tóxicas.

Neste sentido, diante da problemática exposta sobre a contaminação de recursos hídricos por resíduos industriais, faz-se relevante o estudo da toxicidade da vinhaça tratada em organismos de ambientes aquáticos. Assim este projeto teve por finalidade, constatar e analisar semiquantitativamente o possível potencial tóxico e citotóxico da vinhaça de cana-de-açúcar tratada com cal, para ajuste de pH, utilizando análises histológica e histoquímicas dos fígados de tilápias do Nilo como modelo.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 A problemática da contaminação da água**

A água é um recurso mineral finito indispensável à manutenção das funções vitais dos seres vivos. Proporcionalmente ao aumento da população, e consequentemente ao consumo, aumentou-se a preocupação com sua conservação, integridade e aprimoramento de sua qualidade, proporcionados pela conscientização do uso racional deste fator (BIAGINI et al., 2009).

O termo “qualidade da água” não está relacionado apenas a um estado de pureza, mas às características físicas, químicas e biológicas, que são utilizadas como referência para determinar diferentes finalidades para a água. Sendo assim, alguns parâmetros são estabelecidos pelo CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), com o intuito de classificar e definir os limites aceitáveis de elementos estranhos nos corpos d’água, considerando os diferentes usos (MERTEN; MINELLA, 2002).

Com a versatilidade deste solvente universal e a riqueza de recursos hídricos no Brasil, seu uso, mediante o descaso e desperdício crescentes da população, tem sido utilizado para o descarte de efluentes urbanos e industriais. Estes, muitas vezes tóxicos, podem deteriorar o ecossistema aquático e a biota nele residente (VEGA, 1996), além de causar graves consequências à saúde humana.

O potencial poluidor das atividades antrópicas próximas às superfícies de águas subterrâneas, tem sido considerado base primária para o manejo deste recurso, através da implementação de políticas preventivas (NESHAT et al., 2013).

Em relação ao cultivo de cana-de-açúcar no Brasil, os agrotóxicos podem ser transportados e, consequentemente, atingir os recursos hídricos de diferentes formas, como o

lançamento intencional, o escoamento superficial dos locais de sua aplicação, volatilização e dispersão atmosférica e pela lixiviação do produto no solo até alcançar o lençol freático (ARANA et al., 2017).

A vinhaça, ao acarretar modificações nas propriedades físicas do solo, pode aumentar ou reduzir a capacidade de infiltração da terra, promovendo, respectivamente, a contaminação de lençóis freáticos e a elevação do escoamento, com possível contaminação de águas superficiais. Ademais, os mecanismos de recarga de lençóis freáticos e aquíferos são controlados essencialmente pelos eventos de chuva. Sendo assim, a água pluvial ao atingir o solo contendo vinhaça, pode infiltrar ou escoar superficialmente, poluindo os corpos d'água (SILVA et al., 2007b).

Com utilização constante de agroquímicos, como os fertilizantes, e o consequente aumento de suas concentrações na água e no solo, grande parte da população e de áreas agrícolas sofrem com a contaminação por metais (VODELA et al., 1997; RATTAN et al., 2005; RASHED, 2010; CHOTPANTARAT et al., 2011; CHOTPANTARAT; SUTTHIRAT, 2011; TABOADA-CASTRO et al., 2012).

O consumo direto ou indireto de água contaminada é capaz de causar graves problemas à saúde humana, principalmente entre as populações mais pobres e que vivem em locais de infraestrutura precária. Desta forma, atualmente, a contaminação aquática por dejetos industriais e urbanos é crescentemente preocupante e medidas profiláticas são necessárias, sobretudo ao que diz respeito à instalação de estação de tratamento de esgotos antes de sua eliminação e a utilização de métodos que proporcionem água potável (SANTOS et al., 2013a).

A água pode ser avaliada por parâmetros biológicos, que são baseados em respostas dos organismos inseridos neste meio (FONTANETTI et al., 2012). Assim sendo, biomonitoramento, em sua melhor definição, é o uso sistemático das respostas de organismos vivos para a avaliação de mudanças no meio ambiente, geralmente causada por atividades antropológicas (BUSS et al., 2003). Considerando-se a importância de reduzir os riscos à saúde humana e da preservação do ecossistema aquático, o uso de biomarcadores genéticos e morfológicos, constituem boas ferramentas para estes fins (FONTANETTI et al., 2012).

## **2.2 A vinhaça**

No Brasil, o cultivo da cana-de-açúcar está diretamente relacionado ao desenvolvimento econômico (ÚNICA, 2015) e o país possui 61,8% das exportações mundiais de açúcar (MAPA, 2016). Além disso, tem relevante destaque mundial no setor sucroenergético, apresentando progressiva expansão na produção de açúcar e de biocombustível etanol (RODRIGUES;

ORTIZ, 2006). Segundo Demattê et al. (2004), o governo federal brasileiro estimula a produção de álcool como combustível, visando o crescimento em investimentos, subsídios e rendimento, dado a sua elevada produtividade de cana-de-açúcar.

Além da razão econômica, a utilização dos biocombustíveis, ou mais especificamente, do bioetanol, foi incentivada desde 1970 até os dias atuais, devido à preocupação com as emissões veiculares e com a qualidade do ar. Desta forma, o papel do bioetanol consiste em auxiliar na redução da emissão dos gases do efeito estufa e substituir parcialmente o petróleo/combustíveis fósseis (LEITE; LEAL, 2007).

Os subprodutos e resíduos da cana-de-açúcar, ainda, podem ser utilizados para a fabricação de ração animal, cogeração de energia elétrica e fertilizantes para as lavouras (NOCELLI et al., 2017). Sendo assim, com o aumento do manejo das lavouras aumentando gradativamente, têm-se estimulado o aprimoramento dos solos, com a utilização de fertilizantes (SILVA, 2006).

Embora a produção sucroalcooleira economicamente traga muitos benefícios, o despejo de resíduos com substâncias tóxicas é um dos maiores responsáveis pela degradação de ecossistemas aquáticos, por isso, faz-se necessário o cuidado e o aprimoramento de seu manejo, bem como os estudos de seus impactos ambientais.

Sendo a fonte de poluição a principal causa da degradação da qualidade da água em áreas urbanas, as atividades humanas podem ser responsáveis pela alteração das propriedades destes ambientes (SILVA et al., 2011; SANTOS et al., 2013b). Entre os poluentes orgânicos de grande impacto ambiental estão os resíduos agroindustriais, como a vinhaça (CAMPOS et al., 2014).

A vinhaça é um líquido residual da fermentação do álcool, produzida em vários países do mundo e em diferentes regiões brasileiras (CAMARGO et al., 2009; GIANCHINI; FERRAZ, 2009; WILKIE et al., 2000). Suas propriedades constituem-se de alta concentração de matéria orgânica, baixo pH, cor escura, alta corrosividade, elevados índices de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), além de elevada temperatura na saída dos destiladores (FREIRE; CORTEZ, 2000; GIANCHINI; FERRAZ, 2009; LAIME et al., 2011).

O uso da vinhaça como fertilizante tornou-se comum nas refinarias de cana-de-açúcar por volta de 1980 (CORAZZA, 1996) e é uma alternativa focada no uso racional de recursos naturais, que previne o despejo desta nos rios (GIANCHINI; FERRAZ, 2009).

No Brasil existem algumas leis e decretos a respeito da utilização de resíduos agroindustriais na agricultura. Especificamente para a vinhaça, a Portaria do Ministério do Interior n. 323 de 29/11/1978, garante a partir da safra 1979/1980, a proibição do lançamento

direto ou indireto, do vinhoto, em qualquer coleção hídrica, pelas destilarias de álcool instaladas ou que venham a se instalar no país (SILVA et al., 2006).

A fertirrigação consiste na infiltração de vinhaça bruta no solo através da irrigação de canaviais (CAMARGO et al., 2009). Quando aplicada *in natura* no solo, além de irrigar, faz a fertilização da plantação, diminuindo os custos com fertilizantes químicos (LAIME et al., 2011). Desta forma, a aplicação da vinhaça modifica as propriedades químicas e edáficas do solo, visto que há alteração de pH e de teores de potássio trocáveis (SILVA et al., 2014), fornecendo algumas substâncias para as plantas (SILVA, 2007b). Sendo assim, as indústrias sucroalcooleiras utilizam o reuso de resíduos como uma alternativa econômica, pois reduzem gastos com adubos, reutilizam subprodutos gerados pelas próprias usinas e solucionam o problema de sua destinação final (SILVA et al., 2015; CHRISTOFOLETTI et al., 2017).

Dentre as alternativas desenvolvidas para o uso da vinhaça, a fertirrigação é a mais utilizada, devido ao seu baixo investimento inicial, custo baixo de sua manutenção, rápida aplicação, a não exigência de tecnologias complexas, além de determinar aumento na produção (CAMARGO et al., 2009; SANTANA; MACHADO, 2008). Entretanto, visto seus impactos ambientais, atualmente muitos estudos de sua toxicidade vêm sendo realizados (CARMO et al., 2012; CHRISTOFOLETTI et al., 2013b; OLIVEIRA et al., 2013; PAREDES et al., 2014; PEDRO-ESHER et al., 2014; MARINHO et al., 2014; CORREIA et al., 2017a).

Com a produção da vinhaça em larga escala e sua disposição inadequada e indiscriminada nos solos, tratamentos e usos alternativos vêm sendo desenvolvidos, como sua reciclagem na fermentação, fertirrigação, concentração por evaporação e produção de energia e levedura. Têm-se examinado dados disponíveis para o seu melhor conhecimento a partir da caracterização de sua composição química para usos alternativos no Brasil, além de seus efeitos sobre as propriedades dos solos, germinação de sementes, e seu uso como bioestimulante e contaminante ao meio ambiente (CHRISTOFOLETTI et al., 2013a).

Alguns estudos comprovam que a aplicação contínua da vinhaça *in natura* no solo é benéfica, contribuindo para o crescimento e produtividade da cultura de cana-de-açúcar (GOMEZ; RODRIGEZ, 2000; CHRISTOFOLETTI et al., 2017). Além disso, a substituição de fertilizantes químicos diminuiu a mudança climática, a acidificação terrestre, impactos de toxicidade aos humanos e manteve os parâmetros de água e solo em boas condições, quando comparados aos fertilizantes químicos.

O reaproveitamento da vinhaça tem se mostrado, portanto, importante na agricultura e tendo os seus efeitos tóxicos conhecidos, muitas tecnologias vêm surgindo com o intuito de

reduzir sua toxicidade e realizar seu tratamento (MOHANA et al., 2009; CHRISTOFOLETTI et al., 2017).

Christofoletti et al. (2013b, 2016) e Pedro-Esher (2014, 2016) apontaram o potencial tóxico da vinhaça, utilizando diferentes bioindicadores, ressaltando a importância da moderação de sua aplicação, mesmo com a viabilidade econômica desta prática.

Christofoletti et al. (2013b), por exemplo, observaram a redução da toxicidade de resíduos como a vinhaça da cana-de-açúcar, depois de seu bioprocessamento por diplópodos.

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*, *D. 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.

Botelho et al. (2012) avaliaram a redução da toxicidade da vinhaça por meio da correção do pH em hidróxido de sódio, utilizando *Ceriodaphnia dubia* e *D. magna*. Segundo estes autores, a CL50 testada após a correção do pH foi maior em todos os organismos, comprovando assim, a redução da toxicidade da vinhaça por meio deste tratamento.

Ferreira et al. (2011) puderam concluir que a associação sistemática do fungo *Pleurotus sajor-caju* e da vinhaça pode ser aplicada no bioprocesso da redução de sua cor e degradação de seus componentes complexos, proporcionando redução de toxicidade e aprimoramento de suas propriedades físico-químicas. Os estudos de Aragão et al. (2014) e Campos et al. (2014) também concluíram que a associação de *Pleurotus sajor-caju* com a vinhaça é aplicável na remoção da cor e degradação de componentes tóxicos da vinhaça de cana-de-açúcar, que pode ser reutilizada após tratamento por processos biotecnológicos. Assim, é indicado um possível processo de uso de resíduos de uma forma viável à objetivos industriais.

Silva et al. (2015) analisaram o desenvolvimento da colônia de *Pleurotus eryngii* utilizando a vinhaça como substrato, e assim, puderam concluir, que o crescimento deste fungo é tolerante à toxicidade do resíduo em diluições limítrofes. Além disso, este é capaz de aplicabilidade para a remoção da cor da vinhaça, evidenciando sua promissora aplicação no processo de biorremediação.

Correia et al. (2017b) verificaram o potencial tóxico da vinhaça em tilápias, bem como a eficácia do tratamento físico-químico deste resíduo com aumento de pH com cal (CaO). Os resultados sugeriam que este tratamento é uma alternativa eficaz para a redução da toxicidade da vinhaça, visto que houve redução da mortalidade dos peixes em diluições mais altas e da incidência de danos ao DNA.

### **2.3 Peixe como bioindicador para monitoramento ambiental**

Devido à permanência das atividades urbanas, industriais e da agricultura, as fontes de água doce são afetadas negativamente com o despejo de seus efluentes, e assim consequentemente, repercutindo esta nocividade em sua biota residente. A fim de avaliar os efeitos adversos destes componentes químicos sobre os organismos aquáticos, atualmente há uma tendência de integralizar parâmetros físicos e químicos, com bioindicadores na monitorização da poluição aquática (VAN DER OOST et al., 2003; AU, 2004).

Uma grande diversidade de organismos, tais como cebola (RODRÍGUEZ et al., 2015; GARCIA et al., 2017), moluscos (OLIVEIRA et al., 2014), diplópodos (SOUZA et al., 2014; MOREIRA-DE-SOUZA et al., 2016), assim como os peixes (LEDY et al., 2003; SOUZA; FONTANETTI, 2006; SIMONATO et al., 2008; BIAGINI et al., 2009; MARCATO et al., 2014; MARINHO et al., 2014; CORREIA et al., 2017a,b), entre outros, vêm sendo utilizados como bioindicadores a fim de avaliar a saúde dos ecossistemas, bem como patologias toxicológicas.

Os agrotóxicos são destinados aos recursos hídricos, provocando danos severos ao ambiente aquático. Sendo assim, testes de toxicidade em organismos aquáticos, como os peixes, são obrigatórios perante a lei (Portaria Normativa IBAMA nº 84, 15 de outubro de 1966) e são exigidos ensaios agudos, crônicos e de bioacumulação (ARANA et al., 2017).

Visto que podem ser usados para indicar a vitalidade de um ecossistema, os peixes são capazes de apontar a exposição potencial humana a um ambiente aquático poluído, ou serem sua fonte de poluentes, quando ingeridos (CARVALHO et al., 2002; ABDEL-MONEIM, 2012).

Os peixes desempenham um papel significativo na avaliação do potencial risco associado à contaminação no ambiente aquático, uma vez que estão diretamente expostos a produtos químicos resultantes da produção agrícola, através de escoamento superficial ou indiretamente, através de cadeia alimentar do ecossistema. Além disso, estes são dotados de mecanismos de defesa capazes de neutralizar impactos resultantes do metabolismo de vários produtos químicos ou xenobióticos (LAKRA; NAGPURE, 2009; NWANI et al., 2010).

A tilápia do Nilo pertence à família Cichlidae, da ordem dos Peciformes. Esta espécie, de origem africana, foi introduzida em outros continentes, inclusive na América do Sul, por volta do século XX (entre 1940-1950). No Brasil, foi introduzida por volta de 1971, com o intuito de enriquecer a produção nacional, com espécies oriundas da Costa do Marfim (KULLANDER, 2003). A atividade da piscicultura, atualmente, é muito importante para a economia do país, principalmente devido às condições climáticas adequadas e grande

disponibilidade de recursos hídricos. De acordo com o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), o Brasil produz atualmente cerca de 2 milhões de toneladas de peixe, sendo a tilápia uma das espécies mais cultivadas (MPA, 2014).

Além de sua ampla distribuição geográfica, a tilápia do Nilo possui grande diversidade de habitats, que incluem grandes rios equatoriais, tropicais e subtropicais, rios com corredeiras, áreas pantanosas, lagos profundos, águas salinas e alcalinas e lagos artificiais (EL-SAYED, 2006). Não obstante, é uma espécie exótica, capaz de se reproduzir em ambientes poluídos (BIRUNGI et al., 2007).

*Oreochromis niloticus* é uma espécie herbívoro-omnívora (EL-SAYED, 2006) e devido esta grande variedade de habitats em que se encontra, apresenta grande tolerância à alterações ambientais da água, apesar de sua relevante sensibilidade à salinidade (FAO, 2010). Além disso, existe extensa literatura sobre o seu comportamento, fisiologia e requerimentos ambientais, que os tornam relevantes como grupo de organismos testes para avaliar os efeitos biológicos de substâncias tóxicas (RAND, 2008).

As tilápias, ainda, possuem alta resistência à baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água e à alteração de seu pH (FAO, 2010) e à outros fatores causadores de diversos distúrbios para a maioria dos peixes (EL-SAYED., 2006).

Segundo Sanchez-Galan et al. (1998), teoricamente, para ser considerada ideal à estudos de toxicidade, uma espécie de peixe deve apresentar os seguintes critérios: (1) ser largamente distribuída em vários ecossistemas; (2) sensível o suficiente para detectar poluentes, mesmo em baixas concentrações; (3) ser adequada para trabalhos em laboratório e (4) em populações naturais permitir a captura de indivíduos sem afetar a conservação da espécie.

Correia et al. (2017a) avaliaram os efeitos da vinhaça nas brânquias de *O. niloticus* e puderam observar mudanças morfológicas significativas, como destacamento e desorganização do epitélio e aumento de células mucosas em peixes submetidos a diferentes diluições deste resíduo.

Sendo assim, a tilápia tem sido considerada um bom modelo para estudos toxicológicos por apresentar altas taxas de crescimento, fácil adaptação às dietas comerciais, resistência a doenças e lesões consequentes de manejo, boa reprodução em cativeiro e tolerância a variações ambientais (FIGUEIREDO-FERNANDES et al., 2006). Sendo assim, a tilápia-do-nilo é um ótimo modelo para avaliação do ecossistema aquático e para realização de estudos toxicológicos (GIRÓN- PÉREZ et al., 2007).

## **2.4 Histopatologia do fígado como biomarcador da poluição aquática**

Biomarcadores são definidos como respostas biológicas adaptativas a estressores, notabilizadas como alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais (DEPLEDGE, 1992; 1994). Seu uso permite a detecção de diversos tipos de danos em diferentes tecidos e células, visto que são capazes de fornecer evidências qualitativas de adaptações funcionais devido à exposição aos contaminantes morfológicos. Desta forma, esta ferramenta aponta o nível inicial de toxicidade antes da morte de um indivíduo, através de análises qualitativas das alterações morfológicas (FONTANETTI et al., 2011).

Os biomarcadores podem oferecer biologicamente e ecologicamente informações relevantes, ou seja, consistem em uma ferramenta valiosa para o estabelecimento de diretrizes para uma gestão ambiental eficaz. Assim, pode-se afirmar que peixes bioindicadores são necessários ao monitoramento de alterações ambientalmente induzidas a fim de avaliar o impacto de compostos xenobióticos (AUTHMAN et al., 2015).

Os biomarcadores bioquímicos, moleculares, de genotoxicidade, morfológicos e comportamentais têm sido utilizados em peixes para a avaliação do impacto de agrotóxicos na fisiologia destes animais, bem como os múltiplos efeitos que estes produtos ocasionam (ARANA et al., 2017). O uso de biomarcadores genéticos e morfológicos possibilita que os riscos à saúde humana sejam reduzidos, além de fornecer subsídios para o desenvolvimento de programas intencionados à preservação do ecossistema aquático (FONTANETTI et al., 2012).

Para Fernandes et al. (2008), o uso de biomarcadores têm se tornado um mecanismo atrativo e eficiente ao monitorar a qualidade do ambiente e da saúde dos peixes que habitam os ecossistemas poluídos. Assim, consequentemente, a utilização de peixes como monitores biológicos dos impactos dos diferentes níveis de poluição, é alta.

O uso de biomarcadores morfológicos tem se intensificado em peixes, visto que as alterações histológicas nos órgãos destes animais podem estabelecer a relação entre danos em peixes e poluição ambiental (DYK et al., 2012; MAHROUS et al., 2015).

A histopatologia do fígado nos peixes é uma ferramenta de monitoramento capaz de indicar os impactos de agentes de estresse em suas populações e é referido como um dos biomarcadores mais confiáveis para uso em estudos de degradação ambiental, inclusive na fauna aquática (FERNANDES et al., 2008). Além disso, as alterações histopatológicas têm sido cada vez mais relacionadas ao impacto de diversos estressores como patógenos microbianos, compostos tóxicos, condições ambientais adversas e nutricionais (MARCHAND et al., 2009).

A diminuição de atividades de enzimas hepáticas e mudanças histopatológicas em tecidos do fígado têm sido relacionadas a exposições a metais. Estas alterações são diretamente

relacionadas ao tipo de substância a que o órgão é exposto, à sua respectiva concentração no meio, o período de exposição, além da espécie do peixe estudada (PARIS-PALACIOS et al., 2000; VAN DYK et al., 2007; YOUNIS et al., 2012).

De maneira geral, o fígado é o maior órgão interno do corpo e uma glândula anexa digestiva constituída por parênquima celular e por fibras que promovem sua sustentação. A superfície hepática é coberta por uma membrana serosa, que possui tecido conectivo inserido no parênquima hepático. Os hepatócitos, localizados no parênquima celular, são células poligonais que possuem importantes funções metabólicas. Também é possível visualizar no tecido hepático vascularização de grande e pequeno calibre, ductos biliares, tecido pancreático e centros melanomacrofágicos (HIBIYA, 1982).

Em certas espécies de peixes, como a tilápia (*O. niloticus*), o fígado é agregado com o pâncreas, formando o hepatopâncreas, cujas células do pâncreas exócrino estão distribuídas no parênquima hepático ao redor das vênulas portais (MUNSHI; DUTTA, 1996). O pâncreas exócrino é definido por aglomerados de células piramidais, principalmente organizadas em ácinos, similarmente aos mamíferos. As células possuem citoplasma basófilo escuro, núcleos basais distintos e grânulos de zimogênio proeminentes, os quais contêm enzimas responsáveis pela digestão de proteínas, carboidratos, gorduras e nucleotídeos (GENTEN et al., 2009).

Alguns autores descrevem os ácinos como unidades estruturais e funcionais do fígado, localizadas no lóbulo hepático e nos tratos portais (ou bainha de Glisson). O lóbulo hepático consiste nos hepatócitos, que são o centro funcional do fígado, no qual há a formação das estruturas hepatócitos-sinusoidais. Os sinusóides, por sua vez, são redes capilares localizadas no espaço entre as placas hepáticas em que os hepatócitos estão dispostos (RAPPAPORT, 1963; MOTTA, 1984).

Em comparação aos humanos, que têm seus lobos hepáticos constituídos por placas formadas por uma camada de células, alguns vertebrados inferiores apresentam duas ou mais destas placas de espessura. Nos peixes, por exemplo, espécies diferentes podem apresentar este tecido sob diferentes formas, sendo que enquanto algumas podem ser semelhantes aos humanos, outras podem apresentar-se mais primitivas (ELIAS; BENGELSDORF, 1952; RAPPAPORT, 1963; MOTTA, 1984; CORNELIUS, 1985; NOPANITAYA et al., 1979; SPEILBERG et al., 1994; AKIYOSHI et al., 2001).

Akiyoshi e Inoue (2004) classificaram, a partir dos estudos de Elias e Bengelsdorf (1952), as estruturas hepatócitos-sinusoidais do fígado em três tipos: forma de cordão, tubular e sólida, que se diferenciam de acordo com a disposição, formato das células, bem como das estruturas que formam o tecido hepático. A forma de cordão, encontrada em espécies como

*Oreochromis mossambicus*, é caracterizada pela maioria dos hepatócitos poliédricos, de núcleo arredondado, dispostos em camada simples; os hepatócitos estão intimamente conectados a capilares sinusoidais, formando uma rede densa; e os sinusóides são ampliados com capilares retos, conectados através dos vasos perilobular para centrolobular;

Entre as funções hepáticas mais importantes estão a formação de proteínas plasmáticas, a desaminação de proteínas, a formação de uréia para remoção de amônia como efeito de detoxificação e a síntese de alguns aminoácidos (HONORATO et al., 2013). Sendo assim, a ocorrência de um distúrbio hepático grave pode proporcionar um quadro irreversível (RAŠKOVIĆ et al., 2011), com notória diminuição da taxa de crescimento e possibilidade de morte do animal.

Pereira et al. (2014), por exemplo, relataram que peixes expostos a ambientes contaminados com detergentes biodegradáveis, resultam em danos ao fígado, como a vacuolização do núcleo e citoplasma dos hepatócitos e a diminuição das reservas de glicogênio.

Marinho et al. (2014) puderam constatar através de análises histológicas e histoquímicas do fígado de *O. niloticus* que a vinhaça pode ser letal, dependendo de sua diluição e composição. Sendo assim, há grande necessidade da avaliação de sua reutilização como fertilizante, visto que uma vez atingido o ambiente aquático, pode repercutir graves efeitos à fauna. As alterações encontradas pelos autores podem ser listados, principalmente, como degeneração hidrópica, presença de núcleo picnótico, vacuolização no citoplasma, perda de integridade citoplasmática, perda de limite celular, acúmulo de polissacarídeos, dilatação dos sinusóides e desorganização do tecido hepático.

Da mesma forma, Ibrahim (2013) pôde comprovar a relação direta entre a má qualidade da água do rio Nilo, no Egito, resultante das atividades industriais, agrícolas e domésticas, com as alterações morfológicas encontradas em fígado de tilápia. Foi observado degeneração, necrose, fibrose e edema nas células hepáticas, dilatações de vasos sanguíneos, entre outras.

Para Sánchez-Fortún (2009) a biosfera está sendo modificada pelas atividades humanas. Isto posto, a biodiversidade vem sofrendo uma grande crise, tendo em vista que novas substâncias estão poluindo os recursos hídricos, causando, consequentemente, catástrofes ambientais nos ecossistemas aquáticos. Sendo este problema de grande relevância, pesquisas básicas são necessárias à elaboração de informações úteis para futuras prognósticos, e para que com isto, métodos alternativos de proteção destes ambientes sejam elaborados.

Embora o fígado tenha capacidade de degradação de compostos tóxicos, seus mecanismos de regulação podem ser sobrecarregados por concentrações elevadas destes produtos, acarretando danos à estrutura do órgão. Assim, a exposição a estes agentes pode

causar alterações histológicas, possibilitando que o órgão seja utilizado como biomarcador para indicar contato prévio com tais substâncias (HINTON; LAUREN, 1990; VAN DICK, 2003). Deste modo, a histologia de fígado de peixes possibilita o estudo das interações entre fatores ambientais e as estruturas hepáticas, bem como suas funções (BRUSLÉ; GONZALEZ, 1996).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Este projeto teve por finalidade analisar o potencial tóxico e citotóxico da vinhaça com pH ajustado com cal, sobre a vida aquática, utilizando como modelo tilápias expostas a diferentes diluições desta substância.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos foram analisar possíveis alterações teciduais do fígado de tilápias expostas à vinhaça com pH ajustado, utilizando a histologia; e avaliar possíveis alterações fisiológicas do fígado dos animais expostos, utilizando testes histoquímicos.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Materiais Biológicos**

Foram utilizados espécimes juvenis de *O. niloticus* com tamanho médio de 7 cm, provenientes de piscicultura. Esses animais foram aclimatados em tanques com sistema de filtração e aeração adequada, por no mínimo 15 dias, alimentados durante todo período. Um dia antes do início do bioensaio, a alimentação dos animais foi suspensa para evitar o acúmulo de dejetos nos aquários do experimento.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da UNESP - Rio Claro (CEUA/IB/UNESP/CRC), sob protocolo nº 003518-2/2 de 24.05.2013.

#### **4.2 Vinhaça**

Para a montagem dos bioensaios utilizou-se vinhaça de cana-de-açúcar obtida em uma usina. O pH da vinhaça foi ajustado para 7 por meio da adição de cal (CaO), produto comumente utilizado no campo para correção do solo; após ajuste para um nível mais neutro do pH, tais amostras foram misturadas diretamente nos aquários em diluições de 1, 2,5, 5 e 10%, tendo como base estudos de Algur e Kadioglu (1992), nos quais utilizaram concentrações similares

para estimar crescimento, biomassa e produção primária em *Pisum sativum* e *Helianthus annuus*, e estudos de Kumar e Gopal (2001), no qual estas diluições de vinhaça foram usadas em bioensaios com *Channa punctatus* (Pisces).

### **4.3 Métodos**

#### **4.3.1 Análise físico-química da vinhaça**

Foram realizadas análises físico-químicas do efluente bruto e da água de cada uma das diluições testadas após ajuste de pH do efluente, pelo laboratório especializado ASL Análises Ambientais, Rio Claro, SP, para determinação mais precisa de sua composição.

#### **4.3.2 Bioensaios com *O. niloticus***

Após a aclimatação, 20 tilápias foram divididas em quatro grupos de cinco indivíduos e cada grupo foi transferido para aquários (40L) de prova estática. O grupo controle (aquário 1) foi exposto à água limpa de poço artesiano, sem a adição de nenhum composto; o aquário 2 foi exposto à diluição de 1% de vinhaça tratada – pH=7,0 – (300 mL de vinhaça adicionado à 29,7 L de água de poço artesiano); o aquário 3 foi exposto à diluição de 5% de vinhaça tratada (1500 mL de vinhaça adicionado à 28,5 L de água de poço artesiano) e o aquário 4 foi exposto à diluição de 10% de vinhaça tratada (3000 mL de vinhaça adicionado à 27 L de água de poço artesiano). O tempo de exposição dos animais foi 96 horas, a fim de se obter a resposta aguda, a temperatura foi controlada ( $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e os aquários mantidos com sistemas de filtragem e aeração.

#### **4.3.3 Dissecção dos animais**

Decorrido o tempo de exposição, os espécimes de *O. niloticus* foram anestesiados com benzocaína (0,1 g de benzocaína em 1 mL de álcool etílico para cada 100 mL de água deionizada) e eutanasiados para a retirada do fígado. O fígado coletado foi fixado em solução Bouin (15 mL de solução aquosa saturada de ácido pícrico, 5 mL de formaldeído e 1 mL ácido acético) ou formol cálcio (de acordo com a técnica de coloração a ser empregada) permanecendo no fixador no mínimo 2 horas, após a fixação foi estabilizado em tampão fosfato de sódio pH=7,4 e mantido em geladeira.

#### **4.3.4 Técnica para análise histológica**

O material coletado foi desidratado em série alcoólica (15, 25, 50, 70, 80, 90, 95 e 100%) por 20 minutos cada banho. Após a desidratação, os fígados coletados foram colocados em

resina de embebição (Leica Historesin – Embedding Kit) por no mínimo 24 horas e, finalmente, incluídos em resina contendo catalisador. Após polimerização, os blocos foram seccionados com espessura de até 6 µm, com auxílio de micrótomo. Os cortes foram hidratados e recolhidos em lâminas. Em seguida, os cortes foram então corados por Hematoxilina/Eosina.

#### **4.3.5 Técnicas para análises histoquímicas**

Os testes histoquímicos foram realizados com o intuito de detectar os seguintes elementos:

##### **a. Proteínas Totais**

Foi utilizada a técnica de coloração pelo azul de bromofenol que teve o material fixado em solução Bouin. As lâminas foram hidratadas por 5 minutos e imersas no respectivo corante, por 2 horas. Em seguida, foram lavadas em água corrente, secas e montadas com bálsamo do Canadá (PEARSE, 1985).

##### **b. Polissacarídeos**

Dois técnicas foram utilizadas para a observação de polissacarídeos: PAS (Ácido Periódico Schiff), para a detecção de polissacarídeos neutros, e a coloração simultânea por PAS+ azul de Alcian, para detecção, também, de polissacarídeos ácidos. O material foi fixado em solução Bouin. No método PAS foi necessária a hidratação prévia do material, por 5 minutos. Em seguida, o material foi levado ao ácido periódico 1% por 30 minutos. Decorrido o tempo, o material foi imerso em reativo de Schiff, por 1 hora. As lâminas foram lavadas em água sulfurosa, por 9 minutos e em seguida, em água corrente, por 30 minutos. Depois de secas, foram montadas com bálsamo de Canadá. Na coloração dupla com PAS+azul de Alcian, as lâminas foram submersas em uma solução de azul de Alcian dissolvido em ácido acético 3%, onde permaneceram por 30 minutos, e em seguida submetidas ao reativo de Schiff, de modo semelhante à técnica de PAS, contrastadas com Hematoxilina (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

#### **4.3.6 Documentação e interpretação dos resultados**

Foram analisadas duas lâminas com oito cortes de 6 µm para cada peixe, sendo n=5 para cada um dos bioensaios. Assim, foram analisados um total de 50 lâminas e 400 cortes histológicos para a técnica realizada.

Os resultados obtidos foram registrados em fotomicroscópio, fazendo-se uso de programas próprios para captura de imagens. Os resultados encontrados no tratamento a que foram submetidos, foram comparados.

A descrição e a avaliação das alterações histológicas basearam-se nos protocolos de Bernet et al. (1999) e Marinho et al. (2014). Um fator de importância (w) foi definido para cada lesão observada, de acordo com sua importância patológica, ou seja, como isso afeta a função do órgão e a capacidade de sobrevivência dos peixes, classificadas de 1 a 3: (1) Importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível quando a exposição ao estressor termina; (2) Importância patológica moderada, a lesão é reversível na maioria dos casos, quando o estressor é neutralizado; e (3) Importância patológica acentuada, a lesão é geralmente irreversível, levando à perda parcial ou total da função do órgão.

Foi desenvolvida, então, uma tabela para o presente estudo (Tabela 1), com as principais alterações encontradas nos fígados dos peixes expostos à vinhaça.

Para melhor compreensão dos resultados, as anomalias histopatológicas encontradas, também foram classificadas em escores (a) que podem variar de 0 a 6, dependendo do grau e da extensão da alteração, sendo: (0) nenhuma ocorrência; (2) pouca ou rara ocorrência; (4) ocorrência frequente; e (6) ocorrência muito frequente. Além disso, valores intermediários também puderam ser considerados quando a alteração observada não estivesse presente em todos indivíduos analisados.

Ao multiplicar o fator de importância pelo escore, o índice da alteração foi obtido. Para o cálculo do índice total de cada indivíduo, ou seja, o índice correspondente à avaliação das alterações histopatológicas, utilizou-se o seguinte cálculo:

$$\text{Índice}_{\text{ind}} = \Sigma (\text{fator de importância} \times \text{escore})$$

A partir dos índices individuais obtiveram-se os valores de média e desvio padrão para cada grupo – controle e tratamentos – os quais foram avaliados estatisticamente por meio do teste Kruskal Wallis em níveis de 5% e 1% de significância para comparação de cada tratamento com o grupo controle.

Este procedimento foi realizado para avaliar estatisticamente o conjunto de lesões hepáticas entre os grupos. Assim, este método padronizado de avaliação permite a análise semiquantitativa de danos aos órgãos incluindo a extensão, a significância e a importância patológica das alterações.

## **5. RESULTADOS**

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

A vinhaça bruta e a água dos aquários com as diluições de vinhaça tratada foram analisadas físico-quimicamente anteriormente à realização do bioensaio. Os resultados encontrados estão sintetizados nas tabelas 2 e 3.

Após introdução dos peixes nos aquários, o pH ajustado em 7 (neutro) não manteve-se estável. Ao final da exposição, exceto na diluição de 10%, o pH apresentou-se alcalino. Os metais, em sua totalidade, estavam em concentração abaixo da permitida pela CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo). Houve redução considerável da DBO e da DQO nas diluições de vinhaça tratada.

### **5.2 Observação do bioensaio**

Durante a execução do bioensaio, não foi verificada mortalidade de peixes.

### **5.3 Análise histológica**

O grupo controle apresentou o tecido hepático estruturalmente típico de peixes teleósteos, sem anormalidades patológicas (figura 1A). Os hepatócitos são células poliédricas arranjadas em fileiras. Estes estão entremeados por sinusóides, nos quais observa-se eritrócitos. Os hepatócitos apresentam citoplasma homogeneamente corado, ou ocasionalmente menos corado. O órgão apresenta, ainda, tecido pancreático por entre o parênquima, como descrito para a espécie (figura 1A).

As alterações estatisticamente significativas foram degeneração hidrópica (figura 1C) e aumento de vacúolos citoplasmáticos dos hepatócitos (figura 1F).

Na diluição de 1% foram observadas com mais frequência perda de integridade celular (figura 1D), degeneração hidrópica e rara perda de limite citoplasmático (figura 1B, D).

Na diluição de 2,5% foi raramente observado desorganização do parênquima hepático. Foi observado com frequência perda de integridade citoplasmática e perda de limite celular. Em um dos indivíduos, observou-se intenso aumento de vacúolos citoplasmáticos dos hepatócitos (Figuras 1E, F) dos hepatócitos, embora no restante esta alteração se apresentasse raramente.

Pôde-se observar na diluição de 5%, frequente perda de integridade citoplasmática, perda de limite celular e vacuolização; com frequência rara também constatou-se presença de desorganização do tecido hepático e degeneração hidrópica.

Na diluição de 10%, foram observadas perda de limite celular, perda de integridade citoplasmática e aumento de vacúolos no citoplasma dos hepatócitos muito frequentes e degeneração hidrópica e desorganização tecidual com frequências médias ou mais raras.

Os resultados estatisticamente significativos foram degeneração hidrópica na diluição de 1% e aumento de vacúolos citoplasmáticos na diluição de 10% (Tabela 4).

#### **5.4 Análise histoquímica**

A análise para a detecção de proteína no grupo controle apresentou positividade no citoplasma dos hepatócitos, sendo algumas áreas menos coradas que outras, conforme observado também na coloração por H/E (Figura 2A). Não foram observadas diferenças quando comparado este padrão nos organismos expostos a vinhaça.

As análises para a detecção de polissacarídeos mostraram que tanto o grupo controle, quanto os grupos de todos os tratamentos, apresentaram similarmente pequenos estoques de polissacarídeos neutros nos hepatócitos, em forma de fina granulação espalhada por todo o citoplasma ou em acúmulos maiores (Figuras 2B e 2C); não foram observados polissacarídeos ácidos (Figura 2C).

### **6. DISCUSSÃO**

A avaliação de produtos potencialmente tóxicos em corpos d'água foi o principal objetivo de ações de proteção de recursos hídricos em todo o mundo, realizada recentemente por ambientalistas e funcionários governamentais, amparados pela literatura científica. Além da contaminação da água, a intoxicação de animais aquáticos é alarmante e, neste sentido, a presença de produtos que não sejam específicos ao uso em corpos d'água é altamente preocupante. Desta forma, estas substâncias podem ter acesso ao ambiente aquático através de diferentes práticas, atingindo organismos não alvos, como os peixes (ANSOAR-RODRÍGUEZ et al., 2016).

A vinhaça tem sido constantemente aplicada no setor agrícola como um agente fertilizante, principalmente no cultivo de cana-de-açúcar. Entretanto, dependendo das quantidades aplicadas no solo, pode sofrer lixiviação atingindo corpos d'água. Em outras palavras, estas quantidades não devem superar a capacidade de retenção de íons, ou seja, a

dosagem depende das características do solo. Visto que um dos principais problemas enfrentados pelas indústrias sucroalcooleiras é o grande volume de resíduos gerados, a vinhaça representa um potencial poluente para os corpos d'água quando manejada inadequadamente (WADT, 2008; FERREIRA, 2009; LAIME et al., 2009).

Segundo Marinho et al. (2014) é possível pressupor que o baixo pH, a presença de diferentes metais e a alta dureza da amostra, sejam características contribuintes para o efeito tóxico da vinhaça. O pH de um ecossistema pode interferir de modo direto sobre a fisiologia das espécies, ou de modo indireto, podendo contribuir para a precipitação de elementos tóxicos, como metais traço. Em relação ao lançamento direto de efluentes nos corpos receptores, é estabelecida uma faixa de pH de 5 a 9, sendo que os parâmetros de proteção à vida aquática determinam o pH dos corpos d'água entre 6 e 9 (CETESB, 2013).

O fígado é um dos órgãos mais afetados pelos poluentes da água, visto que está associado a funções de desintoxicação e biotransformação, juntamente com a localização e o rico suprimento de sangue (MOHAMED, 2009).

Em todos os grupos expostos às diferentes concentrações de vinhaça tratada, foram encontradas alterações histológicas. Assim, os hepatócitos podem ser considerados como um dos principais alvos da toxicidade de uma substância, caracterizando o fígado como um excelente biomarcador da poluição ambiental (ZELIKOFF, 1998).

Foi observada degeneração hidrópica dos hepatócitos, que é caracterizada pelo aumento no volume da célula devido ao acúmulo de água e eletrólitos em seu interior (ROBBINS et al., 1989). Esta alteração foi encontrada em estudos que também utilizaram substâncias que atingem corpos d'água, como o inseticida imidacloprido e o herbicida 2,4-D comercial em *O. niloticus* (SILVA, 2015; ANSOAR-RODRIGUEZ et al., 2016) e o níquel em *Oncorhynchus mykiss* (TOPAL et al., 2017).

A ocorrência de perda de integridade citoplasmática foi uma característica encontrada abundantemente e se refere às áreas mais claras do citoplasma, indicando um processo de degradação. Com o aumento de sua frequência proporcional ao aumento da diluição da vinhaça em que os fígados foram expostos, pode-se indicar a ocorrência de um processo tóxico neste órgão (MARINHO et al., 2014). Resultados similares foram observados por Amwele et al. (2017) na análise de diferentes tecidos, inclusive nos fígados de tilápias, submetidos a um metal complexo e óleo surfactante.

A desorganização do tecido hepático e a perda do limite celular, segundo Akaishi et al. (2004), são características que sugerem drásticas alterações na distribuição de organelas, o que pode trazer graves consequências para o funcionamento do órgão. O parênquima hepático

normal está disposto em cordões de hepatócitos bem definidos, de forma poliédrica. Esta alteração foi observada intensamente nos estudos de Abdel-Moneim et al. (2012) e Puerto et al. (2014). De acordo com alguns outros autores, este desarranjo parece estar relacionado à exposição dos animais à metais, como o alumínio e zinco (HADI; ALWAN, 2012; SANTOS et al., 2015).

Observou-se, também a ocorrência de aumento da presença de vacúolos citoplasmáticos, indicando acúmulo de substâncias e sinais de degradação, resultado também encontrado por outros autores, como Authman et al. (2013), na avaliação do impacto ambiental de metais traço no fígado do peixe *C. gariepinus*. Pacheco e Santos (2002) descreveram o aumento de vacúolos citoplasmáticos dos hepatócitos como um sinal degenerativo que sugere danos metabólicos, possivelmente relacionados à contaminação da água. Mollendroff (1973), desta forma, classificou esta alteração como um mecanismo de defesa celular que coleta substâncias prejudiciais dos hepatócitos, impedindo que as atividades biológicas destas células sejam interrompidas.

Os lipídios podem ser estas substâncias em acúmulo nos vacúolos (esteatose), devido a uma falha no metabolismo lipídico, quando expostos à contaminantes. As espécies de peixes, em sua maioria, têm os lipídios como fontes predominantes para a obtenção de energia. No entanto, a deposição de lipídios em excesso pode causar problemas à saúde do animal (LI et al., 2012). Sendo assim, os peixes, quando submetidos à estresse ambiental, podem sofrer danos ao metabolismo lipídico, ocasionando o aumento de vacúolos citoplasmáticos no fígado (NGUYEN et al., 2008; LI et al., 2012; FRICKE et al., 2012 CHEN et al., 2015; SARAIVA et al., 2015). No presente trabalho, não foi verificado o conteúdo lipídico.

Os padrões histoquímicos para a detecção de proteínas e polissacarídeos não sofreram alteração neste estudo. A análise para a detecção de proteína apresentou o citoplasma de seus hepatócitos positivos aos testes, apresentando áreas menos coradas conforme o padrão da coloração histológica. Os testes histoquímicos para a detecção de polissacarídeos citoplasmáticos não indicaram acúmulo destes elementos neutros, sendo que os ácidos não foram observados. Em contrapartida, os estudos de Marinho et al. (2014) com vinhaça *in natura* indicaram maior acúmulo de polissacarídeos tanto ácidos quanto neutros, em grupos tratados com diferentes diluições do resíduo, podendo ser este fato, explicado pela alta quantidade de compostos orgânicos presentes no efluente.

Proporcionalmente ao aumento substancial da produção de etanol no Brasil, há necessidade do controle deste resíduo. Muitas tecnologias têm surgido para o tratamento e reutilização da vinhaça (MANE et al., 2006; SILVA et al., 2007a; FERREIRA, 2009;

MOHANA et al., 2009). Neste projeto, foi intenção verificar se o ajuste de pH para um valor mais neutro seria uma alternativa para a diminuição da toxicidade da vinhaça. Para tanto, foram realizadas análises físico-químicas da água dos aquários após adição da vinhaça tratada; pôde-se observar aumento do pH e redução considerável dos níveis de DBO e DQO.

Durante o bioensaio não foi observada mortalidade dos peixes, indicando uma diminuição da toxicidade deste resíduo, uma vez que em estudos prévios com as mesmas diluições de vinhaça sem ajuste de pH, a mortalidade foi alta (MARINHO et al., 2014; CORREIA et al., 2017a,b).

Mesmo após a observação da diminuição da toxicidade, as análises histológicas demonstram ainda alterações estatisticamente significativas como: degeneração hidrópica na diluição de 1%, perda de integridade citoplasmática dos hepatócitos na diluição de 10%, perda de limite citoplasmático dos hepatócitos nas diluições de 5% e 10% e desorganização do tecido hepático na concentração de 5%. O aparecimento destas anormalidades sugere que a vinhaça apresenta potencial tóxico mesmo após tratamento por ajuste de pH.

## 7. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos através da análise histopatológica de fígado de peixes da espécie *O. niloticus*, expostos a diferentes diluições de vinhaça tratada para ajuste de pH, pode-se concluir que a vinhaça tratada ainda possui potencial tóxico nos corpos d'água. Desta forma, foram encontradas alterações histopatológicas estatisticamente significativas na análise histológica, sendo estas, aumento de vacúolos citoplasmáticos e degeneração hidrópica. No entanto, o tratamento não alterou a presença de proteínas totais e polissacarídeos presentes no fígado de peixes expostos. Sendo assim, as análises físico-químicas da vinhaça, bem como o padrão histoquímico do fígado das tilápias expostas a este resíduo, comprovaram a diminuição de seu poder poluente. Apesar disso, a análise histopatológica dos fígados dos animais expostos, demonstrou ainda, constituintes tóxicos ao organismo utilizado como modelo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MONEIM, A.M.; AL-KAHTANI, M.A.; ELMENSHAWY, O.M. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environment, Saudi Arabia. **Chemosphere**, v.8, p.1028-1035, 2012.
- AKIYOSHI, H.; INOUE, A.; HAMANA, A. Comparative histochemical studies of the livers of marine fishes in relation to their behavior. **Bull Fac Life Env Sci Shimane Univ**, v.6, p.7–16, 2001.
- AKIYOSHI, H.; INOUE, A. Comparative Histological Study of Teleost Livers in Relation to Phylogeny. **Zoological Science**, v.21, p. 841–850, 2004.
- ALGUR, O.F.; KADIOGLU, A. The effects of vinasse on the growth, biomass and primary productivity in pea (*Pisum sativum*) and sunflower (*Helianthus annuus*). **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 39, p. 139-144, 1992.
- 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.
- ANSOAR-RODRÍGUEZ, Y ; CHRISTOFOLETTI, C.A. ; CORREIA, J.E. ; DE SOUZA, R. B.; MOREIRA-DE-SOUSA, C; MARCATO, A.C.C ; BUENO, O.C. ; MALASPINA, O; SILVA-ZACARIN, E.L.C. M. ; FONTANETTI, C.S. . Liver alterations in *Oreochromis niloticus* (Pisces) induced by insecticide imidacloprid: Histopathology and heat shock protein *in situ* localization. **Journal of Environmental Science and Health. Part B. Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 51, p. 881-887, 2016.
- AKAISHI, F.M., SILVA-DE-ASSIS, H.C., JACOBI, S.C.G et al. Morphological and Neurotoxicological Findings in Tropical Freshwater Fish (*Astyanax* sp.) After Waterborne and Acute Exposure to Water Soluble Fraction (WSF) of Crude Oil. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 244-253, 2004.
- ARAGÃO, M., MENEZES, D., OLIVEIRA, H., SOUZA, J., VITAL-BRAZIL, O., ROMANHOLO-FERREIRA, L., MONTEIRO, R., QUELJEIRO-LOPEZ, A., TEIXEIRA, J., HERNANDEZ-MACEDO, M., RUZENE, D., SILVA, D. Bioremediation of distillery effluent by *Pleurotus sajor-caju* : evaluation of the influence of pH in vinasse derived from molasses. **BMC Proceedings**, 2014. DOI:10.1186/1753-6561-8-S4-P190.
- ARANA, S.; ANSOAR-RODRIGUEZ, Y.; GUEDES, T.A.; MARCATO, A.C.C.; CORREIA, J.E.; FONTANETTI, C.S. Peixes como bioindicadores do impacto no ambiente aquático induzido por agrotóxicos empregados no cultivo da cana-de-açúcar. Cana de açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica, **Canal6**, 275p, 2017.
- AU, D.W.T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. **Marine Pollution Bulletin**, v.48, p.817-834, 2004.
- AUTHMAN, M.M.N., IBRAHIM, S. A., EL-KASHEIF, M.A., GABER, H.S. Heavy Metals

Pollution and Their Effects on Gills and Liver of *Clarias gariepinus* the Nile Catfish Inhabiting El-Rahawy Drain, Egypt. **Global Veterinaria**, v. 10, n.2, p. 103-115. 2013.

AUTHMAN, M.M.N., ZAKI, M.S., KHALLAF, E.A., ABBAS, H.H. Use of Fish as Bio-indicator of the Effects of Heavy Metals Pollution. **J. Aquaculture Research & Development**, v.6, n.4, p.1-13, 2015.

AZEREDO, D. F.; MANHÃES, M. S. Adubação orgânica. In: Orlando Filho, J. (ed.). **Nutrição e adubação da cana-de-açúcar no Brasil**. Piracicaba:IAA/Planalsucar, 1983, p.227-264, 2010.

BENINCÁ, C.; RAMSDORF W.; VICARI T.; OLIVEIRA RIBEIRO C.A.; ALMEIDA M.I.; SILVA DE ASSIS H.C.; CESTARI M.M. Chronic genetic damages in *Geophagus brasiliensis* exposed to anthropic impact in estuarine lakes at Santa Catarina coast—southern of Brazil. **Environ Monit Assess**, v. 184, n.4, p. 2045–2056, 2012.

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

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

BIRUNGI, Z.; MASOLA, B.; ZARANYIKA, M.F.; NAIGAGA, I.; MARSHALL, B. Active biomonitoring of trace heavy metals using fish (*Oreochromis niloticus*) as bioindicator species. The case of Nakivubo wetland along Lake Victoria. **Physics and Chemistry of the Earth**, v.32, p.1350-1358, 2007.

BOTELHO, R.G.; TORNISIELO, V.L.; OLINDA, R.A.; MARANHO, L.A.; MACHADO-NETO, L. Acute toxicity of sugarcane vinasse to aquatic organisms before and after pH adjustment. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v.94,p.1-11, 2012.

BRUSLÉ, J.; GONZÁLEZ I ANADON, G. The structure and function of fish liver. In: MUNSHI J.S.D.; DUTTA H.M (Eds.). Fish Morphology. **Science Publishers Inc**, p.77-94. 1996.

CABELLO, P. E.; SCOGNAMIGLIO, F. P.; TERÁN, F. J. C. Tratamento de vinhaça em reator anaeróbio de leito fluidizado. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 06, n. 01, p.321-338, 2009.

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

CAMPOS, C.R., MESQUITA, V.A., SILVA, C.F., SCHWAN, R.F. Efficiency of physicochemical and biological treatments of vinasse and their influence on indigenous microbiota for disposal into the environment. **Waste management**, v.34, n.11, p.2036-2046, 2014.

CARMO, S. FILOSO, L.C. ZOTELLI, E.R. DE SOUSA NETO, L.M. PITOMBO, P.J.

DUARTE-NETO, V.P. VARGAS, C.A. ANDRADE, G.J.C. GAVA, R. ROSSETTO, H. CANTARELLA, A.E. NETO, L.A. Martinelli. Infield greenhouse gas emissions from sugarcane soils in Brazil: effects from synthetic and organic fertilizer application and crop trash accumulation. **Glob. Change Biol. Bioenerg.**, v.5, p. 267–280, 2012.

CARVALHO, C.S.; BEMUSSO, V.A.; ARAÚJO, H.S.S.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; FERNANDES, M.N. Biomarker responses as indication off contamination effects in *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, v. 89, p.60-69, 2002.

CESAR, R.G., NATAL-DA-LUZ, T., SOUSA, J.P., COLONESE, J., BIDONE, E., CASTILHOS, Z., EGLER, S., POLIVANOV, H. Disposal of dredged sediments in tropical soils: ecotoxicological effects on earthworms. **Environ. Monit. Assess.** v.186, p. 1487–1497, 2014.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Variáveis de qualidade das águas superficiais. 2013. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguassuperficiais/34-variaveis-de-qualidade-das-aguas>>. Acesso em: 16/10/15.

CHEN, Q.L.; LUO, Z.; WU, K.; HUANG, C.; MEI-QIN, Z.; YU-FENG, S.; HU, W. Differential effects of dietary copper deficiency and excess on lipid metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **Comp.Biochem. Phys. B.** v. 184, p. 19–28, 2015.

CHOTPANTARAT, S., & SUTTHIRAT, C. Different sorption approaches and leachate fluxes affecting on Mn<sup>2+</sup> transport through lateritic aquifer. American Journal of **Environmental Science**, v.7, n.1,p.65–72, 2011.

CHOTPANTARAT, S., ONG, S. K., SUTTHIRAT, C., & OSATHAPHAN, K. Effect of pH on transport of Pb<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> through lateritic soil: Column experiments and transport modeling. **Journal of Environmental Sciences**, v.23, n.4, p.640–648, 2011.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; ESCHER, J.P.; CORREIA, J.E.; MARINHO, J.F.U.; FONTANETTI, C.S.; Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, p. 2752-2751, 2013a.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; PEDRO-ESCHER, J; FONTANETTI, C. S.Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* assay. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 224, p. 1523-1536, 2013b.

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

CHRISTOFOLETTI, C. A.; MOREIRA de SOUSA, C.; SOUZA, R.B.; FRANCISCO, A.; GASTALDI, V.D. O emprego de diferentes resíduos utilizados como fertilizantes na cultura de cana-de-açúcar. Cana de açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica, **Canal6**, 275p, 2017.

CONAB | ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DE CANA-DE-AÇÚCAR | v. 2 - Safra 2016/17, n. 4 – Quarto levantamento, abril de 2017.

CORAZZA, R.I. **Reflexões sobre o papel das políticas ambientais e de ciência e tecnologia na modelagem de opções produtivas ‘mais limpas’ numa perspectiva evolucionista: um estudo sobre disposição da vinhaça**. 163f. Tese de Doutorado. Departamento de política científica e tecnológica. Instituto de Geociências, da Unicamp, Campinas-SP, 1996.

CORREIA, J.A. **Avaliação da toxicidade da vinhaça tratada quimicamente utilizando *Oreochromis niloticus* (Perciformes: Cichlidae) como organismo teste**. Jul 2015. 105p. Dissertação (Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Campus Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2015.

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

CORREIA, J.A.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; ANSOAR-RODRIGUEZ, 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.

CORNELIUS, C.E. Hepatic ontogenesis. **Hepatology**, v. 5, p. 1213–1221, 1985.

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.

DEMATTE, J.A.M.; GAMA, M.A.P.; COOPERA, M.; ARAÚJO, J.C.; NANNI, M.R.; FIORIOA, P.R. Effect of fermentation residue on the spectral reflectance properties of soils. **Geoderma**, v.120, p.187–200, 2004.

DOMENE, X.; ALCANIZ, J.M.; ANDRÉS, P. Ecotoxicological assessment of organic wastes using the soil collembolan *Folsomia candida*. **Appl. Soil Ecol.**, v. 35, p. 461–472, 2007.

DEPLEDGE, M.H. Conceptual paradigms in marine ecotoxicology. In: Proceedings of the 12th Baltic Marine Biologists Symposium. Olsen & Olsen, Fredensborg, Denmark, p.47-52, 1992. DEPLEDGE, M.H. Genotypic toxicity implications for individuals and populations. **Environmental Health Perspectives**, v.102, p.101-104, 1994.

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

EL-SAYED, A. Chapter 2: Basic Biology. In: El-Sayed, A. **Tilapia Culture**. Ed Cabi, United Kingdom, p. 25-29, 2006.

ELIAS, H.; BENIGLSDORF, H. The structure of the liver of vertebrates. **Acta Anat V.**, 14, p. 297–337, 1952.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Tilapia: Environmental Biology and Nutritional Requirement. **South Dakota Cooperative Extension Service**. 2010.Disponível

em: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis\\_niloticus/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en)>. Acesso em 15 de abril de 2015.

FERNANDES, C., FONTAÍNHAS-FERNANDES, A., ROCHA, E. AND SALGADO, M.A. Monitoring Pollution in Esmoriz-Paramos Lagoon, Portugal: Liver Histological and Biochemical Effects in *Liza Saliens*. **Environ Monit Assess**, v.145, p.315-322. <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-007-0041-4>, 2008.

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

FERREIRA, L.F.R., AGUIAR, M.M., MESSIAS, T.G., POMPEU, G.B., LOPEZ, A.M.Q., SILVA, D.P., MONTEIRO, R.T. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 132–137, 2011.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A., FONTAÍNHAS-FERNANDES, A., MONTEIRO, R., REIS-HENRIQUES, M.A., ROCHA, E. Effects of the fungicide mancozeb on liver structure of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: assessment and quantification of induced cytological changes using qualitative histopathology and the stereological point-sampled intercept method. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 76, 249–255, 2006.

FONTANETTI, C.S.; NOGAROL, L. R.; SOUZA, R. B.; PEREZ, D. G.; MAZIVIERO, G. Bioindicators and Biomarkers in the Assessment of Soil Toxicity. In: PASCUCCI, S. (Org.). **Soil Contamination**, p. 143-168, 2011.

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

FONTANETTI, C.S.; BUENO, O.C. Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica. **Canal6**, 275p, 2017.

FRANCISCO, A. ; NOCELLI, R. C. ; FONTANETTI, C.S. . The nervous system of the neotropical millipede *Gymnostreptus olivaceus* Schubart, 1944 (Spirostreptida, Spirostreptidae) shows an additional cell layer. **Animal Biology**, v. 65, p. 133-150, 2015.

FRANZLE, O. Bioindicators and environmental stress assessment. In: Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG (eds) Bioindicators and biomonitors. **Elsevier**, p. 41–84, 2003.

FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. A. B. Vinhaça de cana-de-açúcar. Guaíra: **Livraria e Editora Agropecuária**, 2000.

FRICKE, N.F.; GRANT, D.; STENTIFORD STEPHEN, W.; FEIST, T.L. Liver histopathology in Baltic eelpout (*Zoarces viviparus*) e A baseline study for use in marine environmental monitoring. **Mar. Environ. Res.**, v.82, p.1–14, 2012

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 and Environmental Safety**, v. 142, p. 216-221, 2017.

GEMTOS, T. A.; CHOULIARAS, N.; MARAKIS, S. Vinasse rate, time of application and compaction effect on soil properties and durum wheat crop. **Journal of Agriculture and Engineering Research**, v.73, n.3, p.283-296, 1999.

GENTEN, F., TERWINGHE, E., DANGUY, A. **Atlas of fish histology**. Science Publishers. 2009.

GIANCHINI, C. F., FERRAZ, M. V., 2009. Benefícios da utilização de vinhaça em terras de plantio de cana-de-açúcar-Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 3, p. 1-15, 2009.

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

GÓMEZ, J.; RODRÍGUEZ, O. Effects of vinasse on sugarcane (*Saccharum officinarum*) productivity. **Revista Facultad Agronomia**, v. 17, p. 318-326, 2000.

HADI, A.A.; ALWAN, S.F. Histopathological changes in gills, liver and kidney of fresh water fish, *Tilapia zillii*, exposed to aluminum. **Int. J. of Pharm. & Life Sci. (IJPLS)**, V.3, n.11, p. 2071-2081, 2012.

HEALTH, A. G. **Water Pollution and Fish Physiology**. Boca Raton, FL: CRC Lewis Publishers, pp. 125–40, 1995.

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

HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELANO, R. A., and OKIHIRO, M. S. Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress. **Histopathologic Biomarkers**, p.155–209, 1992.

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

HINTON, D. E., SEGNER, H., BRAUNBECK, T. **Toxic responses of the liver**, in: D. Schlenk, W.H. Bensen (Eds.), *Organs, Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts*, v.1, pp. 224–268, 2001.

HONORATO, C.A., ASSANO, M., CRUZ, C., CARNEIRO, D.J., MACHADO, M.R.F. Histologia do fígado de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo diferentes fontes de proteína. **Nucleous animalium**. v.5, n.1, p. 85-92, 2013.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review. **Mutation Research**, v. 277, p.91- 138, 1992.

IBRAHIM, N.A.; ZAID, M.W.A, KHAW, H.L.; EL-NAGGAR.; G.O.; PONZONIL, R.W. Relative performance of two Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) strains in Egypt: The Abbassa selection line and the Kafr El Sheikh commercial strain. **Aquaculture Research**, v.44, n.3, p.508-517, 2013

JIRAUNGKOORSKUL, W. et al. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Sci. Asia**, New Delhi, v. 28,n. 2, p. 121-127, 2002.

JOHNSON, L.L., STEHR, C.M., OLSON, O.P., MYERS, M.S., PIERCE, S.M., WIGREN, C.A., MCCAIN, B.B., VARANASI, U. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the Northeast Coast of the United States. **Environ. Sci. Technol.** v.27, p. 2759–2771, 1993.

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

JUNQUEIRA, L.C.U; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Editora Guanabara Koogan S.A., 10ª edição, p.324-334, 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2008.

KULLANDER, E. **Family Cichlidae (Cichlids): Check List of Freshwater Fishes of South and Central America**. p.605-609, 2003.

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

LAIME, E.M.O., FERNANDES, P.D., OLIVEIRA, D.C.S., FREIRE, E.A. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. **R. Trop. Ci. Agr. Biol**, v. 5, p.16–29, 2011.

LAKRA, W.S., NAGPURE, N.S. Genotoxicological studies in fishes: a review. **Indian J. Animal Sci**, v.79, p.93–98, 2009.

LEITE, R.C.C.; LEAL, M.R.L.V. O biocombustível no Brasil. **Novos Estudos - CEBRAP**, São Paulo, v. 78, p. 15-21, jul. 2007.

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

LI, L.; ZHENG, B.; LIU, L. Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: definitions, approaches and trends. **Procedia Environ Sci**, v.2, p.1510–1524. doi:10.1016/j.proenv.2010.10.164, 2010.

LI, X.F.; LIU, W.B.; LU, K.L.; XU, W.N.; WANG, Y. Dietary carbohydrate/lipid ratios affect stress, oxidative status and non-specific immune responses of fingerling blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Fish Shell Fish Immunol*, v.33, p. 316–323, 2012.

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

MANE, J.D., MODI, S., NAGAWADE, S., PHADNIS, S.P., BHANDARI, V.M. Treatment of spentwash using chemically modified bagasse and colour removal studies. **Biores. Technol**, v. 97, p.1752–1755, 2006.

MARCATO, A.C.C.; YABUKI, A.T.; FONTANETTI, C.S. Nickel exposure promotes osmoregulatory disturbances in *Oreochromis niloticus* gills: histopathological and energy dispersive spectrometry analysis. **Environ Sci Pollut Res**, v.21, n. 22, p. 13095-13102, 2014.

MARCATO, A.C.C. ; SOUZA, C.P. ; FONTANETTI, C.S. . Herbicide 2,4-D: A Review of Toxicity on Non-Target Organisms. *Water, Air and Soil Pollution (Print)*, v. 228, p. 120, 2017.

MARCHAND, J.C., VAN DYK, G.M., PIETERSE, I.E.J., BARNHOORN, M.S. Histopathological alterations in the liver of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* from polluted aquatic ecosystems in South Africa. **Environ. Toxicol**, v.24, pp. 133–147, 2009.

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.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. 2016. Relação das unidades produtoras cadastradas no departamento da cana-de-açúcar e agroenergia. Brasília: MAPA. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Desenvolvimento\\_Sustentavel/Agroenergia/Orientacoes\\_Tecnicas/Usinas%20e%20Destilarias%20Cadastradas/DADOS\\_PRODUTORES\\_23-08-2013.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Agroenergia/Orientacoes_Tecnicas/Usinas%20e%20Destilarias%20Cadastradas/DADOS_PRODUTORES_23-08-2013.pdf)>. Acesso em: 20 julho. 2017.

MERTEN, G.H., MINELLA, J.P. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, Porto Alegre, v. 3, n. 4, p.33-38, 2002.

MOHAMED, F.A.S. Histopathological Studies on *Tilapia zillii* and *Solea vulgaris* from Lake Qarun, Egypt. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, v.1, n.1, p. 29-39, 2009.

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.

MONFERRÁN, M.V.; GALANTI, L.N.; BONANSEA, R.I.; AMÉ, M.V.; WUNDERLIN, D.A. (2011) Integrated survey of water pollution in the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *J Environ Monit* 13:398–409. doi:10.1039/c0em00545b

MONTEIRO, M.C., FONSECA, S.C., CASTRO, P.M.L., MALCATA, F.X. Toxicity of cadmium and zinc on two microalgae, *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus pleiomorphus*, from Northern Portugal. **Journal of Applied Phycology**, V. 23, N. 1, p. 97-103, 2011.

MORAES, D.S.L.; JORDÃO, B.Q.; Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Rev Saúde Pública**, v.36, n.3, p.370-374, 2002.

MOREIRA DE SOUSA, C. M. ; IAMONTE, M. ; FONTANETTI, C.S. . Midgut of the diplopod *Urostreptus atrobrunneus*: structure, function, and redefinition of hepatic cells. *Brazilian Journal of Biology (Online)*, p. 1-7, 2016.

MOSER, H., RÖMBKE, J. **ECOTOXICOLOGICAL CHARACTERIZATION OF WASTE — RESULTS AND Experiences on an International Ring Test**. Springer, Dessau, 2009.

MOTTA, P.M.M. The three-dimensional microanatomy of the liver. **Arch Histol**, v.47, p.1–30, 1984.

MUNSHI, J.S.D., DUTTA, H.M. *Fish Morphology: Horizon of New Research*. **Science Publishers, Inc.**, USA. 1996.

MPA, 2014. Produção. Disponível em: [www.mpa.gov.br/index.php/aquicultura/producao](http://www.mpa.gov.br/index.php/aquicultura/producao). Acesso em: 06/10/2015.

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, 2009a.

NATAL-DA-LUZ, T., TIDONA, S., JESUS, B., MORAIS, P.V., SOUSA, J.P. The use of sewage sludge as soil amendment. The need for an ecotoxicological evaluation. **J. Soils Sediments**, v. 09, p. 246–260, 2009b.

NESHAT, A., PRADHAN, B., PIRASTEH, S., SHAFRI, H.Z.M. Estimating groundwater vulnerability to pollution using a modified DRASTIC model in the Kerman agricultural area, Iran. **Environmental Earth Sciences**, v.71, n.7, p.3119-3131, 2013.

NGUYEN, P.; LERAY, V.; DIEZ, M.; SERISIER, S.; LE BLOC'H, J.; SILIART, B.; DUMON, H. Liver lipid metabolism. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr**, v.92, p. 272–283, 2008.

NOCELLI, R.C.F.; ZAMBON, V.; SILVA, O.G.M.; MORINI, M.S.C. Histórico da cana-de-açúcar no Brasil: contribuições e importância econômica. Cana de açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica, **Canal6**, 275p, 2017.

NOGAROL, L. R. ; BROSSI-GARCIA, A.L. ; SOUZA, R. B. ; FONTANETTI, C.S. . Histopathological effects of the herbicide atrazine on gills of the Brazilian endemic bivalve. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 96, p. 387-403, 2016.

NOPANITAYA, W.; CARSON, J.L.; GRISHAM, J.W.; AGHAJANIAN, J.G. New observations on the fine structure of the liver in gold fish (*Carassius auratus*). **Cell Tissue Res**, v. 196, p. 249–261, 1979.

NWANI, C.D., LAKRA, W.S, et al. Toxicity of the Herbicide Atrazine: Effects on Lipid Peroxidation and Activities of Antioxidant Enzymes in the Freshwater Fish *Channa Punctatus* (Bloch). **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v.7, n.8, p.3298-3312, 2010.

OLIVEIRA, J.L.N. CARVALHO, C.E.P. CERRI, C.C. CERRI, B.J. Feigl Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. **Geoderma**, v. 200–201, pp. 77–84, 2013.

OLIVEIRA, G.F.M., LIMA, M.F., BOMFIM, T.C.B. *Perna perna* Mussels as Bioindicators of Aquatic Contamination by *Cryptosporidium* spp. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, p.124–128, 2014.

PARIS-PALACIOS S, BIAGIANTI-RISBOURG S, VERNET G. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. **Aquat. Toxicol.**, v.50, p.109–124, 2000.

PANDARD, P., DEVILLERS, J., CHARISSON, A.M., POULSEN, V., JOURDAIN, M.J., FÉRARD, J.F. GRAND, C., BISPOI, A. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. **Sci. Total Environ.**, v.363, pp. 114–125, 2006.

PAREDES, D.S., LESSA, A.C.R., SANT'ANNA, S.A.C.; BODDEY, R.M., URQUIAGA, S., ALVES, B.J.R. Nitrous oxide emission and ammonia volatilization induced by vinasse and N fertilizer application in a sugarcane crop at Rio de Janeiro. **Brazil. Nutr. Cycl. Agroecosyst.**, v.98, pp. 41–55, 2014.

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

PEDRO-ESCHER, J.; MAZIVIERO, G. T.; FONTANETTI, C. S. Mutagenic action of sugarcane vinasse in the *Tradescantia pallida* test system. **J. Ecosys Ecograph**, v. 4, p. 2-4, 2014.

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

PEREIRA, R. S. Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. Revista Eletrônica de Recursos Hídricos. **IPH-UFRGS**. v. 1, p. 20-36. 2004.

PEREIRA, B.F.; ALVES, R.M.S.; ALVES, A.L.; SENHORINI, J.A.; ROCHA, R.C.G.A.; SCALIZE, P.H.; PITOL, D.L.; CAETANO, F.H. Effects of Biodegradable Detergents in Morphological Parameters of Liver in Two Neotropical Fish Species (*Prochilodus lineatus* and *Astyanax altiparanae*). **Microscopy Research**, v.2, p.39-49. 2014.

PUERTO, M.; JOS, A.; PICHARDO, S.; MOYANO, R.; BLANCO, A.; CAMEÁN, A.M. Acute Exposure to Pure Cyindrospermopsin Results in Oxidative Stress and Pathological Alterations in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Toxicology**, v.29, n.4, p. 371-385, 2014.

RAND, G.M. Fish toxicity studies. In: GIULIO, R.T.D.; HINTON, D.E. **The Toxicology of Fishes**. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, p.659-682., 2008.

RAPPAPORT, A.M. **Anatomical considerations**. In “Disease of the Liver” Ed by L Schiff, J. B. Lippincott , Philadelphia, p. 1–46, 1963.

RASHED, M. N. Monitoring of contaminated toxic and heavy metals from mine tailings through age accumulation in soil and some wild plants at Southeast Egypt. *Journal of Hazardous Materials*, v.178, n.1–3, p.739–746, 2010.

RAŠKOVIĆ B.S., STANKOVIĆ M.B., MARKOVIĆ Z.Z. & POLEKSIĆ V.D. Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. **J. Agricult. Sci**, v.56, n.1, p.87-100, 2011.

RATTAN, R. K., DATTA, S. P., CHHONKAR, P. K., SURIBABU, K., & SINGH, A. K. Long-term impact of irrigation with sewage effluents on heavy metal content in soils, crops and groundwater—a case study. **Agricultural Ecosystems and Environment**, v.109, p.310–322, 2005.

ROBBINS, S.L., COTRAN, R.S., KUMAR, V. Robbins pathologic basis of disease, fourth ed. W.B. **Saunders Co.**, Philadelphia, 1989.

RODRIGUES, D.; ORTIZ, L. **Em direção à sustentabilidade da produção de etanol de cana-de-açúcar no Brasil**. Porto Alegre: Núcleo Amigos da Terra, 2006. 37p.

RODRÍGUEZ, Y.A., CHRISTOFOLETTI, C.A, PEDRO, J, BUENO, O.C, MALASPINA, O, FERREIRA, R.A.C, FONTANETTI, C.S. Allium cepa and Tradescantia pallida bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. **Chemosphere**, v. 120, p. 438–442, 2015.

SÁNCHEZ- FORTUN, S., LÓPEZ-RODAS, V., NAVARRO, M., MARVÁ, F., D’ORS, A., ROUCO, M., HAIGH-FLOREZ, D., COSTAS, E. Toxicity and adaptation of Dictyosphaerium chlorelloides to extreme chromium contamination. **Environmental Toxicology**, V.28, n.29, p.1901-1905, 2009.

SÁNCHEZ-GALÁN., LINDE, A.R., IZQUIERDO, J.I., GARCIA-VÁZQUEZ, E.G. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. **Mutation Research/Geneti Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 412, n.3, p. 219–225, 1998.

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

SANTOS, J.D. **Utilização da vinhaça como componente de solução nutritiva para hidroponia**, 2010. Dissertação de Pós-Graduação. Universidade federal do Paraná, Paraná. 2010.

SANTOS, J.O., SANTOS., R.M.S.S., GOMES, M.A.D., MIRANDA, R.C., NÓBREGA, I.G.M. A qualidade da água para o consumo humano: Uma discussão necessária. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 2, p. 19-26, abr - jun, 2013a.

SANTOS, J.D., SILVA, A.L., COSTA, J.L., SCHEIDT G.N., NOVAK A.C., SYDNEY E.B., SOCCOL, C.R. Development of a vinasse nutritive solution for hydroponics. **J. Environ. Manage**, v.114, p. 8–12, 2013b

SARAIVA, A.; COSTA, J.; SERRÃO, J.; CRUZ, C.; EIRAS, J.C. A histology-based fish health assessment of farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Aquaculture**, v.448, p. 375–381, 2015.

SAVAGE N. Fuel options: the ideal biofuel. **Nature**, v, 474, p.S9–11, 2011.

SILVA, M. A. S, GRIEBELER, N. P, BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Agriambi**, Campina Grande/PB, v.11, n.1, p.109-113, 2006.

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**, Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 108-114, 2007a.

SILVA, V.L.M.M., GOMES, W.C., ALSINA, O.L.S. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Rev. Eletrôn. Matter. Process**, v. 2, p.27-32, 2007b.

SILVA C.F., ARCURI S.L., CAMPOS C.R., VILELA D.M., ALVES J.G.L.F., SCHWAN, R.F. Using the residue of spirit production and bio-ethanol for protein production by yeasts. **Waste Manage.**, v.31, p. 108–114, 2011.

SILVA, A.P.M.; BONO, J.A.M.; PEREIRA, A.R. Aplicação de vinhaça na cultura da cana-de-açúcar: Efeito no solo e na produtividade de colmos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 1, p. 38-43, 2014.

SILVA, L.M., SILVA, A.E., OLIVEIRA, M.T., REIS, M.F. Initial avaliation of the potential of *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Qué. In biorremediation vinasse. **Sabios: Rev. Saúde e Biol.**, v.10, n.2, p.14-20, 2015.

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

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, Amsterdam**, v.605, p.87-93, 2006.

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.

SPEILBERG, .; EVENSEN, Ø.; NAFSTAD, P. Liver of juvenile atlantic salmon, *Salmo salar* L.: A light, transmission, and scanning electron microscopic study, with special reference to the sinusoid. **Anat Rec**, v. 240, p. 291–307, 1994.

TABOADA-CASTRO, M., DIÉGUEZ-VILLAR, A., LUZ RODRÍGUEZ-BLANCO, M., TABOADA-CASTRO, M T. Agricultural impact of dissolved trace elements in runoff water from an experimental catchment with land-use changes. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.43, p.81–87, 2012.

TOPAL, A.; ATAMANALP, M.; ORUÇ, E.; EROL, H.S. Physiological and biochemical effects of nickel on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues: Assessment of nuclear factor kappa B activation, oxidative stress and histopathological changes. **Chemosphere**, v.166, p. 445-452, 2017.

UNICA - União da Agroindústria Canavieira do Estado de São Paulo. **Setor Sucroenergético**. 2015. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 20 julho 2017.

UNICA - União da Agroindústria Canavieira do Estado de São Paulo. **Setor Sucroenergético**. 2015. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 20 julho 2017

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13:57–149. doi:10.1016/S1382-6689(02)00126-6.

VAN DYK J C, PIETERSE G M, VAN VUREN J H J. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. **Ecotoxicol. Environ. Safe**, v.66, n.3, p.432–440, 2007.

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. **Environ Pollut**, v.93, n.2, p.135-139, 1996.

VERLAG, G. F. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. Tokyo, Kodansha Ltd., 1982.

VODELA, J. K., RENDEN, J. A., LENZ, S. D., MCELHENNEY, W. H., & KEMPPAINEN, B. W. Drinking water contaminants. **Poultry Science**, v. 76, p.1474–1492, 1997

VON SPERLING, E. Considerações sobre a saúde de ambientes aquáticos. **Bion**.2, v.3, p.53-56, 1993.

WADT, L.H.O., KAINER, K.A., STAUDHAMMER, C.L., SERRANO, R.O.P. Sustainable forest use in Brazilian extractive reserves: Natural regeneration of Brazil nut in exploited populations. **Biological conservation**, v. 141, n. 1, p. 332-346, 2008.

WHITE, P.A, RASMUSSEN J.B, BLAISE C. Comparing the presence, potency, and potential hazard of genotoxins extracted from a broad range of industrial effluents. **Environ Mol Mutag**, v.27, p.116-139, 1996.

WILKE, B.M., RIEPERT, F., KOCH, C., KÜHNE, T. Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 70, p. 283–293, 2008.

WILKIE, A.; RIEDESEL, K; OWENS, J. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass Bioenerg**, v.19, pp. 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.

YOUNIS E M, ABDEL-WARITH A A, AL-ASGAH N A. Hematological and enzymatic responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* during short and long term sublethal exposure to zinc. **Afr. J. Biotech.**, v.**11**, n.19, p.4 442–4 446, 2012.

ZELIKOFF, J.T. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? **Toxicology**, v. 129, n. 1, p. 63-71, 1998.

## 9. ANEXOS

### 9.1 ANEXO A

**Tabela 1** – Principais alterações encontradas em fígado de *O. niloticus* e seus respectivos fatores de importância.

|                            | <b>Características analisadas</b>   | <b>Fator de Importância (w)</b> |
|----------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| <b>Hepatócitos</b>         | Degeneração hidrópica               | 2                               |
|                            | Aumento de vacúolos citoplasmáticos | 1                               |
|                            | Perda de integridade citoplasmática | 3                               |
|                            | Perda de limite celular             | 3                               |
| <b>Parênquima Hepático</b> | Desorganização do tecido            | 2                               |

Tabela elaborada pelo autor

## 9.2 ANEXO B

**Tabela 2** – Características físico-químicas da vinhaça bruta e das águas dos aquários após diluição da vinhaça tratada com cal.

| <b>Parâmetro</b>                       | <b>Vinhaça bruta</b> | <b>Vinhaça 1%</b> | <b>Vinhaça 2,5%</b> | <b>Vinhaça 5%</b> | <b>Vinhaça 10%</b> |
|----------------------------------------|----------------------|-------------------|---------------------|-------------------|--------------------|
| <b>pH inicial</b>                      | 4,6                  | 7,32              | 7,22                | 7,23              | 7,32               |
| <b>pH final</b>                        | 4,6                  | 9,2               | 8,4                 | 8,9               | 7,6                |
| <b>Cálcio (mg/L)</b>                   | 828 (25%)            | 27,87             | 62,33               | 95,2              | 96,8 (5%)          |
| <b>Condutividade Elétrica (µs/cm)</b>  | 8294                 | 446               | 685                 | 1110              | 1022               |
| <b>DBO (mg/L)</b>                      | 13394,3              | <LQ               | 22,1                | 26,4              | 47,1               |
| <b>DQO (mg/L)</b>                      | 31723,2              | <LQ               | 144,5 (2%)          | 246,5             | 325,9              |
| <b>Dureza (mg CaCO<sub>3</sub>/L)</b>  | 3390,4               | 107,8             | 257,7               | 384,9             | 400,7              |
| <b>Fosfato total (mg/L)</b>            | 5,518 (20%)          | 0,673 (2%)        | 0,401 (5%)          | 3,938 (10%)       | 1,466(10%)         |
| <b>Magnésio (mg/L)</b>                 | 321,25 (25%)         | 9,279             | 24,78               | 35,75             | 38,620             |
| <b>Potássio (mg/L)</b>                 | 3276 (100%)          | 38,06             | 91,360              | 264,4 (5%)        | 224,95 (5%)        |
| <b>Sódio (mg/L)</b>                    | 13,57                | 36,5              | 8,588               | 15,1              | 9,023              |
| <b>Sulfato (mg/L)</b>                  | 340,276 (20%)        | 32,76 (2%)        | 70,583 (5%)         | 174,642 (10%)     | 123,319 (10%)      |
| <b>Sólidos suspensos totais (mg/L)</b> | 1190                 | <LQ               | 20                  | 39                | 42,0               |
| <b>Carbono Orgânico Total ( mg/L)</b>  | 11070                | 15,8              | 50,2                | 102               | 126                |
| <b>Nitrogênio Amoniacal</b>            | 10,920               | 3,124             | 4,127               | 9,578             | 7,472              |
| <b>Nitrogênio Kjeldahl</b>             | 234,1                | 4,8               | 10,6                | 14,3              | 12,6               |

LQ: limite de quantificação; Entre parênteses: diluição para quantificação

Fonte: CORREIA (2015)

### 9.3 ANEXO C

**Tabela 3-** Análise físico-química e de metais da vinhaça bruta e das águas dos aquários após diluição da vinhaça tratada com cal.

| <b>Parâmetro</b>  | <b>Vinhaça bruta (mg/L)</b> | <b>Vinhaça 1% (mg/L)</b> | <b>Vinhaça 2,5% (mg/L)</b> | <b>Vinhaça 5% (mg/L)</b> | <b>Vinhaça 10% (mg/L)</b> |
|-------------------|-----------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <b>Alumínio</b>   | 0,47                        | <LQ                      | 0,08                       | <LQ                      | 0,15                      |
| <b>Antimônio</b>  | <LQ                         | <LQ                      | <LQ                        | <LQ                      | <LQ                       |
| <b>Arsênio</b>    | <LQ                         | <LQ                      | <LQ                        | <LQ                      | <LQ                       |
| <b>Bário</b>      | 0,218                       | 0,07                     | 0,06                       | 0,051                    | 0,069                     |
| <b>Boro</b>       | <LQ                         | 0,369                    | <LQ                        | <LQ                      | <LQ                       |
| <b>Cádmio</b>     | <LQ                         | <LQ                      | <LQ                        | <LQ                      | <LQ                       |
| <b>Chumbo</b>     | <LQ                         | <LQ                      | <LQ                        | <LQ                      | <LQ                       |
| <b>Cobalto</b>    | 0,014                       | <LQ                      | <LQ                        | <LQ                      | <LQ                       |
| <b>Cobre</b>      | 0,155                       | <LQ                      | 0,009                      | <LQ                      | <LQ                       |
| <b>Cromo</b>      | <LQ                         | <LQ                      | <LQ                        | <LQ                      | <LQ                       |
| <b>Ferro</b>      | 8,531                       | 0,077                    | 0,228                      | 0,412                    | 0,495                     |
| <b>Manganês</b>   | 3,11 (25%)                  | <LQ                      | 0,026                      | 0,131                    | 0,147                     |
| <b>Mercurio</b>   | <LQ                         | <LQ                      | <LQ                        | <LQ                      | <LQ                       |
| <b>Molibdênio</b> | <LQ                         | <LQ                      | <LQ                        | <LQ                      | <LQ                       |
| <b>Níquel</b>     | 0,029                       | <LQ                      | <LQ                        | <LQ                      | <LQ                       |
| <b>Prata</b>      | <LQ                         | <LQ                      | <LQ                        | <LQ                      | <LQ                       |
| <b>Selênio</b>    | <LQ                         | <LQ                      | <LQ                        | <LQ                      | <LQ                       |
| <b>Vanádio</b>    | <LQ                         | <LQ                      | <LQ                        | <LQ                      | <LQ                       |
| <b>Zinco</b>      | 0,625                       | 0,02                     | 0,022                      | 0,038                    | 0,032                     |

LQ: limite de quantificação; entre parênteses: diluição para quantificação

Fonte: Correia (2015)

## 9.4 ANEXO D

**Tabela 4** – Frequência de ocorrência de alterações hepáticas significativas encontradas em *O. niloticus* expostos à vinhaça tratada.

| Tratamentos | Deg. Hidro.     | Vacuol.         | Perda Lim. | Des.Tecido  | Perd. cit.  |
|-------------|-----------------|-----------------|------------|-------------|-------------|
| CC          | 0               | 0               | 0          | 0           | 2,4 ± 3,28  |
| V1%         | 5,6 ± 2,19<br>* | 0               | 2,4 ± 3,28 | 0,8 ± 1,78  | 6,0 ± 4,24  |
| V2,5%       | 4,0 ± 2,82      | 2,8 ± 4,38      | 6,0 ± 0    | 0,8 ± 1,78  | 11,4 ± 8,59 |
| V5%         | 1,6 ± 2,19      | 4,8 ± 5,21      | 7,2 ± 7,82 | 11,2 ± 1,78 | 7,2 ± 5,01  |
| V10%        | 1,6 ± 2,19      | 6,4 ± 6,57<br>* | 4,8 ± 7,82 | 5,6 ± 6,06  | 11,4 ± 6,84 |

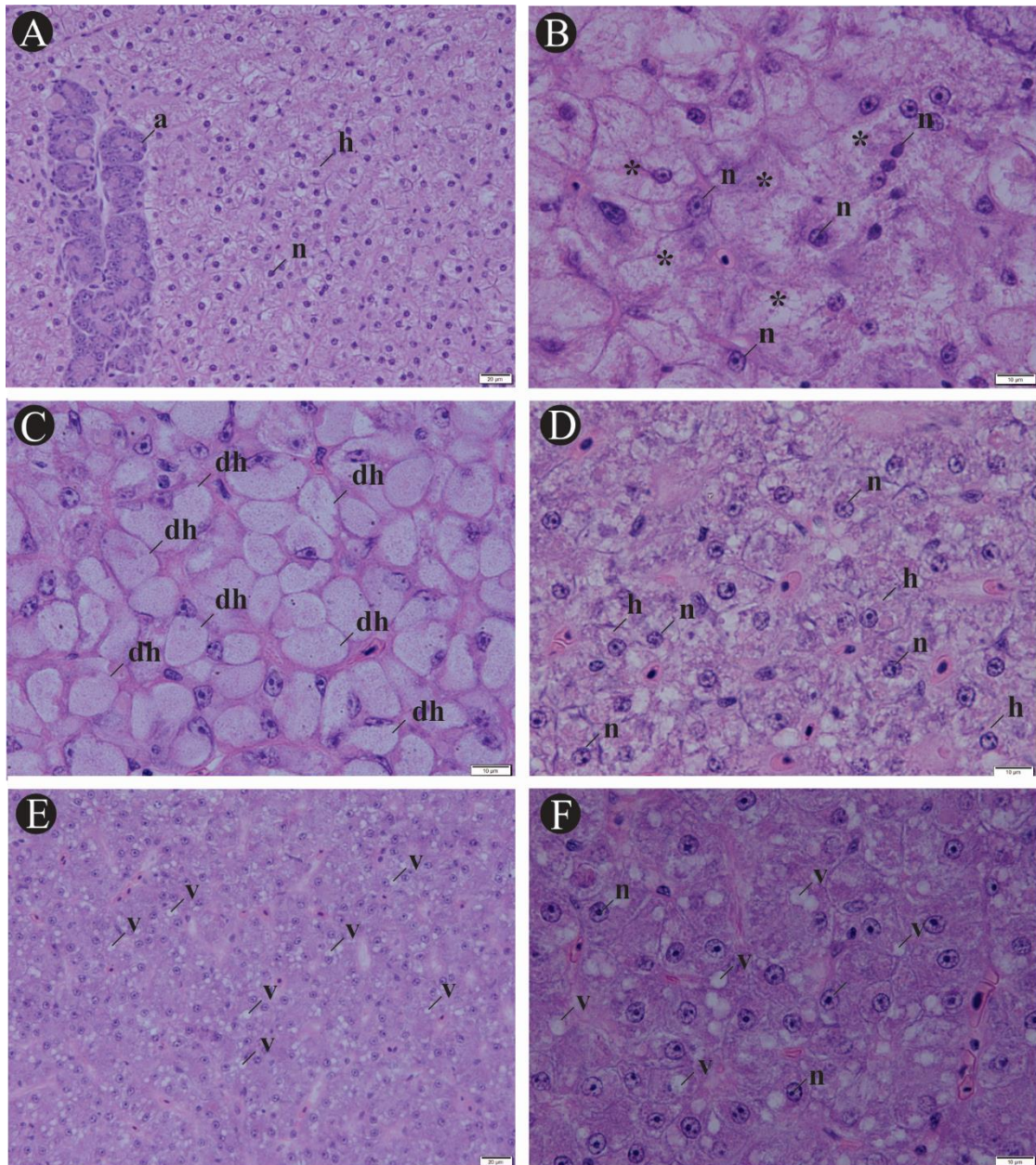
CC: Controle; V1%, V2,5%, V5%, V10%: respectivas concentrações de vinhaça tratada; **Deg. Hidro:** degeneração hidrópica; **Vacuol.:** vacuolização; **Perda cit:** perda de integridade citoplasmática; **Perda lim:** perda de limite celular; **Dilat.sinu:** dilatação do sinusóide; **Des. Tecido:** desorganização do tecido;

\*: valor significativo para  $p < 0,05$  pelo teste de Kruskal Wallis.

Tabela elaborada pelo autor

### 9.5 ANEXO E

**Figura 1** - Secções histológicas de fígado de *O. niloticus* corados com hematoxilina-eosina. **Grupo Controle (A)** e **Grupos Tratamentos (B, C, D, E, F)**. Observar em D a desorganização do parênquima hepático; **a**: ácinos pancreáticos; **dh**: degeneração hidrópica; **h**: hepatócitos; **n**: núcleo; **v**: vacúolos citoplasmáticos; **asterisco**: perda do limite celular



## 9.6 ANEXO F

**Figura 2:** Secções histológicas de fígados de *O. niloticus* – grupo controle, submetidos ao teste azul de bromofenol (A), PAS (B) e PAS+azul de Alcian (C). **ap:** ácinos pancreáticos; **h:** hepatócito; **cabeça de seta:** acúmulo de polissacarídeos.

