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

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

ANA CLAUDIA DE CASTRO MARCATO

Março - 2019

ANA CLAUDIA DE CASTRO MARCATO

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

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

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

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

Rio Claro - SP

2019

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

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

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: ANA CLAUDIA DE CASTRO MARCATO

ORIENTADORA: CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

COORIENTADORA: KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES

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



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



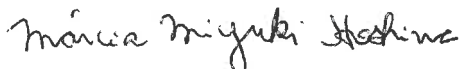
Prof. Dr. RAPHAEL BASTÃO DE SOUZA
x / Pós-Doutorando da UNICAMP



Prof. Dr. AMAURI ANTONIO MENEGARIO
CEA / UNESP



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



Profa. Dra. MARCIA MIYUKI HOSHINA
x / x

Rio Claro, 16 de janeiro de 2019

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

SUMÁRIO

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

O poder poluente deste líquido residual, cerca de cem vezes maior que o do esgoto doméstico, decorre da sua riqueza em matéria orgânica, baixo pH, elevado poder de corrosão e altos índices de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). Assim, a vinhaça é considerada altamente nociva à fauna, flora, microfauna e microflora das águas doces, além de afugentar a fauna marinha que vem às costas brasileiras para procriação (SILVA et al., 2007).

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

lavouras como fertilizantes (MORAES et al., 2015). O que antes era problema ambiental passou a ser componente fundamental do sistema de custos de produção das indústrias sucroalcooleiras. Porém, essa utilização também merece atenção quanto a possíveis problemas de degradação e contaminação do solo e da água (FERREIRA, 2009). Ao promover modificações nas propriedades físicas do solo, a vinhaça pode tanto elevar a capacidade de infiltração da terra, contaminando as águas subterrâneas, como reduzi-la, promovendo a elevação do escoamento, com possível contaminação de águas superficiais. Além disso, os mecanismos de recarga dos lençóis freáticos e aquíferos são controlados principalmente pelos eventos de chuva. Deste modo, ao atingir o solo contendo vinhaça, a água pluvial pode infiltrar ou escoar superficialmente, poluindo os corpos d'água (SILVA et al., 2007).

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

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

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

Em estudos realizados com *Allium cepa* (cebola), Souza et al. (2013) observaram uma potencialização de efeitos clastogênicos de uma amostra de solo de landfarming, proveniente do tratamento de resíduos do petróleo, após a adição de vinhaça à amostra. As autoras inferiram que, provavelmente, houve a liberação dos metais traço adsorvidos na matéria orgânica.

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

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

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

Segundo a literatura, a vinhaça pode ser tratada tanto por processos físico-químicos como biológicos, que podem reduzir a toxicidade pela degradação de componentes orgânicos; os processos físico-químicos normalmente envolvem reagentes para oxidar compostos orgânicos, enquanto que os tratamentos biológicos são classificados como técnicas aeróbicas ou anaeróbicas (BOTELHO et al., 2012).

Monteiro et al. (2011) avaliaram a redução da toxicidade da vinhaça tratada pelo fungo *Pleurotus sajor-caju* utilizando organismos aquáticos, *Pseudokirchneriella subcapitata* (microalga), *Daphnia magna* e *D. similis* (microcrustáceos) e *Hydra attenuata* (cnidário), como organismos-teste. Houve reduções de 82,8% na DQO, 75,3% na DBO, 99,2% na coloração e 99,7% na turbidez da vinhaça, além de uma redução de sua toxicidade. Botelho et al. (2012) avaliaram a redução da toxicidade da vinhaça por meio da correção do pH com hidróxido de sódio e utilizaram os microcrustáceos *Ceriodaphnia dubia* e *D. magna* como organismos-teste. Segundo estes autores, a CL50 testada após a correção do pH foi maior em todos os organismos, comprovando assim, a redução da toxicidade da vinhaça por meio deste tratamento. Correia et al. (2017a) também verificaram a diminuição do potencial genotóxico da vinhaça após correção do pH utilizando CaO.

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

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

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

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

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

ARANA et al., 2017).

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

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Vinhaça

Introduzido no Brasil em 1532 em São Vicente, São Paulo, o cultivo de cana-de-açúcar contribuiu rapidamente para o desenvolvimento da região, influenciando outras áreas do país, iniciando assim o ciclo da cana-de-açúcar, a primeira atividade organizada do Brasil.

Durante a década de 80, o setor sucroalcooleiro recebeu grande importância no cenário nacional, tendo um novo impulso pelo incentivo estatal por meio do programa Proálcool, com uma proposta alternativa ao uso dos derivados de petróleo, na tentativa de superar a crise instalada na época e atender a demanda do mercado interno e externo. No entanto, devido a enorme quantidade de resíduos que produzia (e ainda hoje produz), a indústria sucroalcooleira ganhou destaque não só na economia, como também na questão ambiental (MORAES et al., 2015). Até a década de 80, muito desses resíduos eram destinados aos corpos d'água, causando sérios danos. Em 1978 surgiu a primeira legislação referente à destinação da vinhaça, a Portaria Minter nº 323, de 29 de novembro de 1978, que diz: "A partir da safra de 1979/1980, fica proibido o lançamento, direto ou indireto, do vinhoto em qualquer coleção hídrica, pelas destilarias de álcool instaladas ou que se venham a instalar no País". Após essa década, houve maior preocupação com o meio ambiente e valorização da biodiversidade. Encorajado e impulsionado por alguns tratados internacionais de cunho ambiental, o Brasil adotou medidas mais rigorosas com o intuito de preservar os recursos naturais, caracterizando a fase holística da legislação brasileira (FARIAS, 2009). Em 1984, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), com a Resolução n.0002, de 05 de junho definiu a obrigatoriedade da realização de estudos e apresentação de projeto de resolução contendo normas para controle da poluição causada pelos efluentes das destilarias de álcool e pelas águas de lavagem da cana (CONAMA, 1984). Assim, resíduos que antes eram descartados diretamente nos rios, precisaram receber outro destino. A vinhaça é um exemplo disso, uma vez que, é o principal resíduo gerado pela indústria sucroalcooleira da cana-de-açúcar.

Segundo Freire e Cortez (2000), para a produção do álcool, a cana-de-açúcar é lavada e moída nas moendas para a extração do caldo, que a seguir é submetido ao processo de clarificação, concentração e centrifugação, obtendo-se açúcar comercial e mel. O mel, após novo processo de cozimento a vácuo para obtenção do açúcar de segunda, transforma-se em mel final ou melaço. O melaço, após ser diluído, origina o mosto de melaço, que é enviado às dornas de

fermentação para a formação do vinho. O vinho é então encaminhado para as colunas de destilação, resultando no álcool hidratado e na vinhaça. A produção da indústria sucroalcooleira por tonelada de cana-de-açúcar é em média de 12 L de álcool, 94 Kg de açúcar, 156L de vinhaça e 250 kg de bagaço (HOARAU et al., 2018).

A vinhaça pode ser por meio de três diferentes formas: (1) produzida do subproduto da produção de açúcar; vinhaça de mosto de melaço; (2) produzida através da fermentação alcoólica do caldo; vinhaça de mosto de caldo; (3) vinhaça de mosto misto gerada com a mistura de caldo e melaço (QUITERIO, 2013). Em uma safra, ela pode ser apresentada nas três categorias, sendo que para cada litro de álcool são produzidos de 8 a 15 litros de vinhaça (CHRISTOFOLETTI et al., 2013a; HOARAU et al., 2018). Apesar da vinhaça ser um efluente com alto valor fertilizante, possui alto poder poluente. É principalmente constituída de água e sais sólidos em suspensão ou solúveis, sendo que o teor de água está entre 94 a 96%. Seu poder poluente decorre da sua riqueza em matéria orgânica e mineral, com elevados níveis de DQO e DBO. Outros aspectos físicos da vinhaça são seu baixo pH (3,5 a 5,0) e a elevada temperatura em que é gerada, que resultam seu caráter de poluente químico (apresentado por elevado efeito corrosivo) e na poluição de natureza física (na forma de calor). A vinhaça é a que mais contém nutrientes em sua composição quando comparada aos outros resíduos orgânicos produzidos pela indústria sucroalcooleira, predominando o potássio seguido de cálcio, magnésio, fósforo, manganês e nitrogênio orgânico (SILVA et al., 2007; WADT, 2008).

Devido a sua riqueza em matéria orgânica, o uso de vinhaça como fertilizante é vantajoso porque contém quantidades significantes de elementos químicos, especialmente potássio e micronutrientes (zinco, ferro, manganês e cobre) e, em níveis mais baixos, cálcio, magnésio e nitrogênio essenciais para as plantas. As aplicações da vinhaça podem fornecer a maioria dos requisitos de nutrientes de fertilização mineral, com vários estudos relatando aumento da produtividade de cana-de-açúcar em resposta a aplicações de vinhaça (RESENDE et al., 2006).

No entanto, a quantidade de vinhaça fertirrigada não deve ultrapassar a capacidade de retenção de íons do solo, ou seja, as dosagens dependem das características do local a ser aplicada. Quando usadas em proporções desbalanceadas ocasionam efeitos maléficos aos solos e às plantas (QUITERIO, 2013; CHRISTOFOLETTI et al., 2013a).

Sendo a vinhaça um efluente muito agressivo e persistente, a sua disposição direta no meio ambiente causa diversos impactos, como liberação de gases, mau cheiro, salinidade, sodicidade,

fitotoxicidade, remobilização de metais, toxicidade, anóxia, eutrofização, acidificação, bloqueio da entrada de luz, entre outros (RAMOS-VAQUERIZO et al., 2018). Quando aplicada sem critérios, pode causar desequilíbrio na capacidade de troca de nutrientes e cátions e pode induzir a saturação do solo, causando problemas como a lixiviação de seus constituintes para as águas subterrâneas. Além disso, a sua aplicação com outros resíduos, incluindo o desperdício de cana-de-açúcar, pode causar alterações nos solos, mesmo aumentando os efeitos já conhecidos (AQUINO et al., 2015).

Diante disso, fez-se necessária uma legislação para determinar os parâmetros em relação à disposição da vinhaça no solo para fins agrícolas. A legislação vigente é a norma da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) P4.231 - Vinhaça - Critérios e Procedimentos para Aplicação no Solo Agrícola de fevereiro de 2015, que estabelece os critérios e procedimentos para o armazenamento, transporte e aplicação da vinhaça gerada pela atividade sucroalcooleira no processamento de cana-de-açúcar, no solo do estado de São Paulo. Esta norma exige que sejam feitos estudos de caracterização do solo e da vinhaça para que se definam as taxas de aplicação a serem utilizadas, não ocorrendo dessa maneira, saturação do solo e, conseqüentemente, evitando a possível poluição deste e dos mananciais (CETESB, 2015).

Segundo Uyeda (2009), a disposição da vinhaça pode causar o aumento de sais sobre a estrutura do solo, que ocorre, basicamente, pela interação iônica existente entre os cátions presentes na solução e a fração argila. A característica principal deste efeito é a expansão da argila quando úmida e a contração quando seca, devido principalmente ao excesso de sódio trocável. Se esta expansão for exagerada, poderá ocorrer a fragmentação das partículas, causando a dispersão da argila, modificando a estrutura do solo. De modo geral, estes solos apresentam problemas de permeabilidade e qualquer excesso de água causará encharcamento na superfície, prejudicando o crescimento da cultura por falta de aeração e aumentando os riscos de erosão pelo escoamento superficial.

A vinhaça, segundo Ludovice (1997), também pode causar poluição às águas subterrâneas. O autor afirma em seu estudo que a disponibilidade da vinhaça coloca em risco a potabilidade dos lençóis freáticos, uma vez que solos sob os canais de escoamento de vinhaça não impermeabilizados são excessivamente suscetíveis a contaminação por percolação na ordem de 91,4%.

Sendo assim, com a criação das normas ambientais, especialmente no estado de São Paulo,

têm-se colocado pressão nos produtores tradicionais de açúcar e álcool a partir da cana-de-açúcar, ressaltando a necessidade de criação de tratamentos da vinhaça antes do seu descarte, além de novos usos para a mesma (QUITERIO, 2013).

2.2. Sistema Híbrido de Tratamento

Segundo Mota et al. (2013), para reduzir os impactos negativos da disposição da vinhaça no solo, poderiam ser consideradas políticas ambientais que incentivassem o tratamento biológico anaeróbico, uma vez que, esse tratamento não só reduz os poluentes mas também produz energia renovável em forma de biogás. A produção de biogás por digestão anaeróbia é o processo mais desenvolvido e economicamente viável para o tratamento da vinhaça (HOARAU et al., 2018).

Satyawali e Balakrishnan (2008) descrevem que, por remover cerca de 80% da DBO, o tratamento anaeróbico é o tratamento primário mais atrativo. O tratamento anaeróbico produz resíduos estabilizados que podem ser usados como fertilizantes sem criar problemas de poluição de água. Estudos de tratamento anaeróbico de vinhaça mostraram que a DQO foi reduzida em 67-98% usando reatores de leito fixo (VIJAYARAGHAVAN; RAMANUJAM, 2000), 75-95% usando reatores de leito fluidizado (GARCÍA-BERNET et al., 1998), 69% (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011) para 73% (FERRAZ et al., 2016) utilizando reatores de manta de lodo anaeróbio de fluxo ascendente (UASB); 83% usando um reator anaeróbio em batelada sequencial (ALBANEZ et al., 2016), e 97% usando um biorreator de membrana (MOTA et al., 2013).

Devido ao impacto que a vinhaça de cana-de-açúcar pode causar no meio ambiente, os CWSs tornaram-se uma opção viável para se tratar efluentes. Em termos econômicos, possui baixo custo de construção e manutenção. Em termos operacionais, é um sistema com um funcionamento simplificado e eficiente; na esfera ecológica, devido a seu apelo “verde” graças ao uso de macrófitas, proporcionam uma ótima estética paisagística, e de caráter sustentável, por requerer baixíssimo uso de energia elétrica e a ausência de processos químicos intensivos e complexos (NOGUEIRA, 2003).

Ainda existem muitas restrições sobre o uso de CWS e, consequentemente, poucos estudos sobre a eficiência destes sistemas construídos em ambientes localizados em regiões de clima tropical (BITAR, 2006).

O CWS pode ser isolado ou combinado a outros tipos de tratamentos de água e de efluentes, ocasionando resultados satisfatórios, uma vez que consegue remover com grande

eficiência poluentes e patógenos presentes na água (SHUTES, 2001). A utilização de macrófitas aquáticas é interessante, pois está diretamente ligada à capacidade de retenção de nutrientes das mesmas. Porém, a constante oferta de nutrientes pode resultar também na proliferação descontrolada, condições estas encontradas em certos tipos de efluentes (MORAES; 1999).

As lagoas de estabilização são grandes tanques de pouca profundidade em que o efluente é tratado através de processos naturais. Os principais organismos que atuam nas lagoas são algas e bactérias, a primeira fornecendo oxigênio via fotossíntese e a segunda degradando a matéria orgânica (BIDOIA et al., 2016). Como a vinhaça é um líquido de cor escura, a parte inferior do resíduo recebe pouca luz; assim, as reações anaeróbicas são mais predominantes neste sistema.

As águas residuais constituem um meio de crescimento ideal para um grande número de micro-organismos, os quais desempenham papel fundamental em todos os estágios do tratamento biológico (HORAN, 1990). Os processos biológicos são mais econômicos dentre os utilizados para a remoção de matéria orgânica. Por esse motivo, são amplamente empregados no tratamento de efluentes líquidos. Além da remoção de matéria orgânica, os processos biológicos podem ser usados para a oxidação de compostos, tais como nitrogênio amoniacal e sulfetos, bem como na redução de nitratos e de sulfatos (BIDOIA et al., 2016).

Efluentes de adegas e destilarias são caracterizados pelo seu alto teor orgânico e teor de sólidos (SHEPHERD et al., 2001). Atualmente, os sólidos em suspensão são removidos pelo processo de evaporação, tendo um custo elevado (ARORA et al., 2011). Sendo assim, o uso de filtros e membranas para reter os sólidos suspensos é uma alternativa viável para diminuir estes sólidos suspensos (HOURAU et al., 2018).

A biorremediação é definida como o processo pelo qual os organismos vivos (bactérias, fungos, minhocas e plantas) degradam ou transformam e desintoxicam perigosos contaminantes em compostos inócuos ou em formas menos tóxicas. Este processo acarreta transformações dos poluentes ambientais pelas reações que fazem parte de seus processos metabólicos. Assim sendo, os organismos vivos com capacidade para biorremediação possuem enzimas e vias que lhes permitam desintoxicar e/ou mineralizar os poluentes (PAUL et al., 2005; VIDALI, 2001; USEPA, 2005).

O sistema radicular das plantas é de grande importância para a remoção de contaminantes devido à liberação de oxigênio e carbono orgânico a partir das raízes para o ambiente circundante (WEI et al., 2003; WIESSNER et al., 2005, 2008). Nas raízes ocorrem diferentes transformações

microbiológicas, tais como a mineralização de carbono orgânico, nitrificação, desnitrificação, redução de sulfato e re-oxidação de compostos reduzidos de enxofre simultaneamente em pequena escala (LIESACK et al., 2000; BEZBARUAH; ZHANG, 2004; WIESSNER et al., 2005). Esta combinação e a proximidade dos diferentes processos redox são de importância para a eficácia de remoção e estão entre as principais vantagens de tratamento de águas residuais por CWS, em comparação com outras tecnologias (WU et al., 2013).

Por meio dos parâmetros físico-químicos é possível saber a biodegradabilidade do efluente, uma vez que a razão DQO/DBO indica a fração biodegradável, sendo possível tecer conclusões tomando como referência seu valor. Segundo Jardim e Canela (2004), quando o valor da relação DQO/DBO é baixo, valores menores que 2,5, a fração biodegradável é elevada, sendo indicado o tratamento biológico para tal resíduo. Quando esta relação é elevada, a fração inerte (não biodegradável) é alta (von SPERLING, 2005). Considerando este cálculo, pode-se sugerir que no caso da vinhaça, cuja razão é baixa, o uso de um sistema híbrido de tratamento é adequado como alternativa de tratamento biológico.

2.3. Peixes como bioindicador e seus biomarcadores

O aumento da quantidade de contaminantes no ecossistema aquático necessita do entendimento do efeito biológico de xenobiontes na biota aquática (ALBUQUERQUE, 2007). Os peixes reúnem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, em que são particularmente utilizáveis, pois alertam sobre o potencial perigo de substâncias químicas ou para a possibilidade da poluição ambiental (POWERS, 1989). Além disso, os peixes acumulam substâncias químicas por exposição direta aos químicos presentes nas águas dos rios e mares, ou através da cadeia alimentar do ecossistema de maneira indireta (ATEEQ et al., 2002). Sendo assim, os peixes são intensamente utilizados como bioindicadores em avaliações de contaminação ambiental (FONTANETTI et al., 2012; ARANA et al., 2017).

Os peixes, como um todo, são excelentes para este tipo de estudo, pois possuem a capacidade de retirar, estocar e bioacumular compostos e/ ou poluentes em seus organismos (STREIT, 1998). Podem ser mantidos em laboratório e são facilmente expostos à substâncias tóxicas de maneira similar a outros vertebrados superiores, podendo ser usados para a avaliação da presença de substâncias que tenham o potencial de causar efeitos teratogênicos e

carcinogênicos em humanos (HARSHBARGER; CLARCK, 1990). Sendo assim, são considerados excelentes sistemas-teste para ensaios laboratoriais realizados para a investigação da toxicidade de substâncias contaminantes em ecossistemas aquáticos (ALVES- COSTA, 2001).

A tilápia (*Oreochromis* sp) é uma espécie nativa da África e foi introduzida no Brasil por volta de 1971, no Ceará (CASTAGNOLLI, 1992). A espécie *O. niloticus* (tilápia-do-nilo) é originária da bacia do rio Nilo, no Leste da África (CARVALHO et al., 2006); pertence à família Cichlidae (SANTOS, 1977), apresenta coloração cinza azulada, corpo curto e alto, cabeça e cauda pequenas (GALLI; TORLONI, 1984). A característica principal que distingue *O. niloticus* é a presença de listras verticais por todo o comprimento da nadadeira caudal. É uma espécie de peixe cujo cultivo, bem como importância, vêm crescendo, sendo atualmente um dos cultivos mais importantes em aquicultura do mundo, atrás apenas da cultura de carpas e salmonídeos. Além disso, é a espécie de tilápia cultivada mais importante, representando mais de 80% da produção total de tilápias (MOUSA; MOUSA, 1999; AL-SHAMSI et al., 2006). Uma característica que torna vantajosa a criação de tilápias é a capacidade do organismo em obter um ótimo desenvolvimento em grandes concentrações populacionais, característica que diminui o custo de manutenção per capita (PONCE-MARBÁN et al., 2006). A tilápia-do-nilo é um ótimo modelo para avaliação do ecossistema aquático e para realização de estudos toxicológicos (GIRÓN-PÉREZ et al., 2007).

As alterações fisiológicas ou de outra natureza, nos tecidos ou fluidos corporais de um organismo, são considerados biomarcadores de efeito, que podem ser reconhecidos e associados a um comprometimento da saúde ou possível doença (NRC, 1987; WHO, 1993). Biomarcadores de efeito também podem ser utilizados para documentar as alterações pré-clínicas ou efeitos adversos para a saúde devido à exposição externa e absorção de uma substância química (VAN der OOST et al., 2003; CORREIA et al., 2017).

Segundo Oliveira et al. (2009), o excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO) em organismos é capaz de provocar/causar peroxidação lipídica atacando as citomembranas e danificando e alterando as estruturas de DNA. Sob o estresse poluente, o acúmulo de ERO e os danos do sistema antioxidante são os fatores-chave para os efeitos tóxicos nos organismos. Enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST) foram consideradas bons bioindicadores moleculares para o estresse oxidativo mediado por contaminantes (FERET et al., 2003). Logo, o estresse oxidativo é o resultado do

desequilíbrio entre a produção de EROs e defesas antioxidantes em organismos vivos (NISHIDA, 2011).

Portanto, por serem sensíveis aos agentes toxicantes no meio aquático, os peixes vêm se mostrando adequados para diversos estudos de toxicidade. Neste estudo foram utilizadas análises histológicas, histoquímicas, imunohistoquímicas e moleculares como biomarcadores em brânquia e fígado.

2.3.1. Análise da brânquia como biomarcador

As brânquias dos peixes são constituídas por filamentos ou lamelas primárias arranjados em arcos duplos ao longo do osso. As lamelas secundárias são originadas nos filamentos e estão dispostas perpendicularmente às margens inferior e superior de cada filamento (ROSETY-RODRÍGUEZ et al., 2002).

O epitélio branquial é constituído por diferentes tipos celulares, incluindo células pavimentosas ou respiratórias, células mucosas e células clorídricas, sendo estas últimas, em peixes de água doce, envolvidas em atividades de transporte iônico (LAURENT et al., 1985; LAURENT; PERRY, 1991). O número, tamanho, forma e estrutura das células clorídricas podem ser modificados pela exposição a certos fatores ambientais (JAGOE; HAINES, 1997; BRITO, 2009). A determinação dos efeitos adversos pode ser realizada histopatologicamente, investigando lesões, alterações ou formação de tumores (neoplasias) nos tecidos dos peixes (VAN der OOST et al., 2003).

A célula clorídrica é uma dos quatro tipos de células diferenciadas presentes no epitélio branquial (PISAM; RAMBOURG, 1991; PERRY, LAURENT, 1993). Os outros tipos celulares são as células pavimentosas, células mucosas e células neuroepiteliais (BAILLY et al., 1992).

As células pavimentosas constituem a maior parte da superfície branquial; são caracterizadas por serem constituídas por cristas em suas superfícies, as quais, segundo Mallat (1985), são importantes na retenção de muco no epitélio branquial, como uma forma de proteção contra alterações ambientais.

O muco é normalmente encontrado nos filamentos, mas pode ser encontrado no epitélio respiratório de peixes expostos a condições de estresse, o que pode sugerir que a camada formada pela produção de muco protege as superfícies lamelares contra os agentes tóxicos, infecciosos e partículas em suspensão (MALLAT, 1985). Devido à função de proteção do tecido que o muco

apresenta (BERNET et al., 1999), o aumento de células mucosas é um indicativo de presença de substâncias tóxicas na água. Sendo assim, pode-se dizer que a produção de muco é uma resposta generalista para exposição à poluição e, mesmo sem uma ligação entre essas alterações e contaminantes específicos, este controle fornece uma ferramenta útil para o monitoramento biológico (DAVID; FONTANETTI, 2009). Takashina e Hibiya (1995) relataram a hipersecreção de muco como sendo resultado de uma resposta crônica contra infecções parasitárias ou bacterianas ou contra produtos químicos irritantes.

Correia et al. (2017b) avaliaram as brânquias de *O. niloticus* após a exposição à vinhaça e observaram a ação tóxica da vinhaça de cana-de-açúcar, que causou alterações histopatológicas nos animais expostos em todas as diluições testadas no estudo. Os autores observaram que as brânquias dos animais submetidos às diluições de 1 e 5% de vinhaça *in natura* apresentavam alterações como desprendimento epitelial, desorganização do epitélio lamelar, hemorragia, hipertrofia das células pavimentosas da lamela, demonstrando assim a toxicidade deste resíduo.

2.3.2. Análise do fígado como biomarcador

Segundo Figueiredo-Fernandes et al. (2007), a verificação das alterações histológicas em fígado de peixe é altamente sensível e a maneira mais precisa para avaliar os efeitos de compostos xenobióticos em campo e em estudos experimentais.

O fígado é um órgão chave quando se considera a ação de poluentes sobre os peixes, pois é muito sensível a contaminantes ambientais. Esse fato deve-se a sua alta capacidade de acumular tais substâncias, muitas vezes mais do que no próprio ambiente ou em outros órgãos (HEALTH, 1995).

Embora o fígado tenha a capacidade de degradar e metabolizar compostos tóxicos, seus mecanismos de regulação podem ser sobrecarregados por concentrações elevadas destes produtos, resultando, consequentemente, em danos na estrutura do órgão (HINTON; LAUREN, 1990; VAN DICK, 2003). Sendo assim, a exposição a agentes tóxicos pode causar alterações histológicas no fígado. A histologia de fígados de peixes pode, portanto, servir como um modelo para o estudo das interações entre fatores ambientais e as estruturas hepáticas, bem como suas funções (BRUSLÉ et al., 1996).

Alguns estudos, utilizando espécies de peixes expostos a diferentes tóxicos, foram capazes de evidenciar alterações histopatológicas no fígado de tais espécimes (BERNET et al., 2004;

MISHRA; MOHANTY, 2008, MARINHO et al., 2014).

O fígado de peixes apresenta funções semelhantes ao dos mamíferos. Suas funções incluem a assimilação dos nutrientes, produção de bile, desintoxicação e a manutenção da homeostase metabólica do corpo, que inclui o processamento dos carboidratos, proteínas, lipídeos e vitaminas. O fígado também desempenha um papel chave na síntese de proteínas do plasma, como o fibrinogênio e a albumina (GENTEN et al., 2008).

De uma maneira abrangente, o fígado constitui uma glândula digestiva composta por parênquima celular (hepatócitos) e por fibras que promovem sua sustentação. A superfície hepática é revestida por uma membrana serosa e o tecido conectivo dessa cápsula penetra no parênquima hepático. Os hepatócitos são células com forma poligonal que possuem importantes funções metabólicas. Também é possível visualizar no fígado vascularização de grande e pequeno calibre, dutos biliares, tecido pancreático e centros melanomacrofágicos (HIBIYA, 1982).

Akiyoshi e Inoue (2004) classificaram 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 por meio dos vasos perilobular para centrolobular.

A toxicidade da vinhaça em peixes também foi verificada por meio da histopatologia do fígado. Marinho et al. (2014) avaliaram os efeitos das diluições da vinhaça da cana-de-açúcar em fígados de tilápia (*O. niloticus*). Os autores observaram alterações histopatológicas significativas, como perda de integridade citoplasmática e limite celular, desorganização tecidual e redução do acúmulo de polissacarídeos, com aumento da concentração de vinhaça.

2.3.3. Estresse oxidativo como biomarcador

Numerosos parâmetros bioquímicos podem ser utilizados como biomarcadores, os quais oferecem informações importantes dos possíveis riscos, em seu estágio inicial, que os organismos expostos a contaminantes ambientais podem apresentar (ARANA et al., 2017).

Indicadores de estresse oxidativo estão cada vez mais sendo usados como biomarcadores

para entender as consequências fisiológicas de como os animais estão distribuídos em espaço e tempo e como são influenciados nos diferentes estágios de vida (BIRNIE-GAUVIN et al., 2017).

A produção de ERO está positivamente associada à concentração de oxigênio dentro de um organismo (JAMIESON et al., 1986). Quando o aumento da produção de EROs excede a capacidade de um organismo para extinguir essas espécies reativas com o uso de antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo, prejudicando os componentes celulares (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2015). No entanto, a EROs também podem servir como moléculas de sinalização, com maior sensibilidade a baixas concentrações, nas quais seus efeitos de sinalização são mais pronunciados (DRÖGE, 2002; VALKO et al., 2005). Para se proteger contra as EROs potencialmente prejudiciais, os organismos desenvolveram um sistema para prevenir ou reparar os efeitos do estresse oxidativo. A prevenção vem na forma de antioxidantes, que podem ser enzimáticos (por exemplo, SOD, CAT e GPEROX) (VALKO et al., 2005).

Todos os organismos fotossintetizantes e aeróbicos produzem EROs, através do metabolismo fisiológico (BROOKES, 2005). O radical superóxido é, normalmente, o primeiro ERO formado, eventualmente conduzindo à formação do peróxido de hidrogênio e, finalmente, radicais hidroxil, que são quimicamente, os mais prejudiciais das EROS (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

As espécies reativas de oxigênio são induzidas por substâncias, tais como íons metálicos de transição, pesticidas e poluentes do petróleo (SLANINOVA et al., 2009; LUSHCHAK, 2011). Os radicais livres também são produzidos por fontes celulares endógenas durante o metabolismo celular normal. A respiração mitocondrial é a principal fonte endógena de EROs. A produção elevada de ERO pode causar oxidação de proteínas e lipídios, alterações na expressão gênica e alterações no estado redox da célula (LIVINGSTONE, 2003).

Essencialmente, as defesas antioxidantes são de três classes gerais, incluindo reduções solúveis em água (glutathiona, ascorbato, urato), vitaminas solúveis em gordura (α -tocoferol, β -caroteno) e enzimas CAT, SOD e glutathiona peroxidase (GPEROX). Uma característica importante dessas enzimas é a sua indução em condições de estresse oxidativo (incluindo exposição à compostos redox ativos); tais induções podem servir como uma adaptação importante a essas condições (Di GIULIO et al., 1989).

Os mecanismos das defesas antioxidantes nos peixes incluem o sistema enzimático e os antioxidantes de baixo peso molecular, semelhantes aos dos mamíferos, embora as isoformas

específicas de enzimas em várias espécies de peixes não tenham sido bem identificadas (Di GIULIO; MEYER, 2008).

O estresse oxidativo pode estar associado à atividade SOD e/ou CAT elevada ou deprimida. Pode ser elevado devido à indução pelo estressor ou deprimido como resposta tóxica ao estressor. No caso de exposição a poluentes mistos, os dois processos podem ocorrer simultaneamente sem alteração líquida na atividade observável. A atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPEROX) protege os organismos do dano oxidativo pela remoção de espécies de oxigênio parcialmente reduzidas (Di GIULIO et al., 1989). As GSTs fornecem defesa antioxidante contra o estresse oxidativo em todos os tecidos vitais (YU et al., 2008).

As GSTs desempenham duas funções importantes para lidar com os xenobióticos. Em primeiro lugar, participam da desintoxicação e, em segundo lugar, fornecem defesa antioxidante ao estresse oxidativo induzido pelo xenobionte (FROVA et al., 2006; BLANCHETTE et al., 2007). Devido à elevada poluição dos ecossistemas aquáticos e seu provável impacto na saúde dos peixes, a ativação de xenobióticos e, a desintoxicação e os sistemas antioxidantes de um grande número de espécies de peixes foram pesquisados (SAYEED et al., 2003; MORTENSEN; ARUKWE, 2007).

O malondialdeído (MDA) é um dos intermediários mais importantes e o aldeído individual mais abundante produzido durante a peroxidação lipídica, que é conhecida por sua capacidade de interagir com o DNA. O MDA *in vitro* pode também alterar proteínas, RNA e muitas outras biomoléculas (DRAPER; HADLEY, 1990). Os aldeídos são produzidos quando hidroperóxidos lipídicos decompõem-se em sistemas biológicos, e é interessante identificar e medir esses compostos como um índice da extensão da peroxidação lipídica e como uma ajuda para elucidar o papel dos aldeídos como agentes causais em certas condições patológicas (DRAPER; HADLEY, 1990).

Método baseado no fato de que alguns produtos da peroxidação lipídica são reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBA). Deste modo, quando se adiciona TBA à uma amostra de material biológico é possível detectar a presença de substâncias conhecidas por TBARS (do inglês, thiobarbituric acid-reactive substances). Embora de um grande número de substâncias apresentem este tipo de reatividade, o MDA é a principal delas. Neste teste, cada molécula de MDA se complexa com duas de TBA resultando na formação de adutos que podem ser quantificados por espectrofotometria. Uma vez detectada nos tecidos e/ou plasma, há um forte indício da ocorrência

de peroxidação lipídica e, portanto, do estresse oxidativo (BUEGE; AUST, 1978).

Todos os organismos, das bactérias aos mamíferos, respondem a diferentes estressores ambientais da mesma forma, através da síntese de proteínas conservadas, conhecidas como proteínas de choque térmico (Heat Shock Protein - HSP) (HAMER et al., 2004). Tais proteínas são codificadas por várias famílias de genes e classificadas de acordo com seu peso molecular, sendo que a família das HSP70, com 70 kDa, representa as mais conservadas (MOREIRA-DE-SOUSA et al., 2018).

O estímulo desta proteína se dá pelo aumento da temperatura ambiente, mas outros fatores podem desencadear o processo de expressão gênica desta proteína, não apenas, mas também pela exposição a substâncias de natureza química, física ou biológica (MOREIRA-DE-SOUSA et al., 2018). Sendo assim, por serem também induzidas por substâncias tóxicas e não apenas pelo calor, as HSPs passaram a ser chamadas de proteínas de estresse (FEDER; HOFMANN, 1999) e têm sido utilizadas como biomarcadores em estudos de toxicidade (LEE et al., 2006; MOREIRA-DE-SOUSA et al., 2018).

Em condições normais, os genes que a codificam são expressos em níveis extremamente baixos. Na presença de um toxicante que seja capaz de alterar a conformação de alguma proteína e, por consequência, sua função, é iniciada uma resposta de estresse, a qual culmina com o rápido aumento da transcrição das HSPs (KIANG; TSOKOS, 1998; CALABRESE et al., 2005).

A utilização das HSPs como biomarcadores é comum em estudos de toxicologia aquática (MORAGA et al., 2005; LEE et al., 2006; FASULO et al., 2010; RAJESHKUMAR; MUNUSWAMY, 2011; MINGUEZ et al., 2013; MUPOSHI et al., 2015; ANSOAR-RODRIGUEZ et al., 2016).

A HSP70 é uma chaperona molecular efetiva, desempenhando um papel na proteção celular de danos em resposta a estímulos de estresse (PADMINI, RANI; 2008). Padmini e Rani (2008) utilizaram das técnicas moleculares e de imunohistoquímica para verificar a expressão da HSP70, para avaliar o estresse causado pela variação sazonal nos hepatócitos de peixe. Segundo Moreira-de-Sousa et al. (2018), os níveis de expressão do gene *hsp70* em peixes tende a aumentar quando expostos à poluentes. Este fenômeno foi observado por Coelho et al. (2018), uma vez que, peixes expostos ao percolato da vinhaça e a vinhaça *in natura* apresentaram aumento na expressão da proteína HSP70.

No contexto da regulação da expressão gênica que assegura o equilíbrio celular, as

alterações ambientais modulam as respostas metabólicas e moleculares de um organismo, respostas essas que subsidiam a sobrevivência ou não desse organismo em seu habitat.

2.4. Anfípodas como bioindicadores e análise comportamental como biomarcador

Estudos de ecotoxicologia podem usar uma gama de diferentes parâmetros para avaliar o efeito de substâncias tóxicas no ambiente, como químicas, bioquímicas, genéticas, morfológicas, fisiológicas, ecológicas, etc. Compreender e usar mais de um tipo de efeito de exposição nos organismos é muito importante para alcançar a situação mais próxima da realidade. Além disso, alguns efeitos observados permitem ligar os efeitos tóxicos obtidos nos níveis bioquímicos/celulares aos impactos observados na saúde e na aptidão das populações.

Devido à sua importância em estudos ecotoxicológicos, os anfípodas estão se tornando um grupo interessante de organismos para avaliar os efeitos de contaminantes. A relevância do uso de anfípodas em estudos ecotoxicológicos é devido ao fato de serem abundantes e ecologicamente relevantes no ecossistema aquático, pois são fundamentais para muitas cadeias alimentares e têm um papel importante na dinâmica dos ecossistemas (ALONSO et al., 2010; MELO; NIPPER, 2007). Eles têm ciclos de vida e de reprodução curtos e são capazes de tolerar diferentes tipos de sedimentos e diferentes níveis de salinidade. Os anfípodas gamarídeos (Fig.1) tem sido frequentemente utilizados em estudos de ecotoxicologia, sendo considerados excelentes para monitorar a saúde dos biotipos aquáticos e os efeitos de contaminantes antropogênicos (ARCE FUNCK et al., 2013; FELTEN et al., 2008; GERHARDT, 1995; VELLINGER et al., 2012).

Estudar os efeitos do estresse em organismos individuais é importante porque considera-se o uso de informações em nível individual para: (1) elucidar as bases mecânicas da variação interpopulacional; (2) prever efeitos no nível da população; e (3) monitorar o estresse nas comunidades naturais. O conhecimento das respostas em nível de organismo é essencial para entender como os estressores causam efeitos biológicos adversos e as estratégias adotadas pelos organismos para tolerar o estresse, assim como os efeitos dos estressores nas populações podem ser previstos a partir do conhecimento dos efeitos dos estressores nos balanços energéticos individuais. Respostas em nível de organismo podem ser usadas para monitorar o estresse em ambientes naturais (MALTBY, 1999).

O comportamento pode ser definido como o resultado final de uma sequência de eventos

neurofisiológicos. Estes eventos incluem estimulação de neurônios sensoriais e motores, contrações musculares e liberação de mensagens químicas (LAGADIC; CAQUET; RAMADE, 1994). Além disso, as respostas comportamentais integram muitos processos celulares vitais para a sobrevivência e reprodução dos organismos; desta forma, refletem as consequências bioquímicas e ecológicas do impacto tóxico (GERHARDT, 1995). Vários estudos usaram respostas comportamentais como ferramentas para testes de ecotoxicidade e monitoramento da qualidade da água (por exemplo, atividade locomotora, atividade ventilatória, taxa de alimentação), porque é sensível, rápido, simples de executar e barato (WALLACE; ESTEPHAN, 2004). A mobilidade do organismo também é um marcador comportamental ecologicamente relevante, uma vez que a locomoção é necessária para encontrar comida, escapar de predadores e obter sucesso de acasalamento. Qualquer poluente que interfira com a mobilidade provavelmente reduza a aptidão dos organismos e poderia envolver "morte ecológica" (ARCE FUNCK et al., 2013; SCOTT; SLOMAN, 2004; VELLINGER et al., 2012).

Por exemplo, para a exposição à metais, são encontrados na literatura vários estudos com invertebrados e mudanças comportamentais, especialmente usando *Gammarus* sp., anfípodos de água doce. Gerhardt (1995) relatou respostas comportamentais como aumento da ventilação e diminuição da locomoção em *Gammarus pulex* exposto a concentrações subletais de Pb e Cu (GERHARDT, 1995). Felten et al. (2008) relataram os efeitos da exposição ao cádmio em condições de laboratório para *G. pulex* e descobriram que as respostas comportamentais, como taxa de alimentação, atividades locomotoras e ventilatórias, foram significativamente reduzidas em organismos expostos a Cd (FELTEN et al., 2008). Também usando *G. pulex*, Vellinger et al. (2012) investigaram os efeitos do cádmio e do arsenato no comportamento do anfípoda e descobriram que as respostas comportamentais diminuíram com o aumento da concentração de elementos. Arce Funck et al. (2013) estudaram as respostas comportamentais do anfípoda *Gammarus fossarum* macho exposto a Ag (0, 0,5, 1, 2 e 4 µg/L). As atividades locomotoras e ventilatórias foram significativamente reduzidas nos gamarídeos expostos ao Ag e após a exposição de 96 h (ARCE FUNCK et al., 2013).

Sendo assim, aprender e aplicar comportamentos usando anfípodes para investigar os efeitos de exposição a contaminantes é uma ferramenta importante na ecotoxicologia para entender melhor os efeitos e avaliar os riscos, como o uso de vinhaça como fertilizante em plantações de cana-de-açúcar.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi verificar a eficácia do tratamento da vinhaça por meio de um sistema híbrido de tratamento, mediante análises físico-químicas da vinhaça biorremediada e análise das macrófitas aquáticas utilizadas no sistema de tratamento. Foi também propósito deste estudo avaliar o impacto da vinhaça biorremediada sobre a vida aquática, utilizando tilápias e anfípodas expostos a diferentes diluições deste composto. A análise da toxicidade da vinhaça após o tratamento sobre os animais foi realizada sob diferentes aspectos:

- a) análise da superfície das células pavimentosas das brânquias dos peixes expostos a vinhaça após o tratamento por microscopia eletrônica de varredura;
- b) análise de possíveis alterações teciduais da brânquia e do fígado dos peixes por meio de histologia;
- c) avaliação das células mucosas da brânquia e possíveis alterações fisiológicas do fígado por meio de testes histoquímicos;
- d) investigação dos efeitos citotóxicos da vinhaça no equilíbrio celular utilizando as Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real (qPCR);
- e) verificação de estresse celular por meio da técnica de Determinação de Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS);
- f) avaliação da presença da proteína HSP70 no tecido do fígado por meio de marcação imunohistoquímica;
- g) observação do comportamento de natação dos anfípodas após exposição às vinhaças *in natura* e biorremediada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Vinhaça

As amostras de vinhaça de cana-de-açúcar foram coletadas em usina de cana-de-açúcar, localizada no interior do estado de São Paulo. O efluente foi submetido imediatamente ao sistema híbrido de tratamento após sua coleta. O resíduo resultante do tratamento foi mantido em câmara fria (4°C), no Departamento de Biologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) de Rio Claro, até o início dos experimentos.

4.2. Materiais biológicos

Para compor o sistema híbrido de tratamento, foi utilizada a macrófita aquática flutuante *Eichhornia crassipes* (Fig. 2), conhecida como aguapé, baronesa ou rainha do lago, devido às suas características de robustez associada a uma grande capacidade de crescimento vegetativo. Segundo Colletti (2008), esta planta possui capacidade de resistir a águas altamente poluídas com grandes variações de temperatura, nutrientes, pH, substâncias tóxicas e metais. Os aguapés foram obtidos na lagoa de uma fazenda localizada na Rodovia SP215, entre as cidades de Ribeirão Bonito e Dourado, São Paulo.

Para o estudo de toxicidade, foram utilizados como organismos teste, peixes da espécie *O. niloticus* (Perciformes, Cichlidae), popularmente conhecido como tilápia do Nilo. Foram utilizados indivíduos com tamanho médio de 7 cm, para evitar diferenças intra-específicas relacionadas ao tamanho e idade dos peixes. Os espécimes, oriundos de piscicultura, foram aclimatados em tanques com sistema de filtração, aeração adequada, por no mínimo 15 dias.

Este estudo teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa no Uso Animal da UNESP – Rio Claro, SP (CEUA – IB – UNESP – CRC), protocolo nº 2488 de 18 de Junho de 2015.

Para o estudo de comportamento animal, foram utilizados anfípodas da espécie *Gammarus pulex*. Os indivíduos adultos foram capturados em rede de malha de 1 mm utilizando o método delineado pela Associação Biológica de Água Doce (FBA, 2015). As coletas foram realizadas no rio Ems, em Westbourne (N50°51'34,8”, W0°55'45,8”), Reino Unido, e os animais foram transportados para o Instituto de Ciências Marinhas (IMS) da Universidade de Portsmouth, Reino Unido, e aclimatados por uma semana com fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro e em temperatura de 6°C.

4.3. Sistema Híbrido de Tratamento

O sistema de tratamento foi construído por três etapas (Fig. 3).

1ª etapa. Estabilização da vinhaça: os tanques utilizados para o processo foram de $1,35 \times 1,00 \times 0,73$ m de dimensão. Cada tanque teve um volume de 750 L. A vinhaça da cana foi colocada nos tanques por 147 dias, sem interferência humana.

2ª etapa. Filtração: o filtro utilizado foi composto por papel de filtro microporoso de 20 μm envolvido com uma estrutura de tela metálica e coberto por um gel têxtil não tecido. A filtração da vinhaça após a estabilização foi realizada em um dia.

3ª etapa. Fitorremediação: para a fitorremediação, foram utilizadas macrófitas aquáticas flutuantes - *E. crassipes*. As macrófitas aquáticas ocuparam aproximadamente 80% da superfície do tanque seguindo as recomendações de Wolverton (1979). Devido à resposta a exposição à vinhaça, após 7 dias os aguapés foram substituídos e permaneceram por mais 8 dias, totalizando um período de 15 dias de fitorremediação. Para comparar os resultados, plantas mantidas em água, sem vinhaça, serviram como grupo controle.

Os tratamentos foram realizados em uma escala intermediária, chamada de mesocosmo, na qual a área de superfície dos tanques estão na faixa de 0,5 a 5 m² (LI et al., 2014). Os tanques foram mantidos em um local arejado e coberto, para evitar que o volume do resíduo fosse afetado pela chuva. Durante o período de tratamento, a temperatura média foi de 23°C, com 70% de umidade (INPE, 2016). Os tratamentos foram realizados sem ar filtrado ou controle de temperatura, de modo a não aumentar o custo do sistema. Não houve renovação de efluentes, indicando um sistema estático. O experimento de tratamento foi realizado em triplicata.

4.4. Análise físico-química da vinhaça

Foram realizadas análises físico-químicas do efluente, por laboratório especializado, para determinação mais efetiva de sua composição (ABNT, 2005). Foram determinados os parâmetros: pH, condutividade elétrica, dureza, resíduo não filtrável total, nitrogênio nitrato e nitrito, nitrogênio total, amônia, cálcio, enxofre total, fosfato total, magnésio, potássio, sódio, sulfato, DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), DQO (Demanda Química de Oxigênio) e elementos traço (As, Ba, Cd, Cu, Cr, Hg, Mo, Ni, Pb, Se e Zn) foram obtidos utilizando a metodologia USEPA – Environmental Protection Authority (2005). As coletas das amostras foram realizadas no início do experimento (da vinhaça *in natura*), e no início de cada nova etapa

do tratamento, além da coleta final ao término do experimento.

4.5. Coleta e avaliação das macrófitas aquáticas

O material vegetal foi coletado e limpo por meio de sucessivas lavagens, para remoção de perifiton (biofilme que atua na interface entre o substrato e a água), detritos orgânicos e partículas inorgânicas associadas. Posteriormente, as plantas foram secas em estufa a 60°C, até atingirem peso constante, e trituradas em moinho para determinação da composição química da biomassa total (massa seca - MS) (HENARES; CAMARGO, 2014). As amostras foram armazenadas em local apropriado e foram avaliados os valores de nitrogênio, potássio, teores de matéria mineral (cinzas) e matéria orgânica. A determinação das concentrações de cálcio, cobre, ferro, manganês, magnésio, fósforo e zinco foram realizadas por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES - iCAP, 6000 Series ICP Spectrometer, Thermo Scientific, Alemanha) após processo de digestão ácida conduzido em micro-ondas (Berghof, modelo SW- 4, Alemanha). O método utilizado no processo de digestão foi adaptado de forma a não utilizar peróxido de hidrogênio H_2O_2 , no intuito de obter melhores limites de detecção (LD). As digestões foram conduzidas utilizando-se 0,4 g de amostra seca, com adição de 8 mL de HNO_3 concentrado.

Foram realizados testes fitoquímicos. A determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras de extrato etanólico das espécies estudadas foi feita por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu com modificações (BONOLI et al., 2004). O teor de polifenóis totais (PT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (20 a 180 $\mu\text{g/mL}$) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (NACZK; SHAHIDI, 2004).

4.6. Análise físico-química da água e diluições dos bioensaios

Foram realizadas análises físico-químicas da água, usada como controle, e das diluições em água da vinhaça biorremediada e *in natura* utilizadas para a montagem dos bioensaios. As

análises foram realizadas por laboratórios especializados para determinação mais precisa de sua composição. Dados referentes ao pH, DBO, DQO, sólidos totais dissolvidos, condutividade elétrica, nitrito, nitrato, turbidez e dos elementos Ag, Al, As, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Hg, Na, Ni, Pb e Zn foram obtidos utilizando a metodologia USEPA - Environmental Protection Authority (2005).

4.7. Bioensaio para avaliação da toxicidade da vinhaça nos peixes

A avaliação da toxicidade da vinhaça em corpos d'água teve como objetivo analisar a substância em caso de lixiviamento. O bioensaio foi realizado em três aquários com capacidade de 40L cada, dos quais um continha água limpa de poço artesiano, sem a adição de nenhum composto que foi utilizada como grupo controle. Os outros dois aquários continham a água e a vinhaça biorremediada em diluições de 1% e 5%. Estas diluições foram baseadas em estudos prévios realizados com a vinhaça *in natura* (MARINHO et al., 2014; CORREIA et al., 2017). Em todos os aquários foram colocados aleatoriamente cinco espécimes, que permaneceram expostos por 96 horas, para que então fossem retiradas suas brânquias e fígados para análise. O experimento foi realizado em triplicata, em local com temperatura controlada.

4.7.1. Coleta dos materiais

Após exposição, os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,1g de benzocaína em 1 mL de álcool etílico para cada 100 mL de água deionizada) e eutanaziados com espinhalamento por tesoura cirúrgica e dissecados em solução fisiológica. Tiveram o segundo arco branquial e o fígado retirados e fixados. A brânquia foi fixada em solução Bouin (15 mL de solução aquosa saturada de ácido pícrico, 5 mL de formaldeído e 1 mL ácido acético) e em fixador Karnovsky (KARNOVSKY, 1965). O fígado foi fixado em solução Bouin e formol cálcio; ambos permaneceram no fixador por aproximadamente 24 horas; em seguida, os materiais foram mergulhados em tampão fosfato de sódio pH=7,4 e mantidos em geladeira. Para as análises moleculares, os órgãos foram retirados, lavados em solução salina e congelados imediatamente a -80°C até serem processados para uso.

4.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das brânquias

O material foi desidratado em uma série de concentrações crescentes de acetona (50, 75, 90, 95, 100%), levado ao ponto crítico e colado em suporte metálico, sendo então analisado ao

microscópio eletrônico de varredura de baixo vácuo HITACHI TM3000 e fotografado.

4.9. Histologia

Os materiais coletados foram desidratados em série alcoólica por 20 minutos cada concentração (15, 25, 50, 70, 80, 90, 95 e 100%), colocados em resina de embebição 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. Depois de secas, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina.

4.10. Histoquímica

4.10.1. Polissacarídeos

Duas 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).

4.10.2. Proteínas Totais

Foi utilizada a técnica de coloração pelo azul de bromofenol. 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).

4.10.3. Lipídios

Para a detecção de lipídios, o material foi fixado em formol cálcio e submetido à técnica de azul do Nilo (lipídios ácidos). As lâminas foram imersas em solução de azul do Nilo, à 37°C, por 5 minutos. Foram então lavadas em água corrente por 5 minutos e passadas no ácido acético 1%, por 1 minuto. Em seguida, secas e as lâminas foram montadas com gelatina glicerinada (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

4.11. Análises moleculares para detecção de estresse oxidativo

4.11.1. Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real (qPCR)

Para avaliar a expressão de genes correlacionados a mecanismos de estresse celular foram realizadas análises de qPCR de dois genes. Para isso, após a exposição, os tecidos (fígado) foram coletados e congelados e utilizados na extração do RNA mensageiro (RNAm) utilizando-se Trizol® Reagent (Invitrogen) e seguindo as recomendações do fabricante. Aproximadamente 1 µg do RNAm de cada amostra foi utilizado em reações de transcrição reversa para preparo do DNA complementar (cDNA), seguindo as especificações do fabricante do High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). Reações de qPCR foram realizadas utilizando-se os reagentes do SYBR Green/Rox qPCR Master MIX (Life Technologies) e o ciclador Step One Plus – Applied Biosystems. Oligonucleotídeos específicos foram desenhados para verificar o produto transcricional dos genes catalase (CAT) (sense 5'ATGAGGAGGAGCGACAGAGA3'; antisense 5'AATTCTCGACCATGCGTTTC3'), glutathione peroxidase (GPEROX) (sense 5'AGAAATCCTCCTGTCGCTGA3'; antisense 5'GTCCTTCCCGTTCACTTCAA3'), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (sense 5'TGATAAGGACACCGATGTGG3'; antisense 5'CTCCAGCACCTGTAGAAG3'), superóxido dismutase (SOD1) (sense 5'AGGCGGCCACATTAACCACA3'; antisense 5'CATCTTCTGAAAGGAGCC3'), glutathione S-transferases M (GSTM) (sense 5'GGATGAAAAGGTTTCGAGTGG3'; antisense 5'ATTGGTGTAGCACAGCCTCA3') e proteína de choque térmico (Heat Shock Protein - HSP70) (sense 5'TTCAAGGTGATTTTCAGACGGAG3'; antisense 5'CTTCATCTTACCAGGACCATG3') com o auxílio do programa Gene Runner e utilizados nas reações de amplificação quantitativa. A análise dos resultados foi realizada utilizando-se o software apropriado do ciclador.

4.11.2. Determinação de Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Foi utilizado o TBARS Assay Kit (Cayman Chemical), respeitando-se as orientações do fabricante. O reagente quantifica colorimetricamente a peroxidação lipídica e a formação de malondialdeído (MDA). Alternativamente, a mensuração de TBARS foi realizada pela incubação de homogenatos de tecidos com 8.1% SDS, 20% ácido acético, 0.8% de ácido tiobarbitúrico (TBA) – pH 3,4, n-butanol/piridina (14:1). A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 532 nm, utilizando-se 1,1',3,3' tetrametoxipropano como controle (OHKAWA et al., 1979).

4.12. Teste de comportamento animal

Após período de aclimação no laboratório, os anfípodas foram expostos à vinhaça biorremediada e à vinhaça *in natura*. Os indivíduos foram expostos individualmente em recipientes de plástico com 200 mL de água do local de coleta, sob um fotoperíodo de 12 horas de escuro e 12 horas de claro (BOSSUS et al., 2014). Os animais foram expostos as diluições de 1 e 5% de vinhaça biorremediada e *in natura* por 96 horas. Ensaio comportamentais foram realizados para cada diluição usando DanionVision™ (Noldus Information Technology, Wageningen, Holanda) e seu software EthoVision® XT. Os animais foram colocados em placas com seis poços e as medidas de velocidade de nado (cm/s) e distância de deslocamento dos anfípodas foram filmadas.

4.13. Análise Estatística dos Resultados

4.13.1. Análise estatística das diferentes amostras do sistema híbrido de tratamento

Os testes de Shapiro Wilk e Levene foram empregados para avaliar a normalidade e homogeneidade dos dados, respectivamente, a fim de escolher testes adequados para analisar a variância e realizar comparações múltiplas em testes de hipóteses (OECD, 2006; MARÔCO, 2014).

A análise de variância um fator (ANOVA) foi usada como uma alternativa paramétrica, e o teste de Tukey HSD foi realizado para comparações múltiplas entre diferentes grupos. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado como alternativa não paramétrica, com teste de Dunn para comparações. O nível de significância utilizado nos testes de hipóteses foi $p < 0,05$.

4.13.2. Análise estatística das alterações histopatológicas em peixes

As observações foram realizadas em fotomicroscópio Zeiss ou Leica e as imagens foram capturadas utilizando-se programas próprios. Os resultados encontrados nos animais expostos às diferentes diluições de vinhaça biorremediada foram comparados com o grupo controle e com os dados encontrados na literatura, a fim de detectar se houve ou não alteração no tecido utilizado.

A descrição e a avaliação das alterações histopatológicas tiveram como base o protocolo de Bernet et al. (1999). Seguindo a adaptação do protocolo por Marinho et al. (2014), um fator de importância (w) foi definido para cada lesão, de acordo com sua importância patológica, ou seja, como isso afetou a função do órgão e a capacidade de sobrevivência dos peixes. As alterações foram previamente classificadas em três fatores de importância (w): (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 própria para o presente estudo, com as principais alterações encontradas nas brânquias e nos fígados dos peixes expostos a vinhaça biorremediada. Para melhor compreensão dos resultados, as anomalias histopatológicas descritas, também foram classificadas em escores (a) que variam 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 (1, 3, 5) foram considerados quando a alteração observada não esteve presente em todos indivíduos analisados.

Ao multiplicar o fator de importância pelo escore, obtém-se o índice da alteração. Para o cálculo do índice total de cada indivíduo, ou seja, o índice correspondente à avaliação das alterações histopatológicas em sua brânquia e fígado, foi utilizado o seguinte cálculo:

$$\text{Índice}_{\text{total}} = \sum (w \times a)_{\text{ind}}$$

A partir dos índices individuais foram obtidos 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% de significância para comparação de cada tratamento com o grupo controle. Este procedimento foi realizado para avaliar estatisticamente o conjunto de lesões histopatológicas encontradas. Assim, este método padronizado de avaliação permitiu a análise

semiquantitativa de danos aos órgãos, incluindo a extensão, a significância e a importância patológica das alterações.

4.13.3. Análise estatística dos ensaios bioquímicos e moleculares

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Graph Pad, versão 5.0 (Prism Inc.). O teste estatístico adotado foi ANOVA, sendo o valor de $p < 0.05$ para significância estatística.

4.13.4. Análise estatística do ensaio de comportamento animal

A análise estatística foi realizada no IBM SPSS®Statistics 24. Foram realizados testes de análise de variância one-way (ANOVA) para os dados de comportamento usando concentrações e tempo de exposição como fatores de forma independentes. Teste de Tukey HSD foi usado para análise post hoc. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados na forma de artigos científicos.

- **ARTIGO 1: Hybrid Treatment System for Remediation of Sugarcane Vinasse**
- **ARTIGO 2: Biorremediação de efluente oriundo da indústria sucroalcooleira: avaliação da diminuição da toxicidade por meio de histopatologia de brânquias de peixe**
- **ARTIGO 3: Análise da toxicidade de vinhaça biorremediada por meio de diferentes análises em fígado de *Oreochromis niloticus***
- **ARTIGO 4: Análise comportamental de anfípodas expostos a vinhaça *in natura* e biorremediada**



Hybrid treatment system for remediation of sugarcane vinasse

Ana Claudia de Castro Marcato^{a,*}, Cleiton Pereira de Souza^a, Amarilis Brandão de Paiva^a, Carlos Eduardo Eismann^a, Fernanda Flores Navarro^b, Antônio F. Monteiro Camargo^a, Amauri Antonio Menegário^a, Carmem S. Fontanetti^a

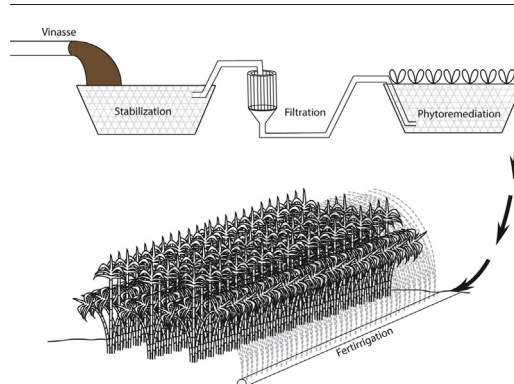
^a UNESP - São Paulo State University, Bioscience Institute, Rio Claro, São Paulo, Brazil

^b UNIARARAS-Hermínio Ometto Foundation, Jd. Universitário, Araras, São Paulo, Brazil

HIGHLIGHTS

- The stabilization is the essential step in the hybrid treatment system.
- The phytoremediation was responsible to reduction of the biodegradable part.
- Low COD/BOD index indicated the biological treatment was suitable to vinasse.
- The hybrid treatment system is an effective biogeochemical system.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 September 2018

Received in revised form 29 November 2018

Accepted 16 December 2018

Available online 17 December 2018

Editor: Paola Verlicchi

Keywords:

Stabilization

Stillage

Biogeochemical systems

Bioremediation

Eichhornia crassipes

ABSTRACT

The sugar and alcohol industries provide promising alternative energy sources to replace the use of petroleum derivatives. Vinasse is a byproduct of the alcoholic fermentation of various raw materials, and is used in the fertirrigation of sugarcane plantations. However, its excessive use leads to many soil and groundwater related problems, including toxicity to living organisms, acidification of soil and water, accumulation of heavy metals, and contamination of groundwater. The use of integrated systems, such as stabilization, filtration, and phytoremediation, have attracted interest in the treatment of wastewater from various sources, as these highly effective biogeochemical systems can reduce the pollutant concentrations in wastewater, thereby reducing its adverse effects. The aim of this work was to develop a hybrid treatment system to optimize the physical and chemical characteristics of vinasse so that it can be used as fertilizer for crops with a lower pollution impact. The results of this study validated the effectiveness of the proposed system and demonstrated positive modifications of vinasse.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

For economic, geopolitical, and environmental reasons, there have been worldwide attempts to reduce the use of fossil fuels. Among the

potential alternative sources of energy, ethanol has been the focus of much attention (Fuess and Garcia, 2014). In addition to fuel ethanol, chemical-grade ethanol represents a source of raw materials for the manufacture of chemicals.

Owing to its abundance in organic matter, vinasse (also known as distillery stillage or distillery spent wash) has been applied in fertirrigation, with good results over the years (Freire and Cortez,

* Corresponding author.

E-mail address: marcatoacc@gmail.com (A.C.C. Marcato).

2000; Rodrigues Reis and Hu, 2017; Hoarau et al., 2018). It has been shown to promote improvements in soil fertility, since it favours the availability of some elements for plants (Santana and Machado, 2008; Moraes et al., 2015). Thus, it can totally or partially replace the use of chemical fertilizers, especially those containing phosphorus (Corazza, 1996), reducing crop costs.

As shown by Christofolletti et al. (2013), direct application of vinasse to the soil can cause salinization; lixiviation of metals present in the soil to groundwater; changes in soil quality due to imbalance of nutrients, particularly manganese; alkalinity; increased phytotoxicity; and unpleasant odour. Although fertirrigation seems to be a good alternative to address the problem of vinasse disposal, Santana and Machado (2008) consider this to be a palliative method that does not truly solve the problem. In addition, to make vinasse available in the soil, certain environmental parameters need to be considered, including soil type, distance from water resources, and percentage of water retention in the soil (Laime et al., 2011).

By promoting changes in the physical properties of the soil, vinasse can either increase its infiltration capacity, contaminating groundwater, or reduce it, increasing water drainage, which may pollute surface water. In addition, the mechanisms of groundwater and aquifer recharge are controlled mainly by rainfall. Thus, when it comes into contact with soil containing vinasse, rainwater may infiltrate or drain superficially, polluting the water resources (Silva et al., 2007).

Many technologies have emerged with the aim of reusing or treating vinasse to reduce its toxicity (Rodrigues Reis and Hu, 2017; Chowdhary et al., 2018; Hoarau et al., 2018). Vinasse can be treated by physicochemical and biological processes, which can reduce its toxicity by degrading its organic components. The physicochemical processes involve reagents to oxidize organic compounds, whereas biological treatments involve aerobic and anaerobic techniques (Botelho et al., 2012).

Vinasse evaluated in this study had a biochemical oxygen demand (BOD) of 8846 mg/L and chemical oxygen demand (COD) of 13,252 mg/L. Treatment to reduce BOD and COD is essential prior to disposal of this residue in soil. If released in the soil untreated, it can reduce soil alkalinity and destroy crops (Kumar and Viswanathan, 1991).

Integrated treatment systems that use a constructed wetland system (CWS) are economical to maintain compared with conventional treatment methods, and are effective in reducing BOD and COD concentrations in final effluents (Chowdhary et al., 2018). The stabilization pond consists in a reduction of toxicity by means of natural organic matter stabilization process, without human intervention of physical characteristics (dilution, absorption and precipitation) (von Sperling and Chernicharo, 2005). Due to the high value of suspended solids in vinasse, filtration can be used to prevent passage of particles through the system and reaching the groundwater. Aquatic macrophytes can significantly reduce levels of nitrate, potassium, nitrogen, electric conductivity, calcium, sodium, magnesium, and phosphorus, and accumulate metals directly in their tissues; they also act as catalysts for purification reactions that usually occur in the rhizosphere of plants (Tilley et al., 2002; Mulidzi, 2010). Those elements can be found in the vinasse (Christofolletti et al., 2013; Rodrigues Reis and Hu, 2017; Hoarau et al., 2018).

The BOD is an indirect indication of biodegradable organic carbon levels, while the COD is an indirect indication of the organic matter content. By means of physicochemical parameters, it is possible to determine the biodegradability of the effluents using the COD/BOD ratio, which indicates the biodegradable fraction, and to draw conclusions based on the calculated values (von Sperling, 2005). In the case of vinasse, this ratio is low and the biodegradable portion is high; thus, the use of integrated systems for stabilization, filtration, and phytoremediation for its biodegradation is suitable as an alternative biological treatment.

Given the problems caused by vinasse, what can be done to mitigate this damage? Based on this question and the efficiency of three

treatment systems (stabilization, filtration, and phytoremediation) a hybrid system was developed for the treatment of sugar cane vinasse in order to reduce its toxic potential. This resulted in a viable treatment alternative for this residue, with advantages not only for the crop but also for the soil where it is released.

2. Design and performance of hybrid treatment system for vinasse

2.1. Experimental design

The design of the hybrid treatment system comprised of three steps.

1. The stabilization of vinasse: the tanks used for the process were $1.35 \times 1.00 \times 0.73$ m in dimension. Each tank had a volume of 750 L. The sugarcane vinasse was placed in the tanks for 147 days without human interference.
2. Filtration process: the filter used in the second step was composed of 20μ microporous filter paper wrapped with a metallic screen structure and covered by a non-woven textile gel. The filtration of the vinasse after stabilization was performed in one day.
3. Phytoremediation: for phytoremediation, floating aquatic macrophyte – water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) – was used owing to its robustness and great vegetative growth capacity. According to Colletti (2008), this plant has the capacity to withstand highly polluted waters with great variations in temperature, nutrients, pH, and levels of toxic substances and metals. The aquatic macrophytes occupied approximately 80% of the tank surface and were replaced after 7 days and collected after 15 days. To compare the results, plants maintained in water, without vinasse, served as control group.

The treatments (Fig. 1) were performed on a mesocosm-scale (surface area in the range of 0.5 to 5 m²) (Li et al., 2014). The tanks were kept in an airy, covered place, to avoid the volume of the residue being affected by rain. During the treatment period, the mean temperature was 23 °C, with 70% humidity and 100 mm of precipitation (INPE, 2016). The treatments were performed without filtrated air or temperature control, so as not to increase the cost of the system. There was no effluent renewal, indicating a static system. The hybrid treatment experiment was performed in triplicate.

A 2250 L sample of sugarcane vinasse (from sugarcane juice and molasses) used in the treatments was collected at an annexed sugarcane distillery located in the interior of the state of São Paulo, Brazil. The effluent was subjected to treatment immediately after collection.

2.2. Performance of hybrid treatment system

2.2.1. Physicochemical analysis of vinasse

The parameters relevant to the application of vinasse in soil as a fertilizer (pH, nitrate, nitrite, ammoniacal nitrogen, total nitrogen, sodium, calcium, potassium, sulfate, total phosphorus, and metals) were measured (Table 1). The physicochemical analysis of the effluent was carried out by a specialized environmental laboratory (ABNT, 2005) to obtain a precise determination of its composition. Samples were collected at the beginning of the experiment (raw vinasse), and at the beginning of each new treatment step, in addition to the final collection at the end of the treatment, after 163 days.

2.2.2. Collection and evaluation of aquatic macrophytes after treatment

The plant material was collected and cleaned by successive washes to remove the periphyton (the biofilm that acts as an interface between the substrate and the water), organic debris, and associated inorganic particles. Afterwards, the plants were oven dried at 60 °C until a constant weight was reached, and ground in a manual grinder to determine the chemical composition of the total biomass (dry mass; DM) (Henares and Camargo, 2014). The samples were stored in an appropriate place and the concentrations of nitrogen, potassium, calcium, copper, iron,

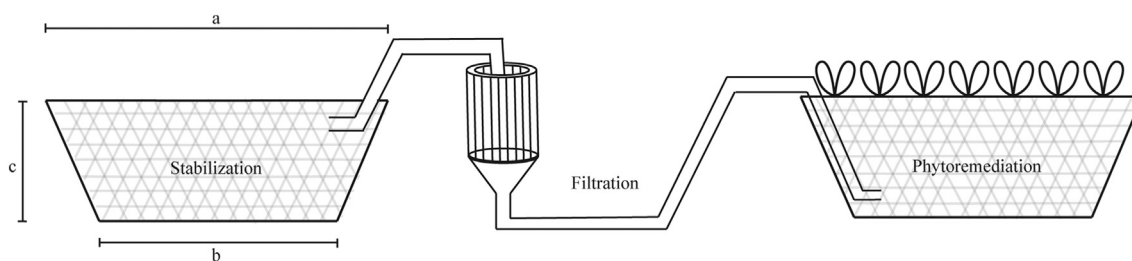


Fig. 1. Mesocosm-scale of the hybrid treatment systems. a: 1,35 m; b: 1,00 m; c: 0,73 m.

magnesium, manganese, phosphorus, zinc, mineral matter (ash), and organic matter were evaluated. The analysis to determine total nitrogen (TN % DM) by the Kjeldahl method and total phosphorus (TP % DM) followed the protocol by Allen et al., 1974. Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, and Zn concentrations were determined at the Center for Environmental Studies (CEA/UNESP) by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (iCAP, 6000 Series ICP Spectrometer, Thermo Scientific, Germany) after acid digestion (Berghof, SW-4, Germany). The method used in the digestion process was adapted to avoid the use of hydrogen peroxide, H_2O_2 , to obtain better detection limits. Digestions were performed using 0.4 g of dry sample, with the addition of 8 mL of 100% (v/v) HNO_3 .

Phytochemical tests were performed. The determination of the total phenol content present in the samples of ethanolic extract of the species studied was done by spectroscopy in the visible region using the Folin-Ciocalteu method with modifications (Bonoli et al., 2004). The total polyphenol content was determined by interpolating the absorbance of the samples against a calibration curve constructed with gallic acid standards (20 to 180 $\mu\text{g/mL}$) and expressed as mg GAE (gallic acid equivalents) per gram of extract. All analyses were performed in triplicate.

Phenolic compounds can be categorised into simple phenols, phenolic acids (derived from benzoic and cinnamic acids), coumarins, flavonoids, stilbenes, condensed and hydrolysable tannins, lignans, and lignins (Naczek and Shahidi, 2004).

2.2.3. Statistical analysis to evaluate the efficiency of the treatment

Shapiro Wilk's and Levene's tests were employed to assess the normality and homogeneity of the data, respectively (OECD, 2006; Marôco, 2014), in order to choose suitable tests to analyse variance and perform multiple comparisons in hypothesis tests.

One-way analysis of variance (ANOVA) was used as a parametric alternative, and the Tukey HSD test was performed for multiple comparisons between different groups. The Kruskal-Wallis test was used as a

non-parametric alternative, with Dunn's test for comparisons. The significance level used in the hypothesis tests was $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Characterization of raw vinasse

Table 1 presents detailed data for the analysed parameters of raw vinasse. The residue had an acidic pH, high concentrations of organic matter, as evidenced by high BOD and COD, and high concentrations of phosphorus, calcium, sulfate and suspended solids. According to Jardim and Canela (2004), if $\text{COD/BOD} < 2.5$, the effluent is easily biodegradable. The low COD/BOD index (1.49) indicated that vinasse had a high biodegradable fraction, proving that the biological treatment was correctly applied.

3.2. Characterization of vinasse after each step of the hybrid treatment system

After the stabilization step, analyses of the decanted and filtered vinasse were carried out.

During the stabilization period, the breakdown of organic matter produces gases that drag the suspended solids, generating a "film" on the surface (Noyola, 1993). Owing to the formation of a natural film, the oxygen input did not occur, resulting in an anaerobic process. In the first phase of anaerobic process, the organic matter was converted into other forms (simpler molecules followed by acids); in the second phase, the BOD decreased because the organic matter was converted to methane and carbon dioxide (von Sperling and Chernicharo, 2005). In the stabilization step, an increase in pH, and in nitrate, nitrite, total nitrogen, sodium, and potassium concentrations were recorded, while the values for total phosphorus, ammoniacal nitrogen, calcium, sulfate, total suspended solids, BOD, and COD decreased. These changes in composition occurred owing to decomposition of the organic matter present in

Table 1

Mean $\pm$ standard deviation values of the parameters resulting from the characterization of the vinasse throughout the treatment.

Parameters	Raw vinasse	Stabilization	Filtration	Phytoremediation 7 days	Phytoremediation 15 days	P value
Total phosphorus ¹	32.69 ^a	24.26 $\pm$ 5.18 ^b	18.49 $\pm$ 1.60 ^{bc}	17.70 $\pm$ 2.94 ^{bc}	13.94 $\pm$ 1.23 ^c	$p = 0.0001^{\#}$
Nitrate (NO ₃) ¹	1.94	3.06 $\pm$ 1.07	2.73 $\pm$ 0.57	3.22 $\pm$ 0.50	3.19 $\pm$ 1.69	$p = 0.4841^{\#}$
Nitrite (NO ₂) ¹	0.19 ^{ac}	0.35 $\pm$ 0.02 ^b	0.38 $\pm$ 0.15 ^{ab}	0.35 $\pm$ 0.07 ^{abc}	0.16 $\pm$ 0.07 ^c	$p = 0.0480^*$
Ammoniacal nitrogen ¹	0.87	0.27 $\pm$ 0.11	0.22 $\pm$ 0.03	0.17 $\pm$ 0.04	0.47 $\pm$ 0.41	$p = 0.1170^*$
Total nitrogen ¹	27.80 ^{ad}	49.50 $\pm$ 1.99 ^b	40.43 $\pm$ 6.07 ^{abc}	29.07 $\pm$ 9.28 ^{acd}	21.87 $\pm$ 3.49 ^d	$p = 0.0200^*$
pH	4.70 ^a	7.65 $\pm$ 0.18 ^{abc}	7.87 $\pm$ 0.19 ^{bc}	7.66 $\pm$ 0.05 ^{abc}	7.99 $\pm$ 0.28 ^c	$p = 0.0450^*$
Total suspended solids ¹	880 ^a	389 $\pm$ 204.60 ^{abc}	131 $\pm$ 58.50 ^{bc}	274.67 $\pm$ 20.03 ^{abc}	218.67 $\pm$ 89.63 ^c	$p = 0.0410^*$
Calcium ¹	687 ^a	390 $\pm$ 44.24 ^{ab}	350.33 $\pm$ 16.92 ^{ac}	253.33 $\pm$ 1.15 ^{bc}	226 $\pm$ 20.42 ^c	$p = 0.0110^*$
Potassium ¹	898 ^a	1084.33 $\pm$ 19.73 ^{bcd}	1075.67 $\pm$ 13.43 ^{bd}	956.67 $\pm$ 49.34 ^{acd}	1069 $\pm$ 79.57 ^d	$p = 0.0330^*$
Sodium ¹	32.60 ^{ac}	41.63 $\pm$ 2.00 ^{bde}	42.57 $\pm$ 1.69 ^{bd}	23.39 $\pm$ 19.40 ^{de}	41.77 $\pm$ 1.20 ^e	$p = 0.0310^*$
Sulfate ¹	323 ^a	24.97 $\pm$ 0.06 ^b	24.99 $\pm$ 15 ^b	26.31 $\pm$ 15.97 ^b	<10.00 ^b	$p = 0.0000^{\#}$
BOD ¹	8846 ^a	1466.67 $\pm$ 705.47 ^{abc}	1403 $\pm$ 343.20 ^{abc}	961.33 $\pm$ 276.44 ^{bc}	675 $\pm$ 138.87 ^c	$p = 0.0220^*$
COD ¹	13252 ^a	3828 $\pm$ 623.29 ^{abc}	3322.67 $\pm$ 302.01 ^{abc}	2827 $\pm$ 301.69 ^{bc}	3077.67 $\pm$ 248.57 ^c	$p = 0.0250^*$
COD/BOD	1.49 ^a	2.85 $\pm$ 0.79 ^a	2.43 $\pm$ 0.41 ^a	3.04 $\pm$ 0.55 ^a	4.78 $\pm$ 0.79 ^b	$p = 0.0007^{\#}$

Means followed by different letters in a line indicate statistically significant differences between groups.

¹ Values in mg/L.

* Kruskal-Wallis followed by Dunn $p < 0.05$.

[#] ANOVA followed by Tukey HSD $p < 0.05$.

vinasse. The parameters that underwent statistically significant changes were total phosphorus, nitrite, total nitrogen, potassium, and sulfate, as shown in Table 1.

In the filtration step, values increased for nitrite, nitrate, total nitrogen, sodium, potassium, and pH, compared with raw vinasse. There were reductions in total phosphorus, ammoniacal nitrogen, total suspended solids, calcium, sulfate, BOD, and COD values (Table 1). Compared with raw vinasse, statistically significant changes were found in the following parameters: total phosphorus, pH, total suspended solids, potassium, sodium, and sulfate.

After 7 days of phytoremediation, increases were observed in nitrate, nitrite, total nitrogen, potassium, and pH, relative to raw vinasse. The values for total phosphorus, ammoniacal nitrogen, total suspended solids, calcium, sodium, sulfate, BOD, and COD decreased (Table 1). After this first stage of phytoremediation, statistically significant changes were observed in total phosphorus, calcium, sulfate, BOD, and COD when the treated sample was compared with the raw sample.

After 15 days of phytoremediation, that is, at the end of the proposed treatment, vinasse showed increases in nitrate, nitrite, sodium, and potassium levels, and in pH. The other parameters presented lower values compared with the raw sample. Vinasse at the end of the proposed treatment had undergone statistically significant changes compared with the raw sample for nine parameters (total phosphorus, pH, total suspended solids, calcium, potassium, sodium, sulfate, BOD and COD).

The COD/BOD ratio varied as the residue passed through the different stages of the treatment. A statistically significant increase occurred after the end of the treatment, compared with the raw vinasse (Table 1). The increase in this ratio throughout the treatment occurred owing to reduction of the biodegradable part, while the inert part remained relatively unchanged.

3.3. Characterization of aquatic macrophytes used in phytoremediation

The results of the analyses of total nitrogen, potassium, mineral matter, organic matter, calcium, phosphorus, copper, magnesium iron, manganese, zinc, and total polyphenols are presented in Table 2.

The results showed independent behaviour of the stems and roots analysed.

Potassium showed reductions in the two periods of phytoremediation in the stems, compared with the control stem. Changes in nitrogen levels indicated that this element was more effectively assimilated in the stems and roots of the groups subjected to vinasse after 15 days of phytoremediation, whereas the variation after 7 days of phytoremediation was lower. The amount of organic matter remained stable in the stem during the two phases of phytoremediation (7 and 15 days), while in the root the organic matter increased more in

the first stage of phytoremediation than in the second stage. The percentage of mineral matter remained stable in the stem, while that in the root showed reductions in both phases of phytoremediation, with this reduction being greater during the first stage.

While the amount of phosphorus in the stem decreased during both periods of phytoremediation, the amount in the roots increased, indicating its assimilation in both stages of phytoremediation.

Iron decreased both in the roots and in the stem, with a greater decrease being recorded in the first stage. Magnesium was absorbed in the stem during at both phytoremediation stages. The roots showed a variation where the magnesium absorption was higher in the first stage of phytoremediation. Manganese was only assimilated in the second stage of phytoremediation, whereas during the first stage it underwent a small reduction in its amount. Calcium, copper, and zinc were assimilated more in the roots than in the stem, in both stages of phytoremediation.

Total polyphenols decreased both in the roots and in the stem compared with the control. This decrease was more pronounced during the first stage of phytoremediation. Preliminary phytochemical tests were also performed. The samples were processed and tested for the presence of flavonoids, tannins, saponins, alkaloids, and total polyphenols. The flavonoid test showed positive results for all samples. The tannin test was positive for all stem samples and negative for all root samples. Tests for saponins and alkaloids were negative for all samples.

4. Discussion

The use of raw vinasse in the fertirrigation of sugarcane has been studied for years, with the results indicating the adverse effects of its use on the environment. Centurión et al. (1989) observed that high vinasse rates in soil led to undesirable effects, for example, sugar cane quality impairment in sugar production, groundwater pollution, and soil salinization.

In the first phase of the treatment, stabilization ponds are used; these are large tanks of shallow depth in which water is treated through natural processes. The principal organisms acting in the ponds are algae and bacteria, the former by providing oxygen via photosynthesis and the latter degrading organic matter (Bidoia et al., 2016). As vinasse is a dark-coloured liquid, the lower part of the residue receives little light; thus, anaerobic reactions are more prevalent in this system.

The plants used in CWS absorb nutrients with their roots (Brix, 1994). The macrophytes used in the treatment of vinasse showed this characteristic of greater absorption of nutrients by the root. While the values of organic matter of the stem remained stable, the values for the roots varied between the two stages of phytoremediation. A greater increase in organic matter in the roots occurred in the initial 7-day

Table 2

Results of the analyzes of the water hyacinth used in phytoremediation.

	Stem			Root		
	Control	7 days of phytoremediation	15 days of phytoremediation	Control	7 days of phytoremediation	15 days of phytoremediation
Potassium*	0.042	0.021	0.025	0.040	0.035	0.050
Nitrogen*	0.587	0.636	0.860	0.635	0.675	0.771
Organic matter*	87.855	87.124	87.516	70.017	85.837	76.109
Mineral matter*	12.145	12.876	12.484	29.983	14.163	23.891
Calcium ¹	2.320	3.120	4.530	0.650	3.880	4.740
Phosphorus ¹	0.280	0.190	0.220	0.140	0.290	0.390
Copper ²	0.970	1.240	2.390	1.840	3.780	7.070
Iron ¹	0.530	0.170	0.280	6.010	1.330	2.790
Magnesium ²	0.800	1.360	1.430	0.280	1.220	0.930
Manganese ²	0.200	0.160	0.240	0.170	0.140	0.190
Zinc ²	3.090	5.150	13.120	6.190	28.740	37.840
Total polyphenols ³	75.640	12.040	34.840	17.640	1.840	8.240

* Values given in percentage.

¹ Values in mg g⁻¹.

² Values in µg g⁻¹.

³ mg EAG.

stage, possibly owing to the BOD decrease, compared with the latter stage. According to Jianbo et al. (2008), treatment of wastewater in the presence of water hyacinth for 25 days resulted in reductions in calcium, magnesium, and total hardness; these results were also observed in the present study. The plants analysed showed increases in the amounts of calcium and magnesium in both roots and stems, showing a possible absorption of these elements by plants.

Treatment to reduce BOD and COD is essential prior to disposal of this residue in soil. Although the values of BOD and COD decreased during the treatment in this study, there was a significant decrease only after the phytoremediation periods; thus, we conclude that these steps are important for the treatment.

Nitrogen is a constituent of proteins and other biological compounds, and is released during the breakdown of organic matter present in wastewater. This information corroborates the data observed for the treated vinasse, where the values of BOD and COD decreased after the first stage of the system, and the total nitrogen concentration increased during stabilization of the residue.

In the aquatic environment, nitrogen can be found in various forms: (a) molecular nitrogen, (b) dissolved and suspended nitrogen, (c) ammonia, (d) nitrite, and (e) nitrate (von Sperling, 1996). Hence, the nitrification that occurs during the treatment is responsible for reducing the toxicity of nitrogen compounds in water, through the transformation of ammonia into nitrates by aerobic bacteria. Nitrates are less toxic and when released into the soil, can be absorbed and metabolized by plants (Macarthy et al., 2007). The analyses of vinasse during the treatment showed variations in these different forms of nitrogen, caused by the nitrification process.

Determination of the predominant form of nitrogen can provide information on the stage of pollution. For instance, high concentrations of nitrogen in the organic or ammonia form are indicative of recent pollution, while nitrogen in the form of nitrate characterizes a more remote pollution (von Sperling, 1996). Vinasse submitted to treatment presented variation in the amount of ammoniacal nitrogen, but the final value was reduced by almost half. The nitrate concentration increased during the treatment process, characteristic of the nitrification process.

Considering that the suspended solids are currently removed by evaporation process, the use of filters is a viable alternative (Arora et al., 2011). Although the stabilization step reduced the suspended solids, a statistically significant change was observed only after filtration (85% decrease), thus demonstrating the efficiency of the use of membranes to retain suspended solids (Hoarau et al., 2018). Thus, it is inferred that suspended solids remaining in the vinasse are smaller than the porosity of the filter used.

According to Wu et al. (2016), many studies have shown increased development of the root system of water hyacinth following absorption of nitrogen from wastewaters. The amount of nitrogen present in roots and stems increased, and the total nitrogen value of the samples decreased. As with nitrogen, phosphorus is one of the main nutrients that can potentially affect the growth and storage of nutrients from water (Reddy et al., 1990). The use of biological treatments to remove phosphorus is well founded, and occurs through a combination of microbial growth, precipitation, and adsorption, depending on the process and operating conditions (Yeoman et al., 1988). Therefore, vinasse after treatment by the CWS method showed reduction of total phosphorus by >50%, demonstrating the efficiency of the treatment. In the different phases of phytoremediation, a decrease in the phosphorus concentration was observed in the treated vinasse, together with an increase in the phosphorus concentration in the roots of the water hyacinth in both stages of phytoremediation.

Biomining and bioadsorption are alternative mechanisms for the removal of inorganic contaminants from aqueous environments. These processes include the use of microorganisms, which play important roles in the natural biogeochemical cycles (Lloyd and Lovley, 2001). Microorganisms stimulate CaCO_3 precipitation in natural environments, such as oceans, lakes, and saline soils, in a process referred

to as microbial carbonate precipitation (MCP). The accepted mechanism of MCP is the increase in pH and dissolved inorganic carbon in a given environment caused by normal physiological activities (Castanier et al., 1999).

With the application of vinasse to soil, an increase in the concentration of salts and potential risk of salinization can be expected over the years. Regarding nitrate, one of the major problems cited in the literature is groundwater contamination. Several studies have shown that when waste is disposed in areas where the vegetation is removed after harvesting, nitrate values increase, but leaching may be negligible when it is released following the appropriate soil application rules, away from areas of springs or regions with superficial water table (Mariangela and Montemurro, 2010).

Raw vinasse used as fertilizer may have consequences for soil composition, owing to its acidic character. The pH indicates the conditioning and the availability of nutrients in the soil, since it depends on the balance of the diverse chemical species present, mainly in terms of solubility. Therefore, metals in general have reduced availability with increasing pH, as they precipitate in the form of hydroxides and carbonates. On the other hand, elements such as nitrogen, phosphorus, potassium, and calcium have increased availability with increasing pH. Therefore, a neutral medium can maximize the availability of nutrients in the soil. There may be an increase in pH and decomposition rates of organic matter, with a consequent change in the cycling of nutrients such as carbon and nitrogen, reducing the availability of organic carbon and total nitrogen through nitrification and denitrification (Mota and von Sperling, 2009), factors that were observed in the case of treated vinasse.

The effectiveness of CWS for wastewater treatment is mainly determined by its performance in the treatment of organic carbon, nitrogen, phosphorus, and suspended solids (Kadlec and Wallace, 2009). The treatment proposed was also effective in reducing copper and zinc in vinasse. These two elements were present in increased amounts in the stems and roots analysed, indicating possible uptake by these macrophytes. Following these authors, the pilot system reached the purpose.

Calcium and sodium, depending on their concentrations, can be harmful to the soil. According to Mota and von Sperling (2009), high concentrations of sodium in irrigation, accompanied by a low concentration of calcium, lead to a high sodium adsorption ratio, which can result in the dispersion of clay and soil pore obstruction, thus reducing the rate of infiltration of water with consequent effects on plants.

Concentrations of some nutrients may occasionally remain the same or may increase with effluent, as in the case of potassium. This can be explained by evaporation and evapotranspiration, which concentrate the solution; this effect is more noticeable when there is competitive inhibition of some nutrients owing to unbalanced concentrations, hindering their consumption (Mota and von Sperling, 2009).

Potassium in wastewater is usually found in mineral form, which makes it available for absorption by plants (Mengel et al., 2001). Thus, the potassium concentration in the effluent, the volume applied and the soil reactions determine the amount of potassium available to meet crop demands. The use of wastewater with a high concentration of potassium needs to have specific suitability for each crop; this can be achieved by evaluating factors such as potassium uptake and changes in the yield of the plants (Arienzo et al., 2009).

Although the literature describes the absorption of potassium by water as an essential nutrient for growth, along with nitrogen and phosphorus (Reddy et al., 1990), this phenomenon was not observed during vinasse phytoremediation. Instead, there was a change in concentration of potassium over time, in the stem the concentration after both phytoremediation period decreased when compared with control, and the concentration in the root decreased in the first period of phytoremediation and increased in the second.

All polyphenols have the ability to reduce the concentration of reactive oxygen species, whose imbalance causes oxidative stress (Rice-Evans et al., 1996). Flavonoids have been suggested as constituents of

a secondary antioxidant system, activated after the reduction of stress-induced primary antioxidants (Fini et al., 2011). The amount of polyphenols found in the control group was higher than in the groups after 7 and 15 days of phytoremediation, suggesting that these metabolites were not produced in plants exposed to vinasse. Thus, it is inferred that the plants exposed to vinasse suffered no oxidative stress.

In the treatment of residues, the BOD is an important parameter to control in order to ensure the efficiency of stations, for both aerobic and anaerobic biological as well as physicochemical treatments. São Paulo state law, State Decree 8468, sets a five-day BOD as the standard for the emission of waste directly into water bodies, requiring a maximum BOD of 60 mg/L or a minimum overall efficiency of the process treatment equal to 80%. This latter criterion favours concentrated industrial effluents, which can be released with still high BOD values, even with removal above 80% (CETESB, 2009).

5. Conclusion

With respect to the possibility of making vinasse in soil available by the fertirrigation method, thus allowing the reduction of costs in fertilization, the treatment method used here was efficient. Although the stabilization step was the most effective, the reduction of the biodegradable portion of vinasse occurred owing to phytoremediation, showing that combination of treatments is a suitable alternative. Based on analysis of the values of the parameters tested, it can be concluded that the residue underwent a significant modification in its composition, but retained the nitrogen and potassium content necessary for its use as a fertilizer. The results also suggest that this treatment method could be applied to different residues resulting from alcoholic fermentation.

Acknowledgements

This research was supported by FAPESP (São Paulo Research Foundation) (Processes n° 2012/50197-2 and 2014/23919-2). The authors would like to thank Santo Pascoal Marcato, Agda Benedita de Castro Marcato, and José Mario de Castro Marcato for support during the experiment, and Jorge Luis Gallego Zapata for statistical support.

References

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 2005. NBR ISO/IEC 17025: 2005 - Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração, second ed. São Paulo.
- Allen, S.E., Grimshaw, H.M., Parkinson, J.A., Quarmby, C., 1974. Chemical Analysis of Ecological Materials. first ed. Blackwell, Oxford.
- Arienzo, M., Christen, E.W., Quayle, W., Kumar, A., 2009. A review of the fate of potassium in the soil-plant system after land application of wastewaters. *J. Hazard. Mater.* 164, 415–422.
- Arora, A., Seth, A., Dien, B.S., Belyea, R.L., Singh, V., Tumbleson, M.E., Rausch, K.D., 2011. Microfiltration of thin stillage: process simulation and economic analyses. *Biomass Bioenergy* 35, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.08.024>.
- Bidoia, E.D., Correia, J.E., Prachnou, E.L.S., Azevedo, G.O., Shimizu, F.L., 2016. Tratamentos de águas de abastecimento e residuais, first ed. Clube de Autores Publicações S/A, Joinville.
- Bonoli, M., Verardo, V., Marconi, E., Caboni, M.F., 2004. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5195–5200.
- Botelho, R.G., Tornisiello, V.L., Olinda, R.A., Marinho, L.A., Machado-Neto, L., 2012. Acute toxicity of sugarcane vinasse to aquatic organisms before and after pH adjustment. *Toxicol. Environ. Chem.* 94, 1–11.
- Brix, H., 1994. Functions of macrophytes in constructed Wetlands. *Water Sci. Technol.* 29, 71–78.
- Castanier, S., Le Metayer-Level, G., Perthuisot, J.P., 1999. Cacarbonates precipitation and limestone genesis—the micro-biogeologist point of view. *Sediment. Geol.* 126, 9–23.
- Centurión, R.E.B., Moraes, V.A., Percebon, C.M., Ruiz, R.T., 1989. Destinação final da vinhaça produzida por destilarias autônomas e anexas, enquadradas no programa nacional do álcool. XI Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Anais do XI Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Fortaleza, Ceará.
- Chowdhary, P., Raj, A., Bharagava, R.N., 2018. Environmental pollution and health hazards from distillery wastewater and treatment approaches to combat the environmental threats: a review. *Chemosphere* 194, 229–246. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.163>.
- Christoforetti, C.A., Escher, J.P., Correia, J.E., Marinho, J.F.U., Fontanetti, C.S., 2013. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. *Waste Manag.* 33, 2752–2761.
- Colletti, M.P.B., 2008. Sistemas construídos de áreas alagadas: levantamento bibliográfico sobre eficiência de redução das variáveis químicas e físicas da água. Monografia (Especialista em Sustentabilidade Ambiental), Centro de Estudos Ambientais, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), 2009. Variáveis de qualidade de água. São Paulo. <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp#transparencia> (accessed on 12 July 2018).
- Corazza, R.L., 1996. 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. Tese de Doutorado Departamento de política científica e tecnológica. Instituto de Geociências, da Unicamp, Campinas-SP.
- Fini, A., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Tattini, M., 2011. Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. *Plant Signal. Behav.* 6, 709–711.
- Freire, W.J., Cortez, L.A., 2000. Vinhaça de cana-de-açúcar. ESALQ, Piracicaba.
- Fuess, L.T., Garcia, M.L., 2014. Anaerobic digestion of stillage to produce bioenergy in the sugarcane-to-ethanol industry. *Environ. Technol. (United Kingdom)* 35, 333–339.
- Henares, M.N.P., Camargo, A.F.M., 2014. Estimating nitrogen and phosphorus saturation point for *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms and *Salvinia molesta* Mitchell in mesocosms used to treating aquaculture effluent. *Acta Limnol. Bras.* 26, 420–428.
- Hoarau, J., Caro, Y., Grondin, I., Petit, T., 2018. Sugarcane vinasse processing: toward a status shift from waste to valuable resource. A review. *J. Water Process Eng.* 24, 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.05.003>.
- INPE (National Institute for Space Research), 2016. <http://clima1.ptec.inpe.br/monitoramentobrasil/pt>, Accessed date: 22 November 2018.
- Jardim, W.F., Canela, M.C., 2004. Fundamentos da oxidação química no tratamento de efluentes e remediação de solos. *Cad. Temático.* 1 pp. 1–10.
- Jianbo, L.U., Zhihui, F.U., Zhaozheng, Y.I.N., 2008. Performance of a water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) system in the treatment of wastewater from a duck farm and the effects of using water hyacinth as duck feed. *J. Environ. Sci.* 20, 513–519.
- Kadlec, R., Wallace, S., 2009. *Treatment Wetlands*. second ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kumar, S., Viswanathan, L., 1991. Production of biomass, carbon dioxide, volatile acids, and their interrelationship with decrease in chemical oxygen demand, during distillery waste treatment by bacterial strains. *Enzym. Microb. Technol.* 13, 179–187.
- Laime, E.M.O., Fernandes, P.D., Oliveira, D.C.S., Freire, E.A., 2011. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. *R. Trop. Ci. Agr. Biol.* 5, 16–29.
- Li, Y., Zhu, G., Ng, W.J., Tan, S.K., 2014. A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: design, performance and mechanism. *Sci. Total Environ.* 468–469, 908–932. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.018>.
- Lloyd, J.R., Lovley, D.R., 2001. Microbial detoxification of metals and radionuclides. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 248–253.
- Macarthy, V.F., Leite, C.C., Oliveira, B., 2007. Ciclo do Nitrogênio. *Disciplina de Química Ambiental II*, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS.
- Mariangela, D., Montemurro, F., 2010. Long-term effects of organic amendments on soil fertility. *A review. Agron. Sustain. Dev.* 30, 401–422.
- Marôco, J., 2014. Análise Estatística com o SPSS Statistics, sixth ed. Report Number, Perô Pinheiro.
- Mengel, K., Kirkby, E.A., Kosegarten, H., Appel, T., 2001. *Principles of Plant Nutrition*. fifth ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Moraes, B.S., Zaiat, M., Bonomi, A., 2015. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: challenges and perspectives. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 44, 888–903.
- Mota, F.S.B., von Sperling, M., 2009. Nutrientes de Esgoto Sanitário: Utilização e remoção, ed. ABES, Rio de Janeiro.
- Mulidzi, A.R., 2010. Winery and distillery wastewater treatment by constructed wetland with shorter retention time. *Water Sci. Technol.* 61, 2611–2615. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.206>.
- Naczki, M., Shahidi, F., 2004. Extractions and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A* 1054, 95–111.
- Noyola, A., 1993. Reactor UASB, diseño y operacion. I Curso Internacional sobre Tratamiento de Efluentes por Digestion Anaerobia. Universidad Católica de Valparaíso. Escuela de Ingeniería Bioquímica. 38 pp. 41–42.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2006. Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. 33. OECD Publishing, Paris, France, pp. 1–147.
- Reddy, K.R., Agami, M., Tucker, J.C., 1990. Influence of phosphorus on growth and nutrient storage by water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) plants. *Aquat. Bot.* 37, 355–365.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Papanga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 933–956.
- Rodrigues Reis, C.E., Hu, B., 2017. Vinasse from sugarcane ethanol production: better treatment or better utilization? *Front. Energ. Res.* 5, 1–7. <https://doi.org/10.3389/feng.2017.00007>.
- Santana, V.S., Machado, N.R.C.F., 2008. Photocatalytic degradation of the vinasse under solar radiation. *Catal. Today* 133, 606–610.
- Silva, M.A.S., Griebeler, N.P., Borges, L.C., 2007. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. *Ver. Bras. Eng. Agríc. Ambient.* 11 pp. 108–114.
- Tilley, D.R., Badrinathan, H., Rosati, R., Son, J., 2002. Constructed wetland as recirculation filters in large-scale shrimp aquaculture. *Aquac. Eng.* 26, 81–109.

- von Sperling, M., 1996. *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*. v1 - Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos, second ed. Belo Horizonte: DESA – UFMG, Belo Horizonte.
- von Sperling, M., 2005. *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*. v.1 Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos, third ed. DESA-UFMG, Minas Gerais, Belo Horizonte.
- von Sperling, M., Chernicharo, C.A.L., 2005. *Biological Wastewater Treatment in Warm Climate Regions*. first ed. IWA Publ, London.
- Wu, W., Liu, A., Wu, K., Zhao, L., Bai, X., Li, K.-Z., Ashraf, M.A., Chen, L., 2016. The physiological and biochemical mechanism of nitrate- nitrogen removal by water hyacinth from agriculture eutrophic wastewater. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 59, 1–10.
- Yeoman, S., Stephenson, T., Lester, J.N., Perry, R., 1988. The removal of phosphorus during wastewater treatment: a review. *Environ. Pollut.* 49, 183–233.

Biorremediação de efluente oriundo da indústria sucroalcooeira: avaliação da diminuição da toxicidade por meio de histopatologia de brânquias de peixe

Ana Claudia de Castro Marcato¹, Cleiton Pereira de Souza¹, Jorge Evangelista Correia¹, Carmem Silvia Fontanetti¹

¹UNESP (Universidade Estadual Paulista), Instituto de Biociências, Rio Claro

*autor correspondente: Tel.: +55 16 33441731

e-mail: marcatoacc@gmail.com

RESUMO

A vinhaça é um resíduo originário da fermentação alcoólica e tem sido amplamente utilizada como fertilizante nas culturas de cana-de-açúcar no Brasil. Apesar dos estudos comprovando sua toxicidade para animais e solo, seu uso como fertilizante nas lavouras tem se intensificado fazendo com que tratamentos alternativos sejam propostos, uma vez que, este resíduo pode alterar tanto a estrutura do solo quanto atingir os corpos d'água por infiltração ou escoamento. Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de um sistema híbrido de tratamento aplicado para diminuição do potencial tóxico da vinhaça, utilizando a histopatologia de brânquias de tilápias como biomarcador. Os resultados permitem inferir que a vinhaça após o tratamento apresentou resultados satisfatórios em relação à diminuição de sua toxicidade, uma vez que os animais não apresentaram alterações significativas quando expostos à vinhaça biorremediada.

Palavras-chave: fitorremediação, vinhaça, tilápia, células mucosas

1. INTRODUÇÃO

A vinhaça, popularmente conhecida por restilo, vinhoto ou garapão, é um dos principais resíduos da transformação da cana-de-açúcar em etanol. Apenas no Brasil, um dos maiores produtores de cana-de-açúcar, foram produzidos, na safra de 2017/2018, 27,76 bilhões de litros de álcool (CONAB, 2018), gerando um total aproximado de 245 bilhões de litros de vinhaça. O poder poluente deste efluente, cerca de cem vezes maior que o do esgoto doméstico, decorre da sua riqueza em matéria orgânica, baixo pH, elevado poder de corrosão e altos índices de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). Assim, a vinhaça é considerada altamente nociva à fauna, flora, microfauna e microflora das águas doces, além de afugentar a fauna marinha (SILVA et al., 2007). Por outro lado, devido as suas concentrações de macro e micro-nutrientes (MOHANA et al., 2009; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011), principalmente potássio, a vinhaça é empregada diretamente no campos agrícolas por meio de fertirrigação (FUESS et al., 2017).

A vinhaça, hoje, é em grande parte aproveitada para irrigar e fertilizar lavouras de cana-de-açúcar. O que antes era problema ambiental passou a ser componente fundamental do sistema de custos de produção das indústrias sucroalcooleiras. Porém, essa utilização também merece atenção quanto a possíveis problemas de degradação e contaminação do solo e da água (FERREIRA, 2009; CORREIA et al., 2017b). Ao atingir o solo contendo vinhaça, a água pluvial pode infiltrar ou escoar superficialmente, poluindo os corpos d'água. A vinhaça promove modificações nas propriedades físicas do solo, podendo tanto elevar a capacidade de infiltração da terra, contaminando as águas subterrâneas, como reduzi-la, promovendo a elevação do escoamento, com possível contaminação de águas superficiais (SILVA et al., 2007) e eutrofização dos corpos d'água devido a quantidade elevada de nutrientes (FUESS; GARCIA, 2014).

Os efeitos tóxicos da vinhaça foram descritos por diferentes autores. Estudos verificaram que a vinhaça *in natura* altera o ciclo reprodutivo e de vida de drosófilas (*Drosophila melanogaster*) (YESILADA, 1999), altera a produção de muco, proteínas e ácido láctico em diferentes órgãos de peixes da espécie *Channa punctatus* (KUMAR; GOPAL, 2001) e é tóxico para milípedes (CHRISTOFOLETTI et al., 2016). Os efeitos genotóxicos e mutagênicos de diluições de vinhaça de cana-de-açúcar em peixes foram demonstrados por Correia et al. (2017a). A toxicidade desta mesma substância também foi comprovada por meio da histopatologia de

brânquias de tilápias (CORREIA et al., 2017b).

Devido os efeitos tóxicos da vinhaça, muitas tecnologias vêm surgindo com o objetivo de reutilizar ou tratar a vinhaça para a redução de sua toxicidade (MOHANA et al., 2009). A vinhaça pode ser tratada tanto por processos físico-químicos como biológicos, que podem reduzir a toxicidade pela degradação de componentes orgânicos; os processos físico-químicos normalmente envolvem reagentes para oxidar compostos orgânicos, enquanto que os tratamentos biológicos são classificados como técnicas aeróbicas ou anaeróbicas (BOTELHO et al., 2012).

Monteiro et al. (2011) avaliaram a redução da toxicidade da vinhaça após tratamento pelo fungo *Pleurotus sajor-caju* em organismos aquáticos e Correia et al. (2017a) também verificaram a diminuição do potencial genotóxico da vinhaça após correção do pH utilizando CaO.

Os sistemas construídos de áreas alagadas (CWSs) são sistemas biogeoquímicos altamente eficazes para tratar águas residuais provenientes de diferentes fontes, bem como setores domésticos, industriais e de mineração (VYMAZAL et al., 1998; KADLEC et al., 2000) e podem ser integrados à outros tratamentos como a estabilização (MARCATO et al., 2019). A vinhaça utilizada neste estudo passou por um sistema híbrido de tratamento, visando a redução da toxicidade sem adição de componentes químicos. A vinhaça foi tratada pelos métodos de estabilização, filtração e fitorremediação. As lagoas de estabilização reduzem a toxicidade dos resíduos por meio do processo de degradação natural da matéria orgânica, sem interferência nas características físicas do efluente (von SPELLING; CHERNICHARO, 2005). A filtragem se fez necessária devido à alta concentração de sólidos suspensos presentes na vinhaça (HOURAU et al., 2018). A fitorremediação usando macrófitas aquáticas possibilita a existência de bactérias (aeróbicas, anaeróbicas e facultativas), fundamentais para o processo de remoção de nutrientes da água (SHUTES, 2001).

Neste sentido, considerando a importância da água para a vida e a relevância da contaminação dos recursos hídricos pela vinhaça de cana-de-açúcar, que pode chegar ao ambiente aquático por despejo indiscriminado em campo, lixiviação e/ou percolação, a realização deste estudo teve como objetivo verificar a eficiência de um sistema de tratamentos integrados aplicado para diminuição do potencial tóxico da vinhaça, utilizando a histopatologia de brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilápia) como biomarcador.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material Biológico

Foram utilizados espécimes juvenis de *O. niloticus* provenientes de piscicultura. Os animais foram aclimatados em tanques com sistema de filtração e aeração adequada, por no mínimo 15 dias e 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.

Para a montagem dos bioensaios este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa no Uso Animal da UNESP – Rio Claro, SP (CEUA – IB – UNESP – CRC) e obteve aprovação com o protocolo nº 2488 de 18 de Junho de 2015.

2.2. Vinhaça Biorremediada

Foram utilizadas amostras de vinhaça de cana-de-açúcar submetidas a um sistema híbrido de tratamento composto por três etapas: a) estabilização; b) filtração; c) fitorremediação por macrófitas aquáticas. Todo o sistema utilizado está detalhadamente descrito em Marcato et al. (2019).

2.3. Bioensaio para avaliação da toxicidade da vinhaça

O bioensaio foi realizado em três aquários com capacidade de 40L cada, dos quais um continha água limpa de poço artesiano, sem a adição de nenhum composto que foi utilizada como grupo controle. Os outros dois aquários continham a água e a vinhaça biorremediada em diluições de 1% e 5%. Estas diluições foram baseadas em estudos prévios realizados com a vinhaça *in natura* (MARINHO et al., 2014; CORREIA et al., 2017a). Em todos os aquários foram colocados aleatoriamente cinco animais, que permaneceram expostos por 96 horas, em local com temperatura controlada, para que então fossem eutanasiados e suas brânquias coletadas para análise. O bioensaio foi realizado em triplicata, as quais foram chamadas B1, B2 e B3.

2.4. Análise físico-química da água controle e diluições do bioensaio

Foram realizadas análises físico-químicas da água, usada como controle, e das duas diluições da vinhaça biorremediada utilizadas para a montagem dos bioensaios. A análise foi realizada por laboratório especializado, para determinação mais precisa de sua composição. Dados referentes ao pH, DBO, DQO, sólidos suspensos totais, condutividade elétrica, nitrito, nitrato, turbidez e dos metais Ag, Al, As, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Hg, Na, Ni, Pb e Zn foram obtidos

utilizando a metodologia USEPA - Environmental Protection Authority (2005).

2.5. Dissecção dos animais

Após exposição, os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,1g de benzocaína em 1 mL de álcool etílico para cada 100 mL de água deionizada) e eutanaziados com espinhalamento e dissecados em solução fisiológica. O segundo arco branquial de cada peixe foi retirado e fixado em solução Bouin (15 mL de solução aquosa saturada de ácido pícrico, 5 mL de formaldeído e 1 mL ácido acético) e em fixador Karnovsky (KARNOVSKY, 1965).

2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para análise da superfície das brânquias, o material foi desidratado em uma série de concentrações crescentes de acetona (50, 75, 90, 95, 100%), levado ao ponto crítico e colado em suporte metálico. Foi então analisado ao microscópio eletrônico de varredura de baixo vácuo HITACHI TM3000 e fotografado.

2.7. Histologia e histoquímica

Os materiais coletados foram desidratados em série alcoólica por 20 minutos cada concentração (15, 25, 50, 70, 80, 90, 95 e 100%), colocados em resina de embebição por no mínimo 24 horas e, finalmente, incluído 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.

Depois de secas, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina, para avaliação da morfologia, e submetidas a técnica do PAS (periodic acid-Schiff), para avaliação das células mucosas.

2.8. Análise dos resultados

As análises seguiram o protocolo proposto por Bernet et al. (1999) e adaptado por Marinho et al. (2014). De acordo com Correia et al. (2017), foram atribuídos valores chamados de fator de importância (w) para as lesões encontradas, definidos de acordo com sua importância patológica. As anomalias histopatológicas observadas também foram classificadas em escores (a) dependendo do grau e da extensão da alteração. Ao multiplicar o fator de importância pelo

escore, obteve-se o índice da alteração ($\text{Índice}_{\text{total}} = \sum (w \times a)_{\text{ind}}$). Foram analisadas duas lâminas com oito cortes de 6 μm para cada peixe, sendo $n = 15$ para cada triplicada do bioensaio, totalizando 45 animais. Desta forma, foi analisado um total de 90 lâminas e 720 cortes histológicos por técnica histológica realizada.

Os dados da histologia apresentaram distribuição não normal, no entanto, no teste de Levene as variâncias foram homogêneas com base na mediana, desta forma seguiu-se com a aplicação do teste Anova (MARÔCO, 2014).

As células mucosas foram avaliadas segundo o protocolo de Biagini et al. (2009), no qual três cortes histológicos, com três lamelas principais íntegras, de cada indivíduo, foram selecionadas para a contagem das células mucosas. Dessas lamelas principais foram contadas as células mucosas de 30 regiões interlamelares de todos os indivíduos de todos os bioensaios. As células mucosas apresentaram distribuição normal dos dados, seguiu-se então, com o teste Anova.

Para todas as análises o teste post-hoc utilizado para comparar os grupos tratados com o controle foi o Dunnett com significância de 5% ($p < 0,05$), para histologia e nível de 1% ($p < 0,01$) para células mucosas.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização das águas dos bioensaios

A água utilizada para a montagem dos bioensaios foi de poço artesiano. Foram coletadas amostras dos bioensaios controle e das duas diferentes diluições da vinhaça biorremediada. A caracterização dos parâmetros analisados está apresentada na Tabela 1.

Parâmetros como DBO e DQO foram os que mais sofreram alteração com a adição da vinhaça biorremediada na água. Observou-se diminuição da concentração do nitrato nas amostras que continham vinhaça em relação ao controle e ligeiro aumento da concentração de nitrito. A turbidez, condutividade elétrica e sólidos suspensos aumentaram de acordo com o aumento da proporção de vinhaça biorremediada na água. O pH, o ferro, o cobre e o zinco pouco se alteraram. O sódio sofreu variação entre as diluições.

3.2. Análise da superfície branquial

A análise ultramorfológica das brânquias dos indivíduos submetidos à todas as diluições da

vinhaça biorremediada e do grupo controle apresentaram presença de muco recobrindo as lamelas primárias e secundárias (Fig. 1A, B e C).

Os animais dos grupos controles apresentaram células pavimentosas com variação na ausência e presença das cristas centrais em algumas regiões das lamelas (Fig. 1D). Foi observado muco recobrindo grande parte das lamelas; também foi observada renovação epitelial em alguns animais.

Os indivíduos submetidos à todas as diluições da vinhaça biorremediada revelou o mesmo padrão das cristas das células pavimentosas do grupo controle. Os animais submetidos a 1% de vinhaça biorremediada (Fig. 1E) apresentaram também presença de muco, porém com menor quantidade que o controle. Os animais submetidos a 5% de vinhaça biorremediada (Fig. 1F) apresentaram uma quantidade de muco inferior quando comparada aos grupos controle e expostos a 1%.

3.3. Histopatologia das brânquias

A análise histológica das brânquias dos grupos controles analisados (Fig. 2A, B) apresentaram o padrão branquial descrito por Fanta et al. (2002) para peixes teleósteos. Os arcos branquiais são formados por filamentos primários (lamelas primárias), tendo cada filamento primário lamelas respiratórias (lamelas secundárias) alinhadas ao longo de seus dois lados. Os filamentos primários são cobertos por epitélio pavimentoso estratificado. As lamelas secundárias possuem espaços de sangue limitados por células pilares, separada do epitélio por uma grossa membrana basal. Hemácias elípticas e nucleadas são vistas dentro do espaço do sangue nas lamelas secundárias. Todos os animais submetidos às diferentes diluições da vinhaça biorremediada apresentaram pontualmente alterações como desorganização do epitélio lamelar ($w=1$) (Figs. 2C, D) e desprendimento epitelial ($w=1$); estas alterações também foram pontualmente encontradas nos animais dos grupos controles, não permitindo a relação das alterações com a substância ao qual foram submetidos (tabela 2). As análises estatísticas não foram significativas.

3.4. Análise das células mucosas das brânquias

Com a análise das células mucosas evidenciadas pelo PAS pode-se verificar que o número dessas células diminuiu nos grupos expostos à vinhaça, quando comparadas ao número observado

no controle (tabela 2), sendo essa redução maior nos animais da exposição à 5%. Este resultado corrobora a análise ultramorfológica realizada nas brânquias, uma vez que, foi observada uma redução da quantidade de muco nos animais expostos à vinhaça biorremediada. Os resultados estatísticos foram significativos quando comparado o grupo controle com os grupos expostos. Este resultado pode ser melhor visualizado na figura 3.

4. DISCUSSÃO

A brânquia é um órgão que possibilita a comunicação do ambiente externo com o interno, já que é responsável pela trocas de gás e íons, sendo assim um dos principais órgãos atingidos pelos poluentes. Diversos poluentes podem causar variações nos órgãos e tecidos, sendo assim, as análises histopatológicas podem sinalizar a presença de poluentes tóxicos nos ambientes aquáticos (FONTANETTI et al., 2012)

Os animais expostos à vinhaça biorremediada apresentaram pouca ou nenhuma alteração demonstrando a baixa toxicidade deste resíduo no ambiente aquático. No estudo realizado por Correia et al. (2017a), foi observado que brânquias de animais submetidos à vinhaça *in natura*, nas diluições de 1 e 5%, apresentavam alterações como desprendimento epitelial, desorganização do epitélio lamelar, hemorragia e hipertrofia das células pavimentosas da lamela, atestando assim a toxicidade deste resíduo.

As alterações encontradas em alguns animais submetidos aos bioensaios (desorganização do epitélio lamelar e desprendimento epitelial) são alterações na estrutura e arquitetura do órgão. Estes tipos de alterações têm caráter regressivo, uma vez que culmina na diminuição da função do órgão. Porém, as alterações estruturais do epitélio, tal qual a desorganização do epitélio lamelar e desprendimento epitelial, são alterações de fácil recuperação, sendo considerada de importância mínima ao organismo (BERNET et al., 1999; CORREIA et al., 2017a).

A célula mucosa é uma característica proeminente do epitélio branquial. A importância biológica da interface rica em muco entre o peixe e seu ambiente aquoso abrange funções tão diversas como a íon regulação, proteção mecânica e imunológica (GENTEN et al., 2008).

O muco, secretado pelas células mucosas, na superfície das brânquias, foi considerado uma importante proteção contra lesões abrasivas por materiais sólidos suspensos em água, bactérias patogênicas, parasitas (DESZFULI et al., 2003), exposição ao ar (CHANDRA; BANERJEE, 2004; BANERJEE, 2007) e poluentes (MARCATO et al., 2014; CORREIA et al., 2017a). Além

disso, o muco pode desempenhar um papel na regulação iônica (HANDY et al., 1989; ROBERTS; POWELL, 2003; POWEL, 2007). As células mucosas presentes no epitélio do filamento branquial e o muco produzido podem ser um mecanismo de adaptação a diferentes condições do meio aquático. As mudanças na densidade das células mucosas das brânquias (PAUL; BANERJEE, 1997) foram consideradas como uma resposta às mudanças na concentração de íons na água, como o sódio, cálcio e cloreto (PERRY; WOOD, 1985; LAURENT; HEBIBI, 1989) e xenobióticos (WENDELAAR BONGA et al., 1989). Foi demonstrada também, a ausência de muco nas brânquias de trutas arco-íris não submetidas a estresse (HANDY; EDDY, 1991).

Com a redução no número de células mucosas e da secreção mucosa observada nos animais deste estudo pode-se inferir que ou a barreira de proteção contra a substância adicionada na água não foi necessária, uma vez que, o número das células mucosas é alterado conforme a necessidade fisiológica do peixe em reação ao meio externo; ou houve um feedback negativo do organismo. Porém, segundo Correia et al. (2017a), a vinhaça *in natura* aumenta o número de células mucosas nos animais expostos as diluições às quais foram expostos.

Sendo assim, observou-se que a presença da vinhaça biorremediada no ambiente aquático não causa alterações em nível celular que prejudique o funcionamento do órgão estudado e, conseqüentemente, do animal, sugerindo, desta forma, que a vinhaça biorremediada não é uma ameaça ao meio ambiente aquático. Estes resultados atestam a eficácia do sistema de tratamento proposto para a diminuição da toxicidade deste resíduo, largamente utilizado nas lavouras.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP (Processos nº 2012/50197-2 e 2014/23919-2) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANERJEE, T. K. Histopathology of respiratory organs of certain air-breathing fishes of India. **Fish Physiology Biochemistry**, n. 33, p. 441-454. 2007.
- 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**, v. 40, p. 839-844, 2009.
- BOTELHO, R.G.; TORNISIELO, V.L.; de OLINDA, R.A.; MARANHO, L.A.; MACHADO-NETO, L. Acute toxicity of sugarcane vinasse to aquatic organisms before and after pH adjustment. **Toxicological and Environmental Chemistry**, p. 1-11. 2012.
- CHANDRA, S.; BANERJEE, T. K. Histopathological analysis of the respiratory organs of *Channa striata* subjected to air exposure. **Veterinarski Arhiv**, n. 74, p. 37-52. 2004.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento de safra brasileira: Cana-de-açúcar, primeiro levantamento.** 2016. <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_14_09_06_31_boletim_cana_portugues_-_4o_leve_-_15-16.pdf> Acesso em: 18 abril. 2016
- CORREIA, J. E.; CHRISTOFOLETTI, C.A.; MARCATO, A.C.C.; MARINHO, J.F.U.; FONTANETTI, C.S. Histopathological analysis of tilapia gills (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) exposed to sugarcane vinasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, p. 319–326. 2017a.
- CORREIA, J.E.; MARCATO, A.C.C.; CHRISTOFOLETTI, C.A.; SOTO, M.A.; FONTANETTI, C.S. **Toxicidade e genotoxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar em peixes em bioensaios laboratoriais.** in: Fontanetti, C.S.; Bueno, O.C. (Org). Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica. Bauru, SP: Canal 6, 251-266, 2017b.
- CHRISTOFOLETTI, C. A.; FRANCISCO, A. ; PEDRO-ESCHER, J. ; GASTALDI, V. D. ; FONTANETTI, C. S. . Diplopods as Soil Bioindicators of Toxicity After Application of Residues From Sewage Treatment Plants and Ethanol Industry. **Microscopy and Microanalysis** (Print), n. 22, p. 1098-1110. 2016.
- DEZFULI, B. S.; GIARI, L.; KONECNY, R.; JAEGER, P.; MANERA, M.

Immunohistochemistry, ultrastructure and pathology of gills of *Abramis brama* from Lake Mondsee, Austria, infected with *Ergasilus sieboldi* (Copepoda). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 53, p. 257-262. 2003.

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

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

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

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

FUESS, L. T.; RODRIGUES, I. J.; GARCIA, M. L. Fertirrigation with sugarcane vinasse: Foreseeing potential impacts on soil and water resources through vinasse characterization **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 52, n. 11, p. 1063–1072. 2017.

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

HANDY, R. D.; EDDY, F. B.;ROMAIN, G. In vitro evidence for the ionoregulatory role of rainbow trout mucus in acid, acid/aluminum and zinc toxicity. **Journal of Fish Biology**, v. 35, p. 737-747. 1989.

HANDY, R.D.; EDDY, F.B. The absence of mucus on the secondary lamellae of unstressed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Biology**, v. 38, p.153-155. 1991.

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

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

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

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

LAURENT, P.; HEBIBI, N. Gill morphometry and fish osmoregulation. **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, p. 3055-3063. 1989.

MARCATO, A. C. C.; YABUKI, A. T.; FONTANETTI, C. S. Nickel exposure promotes osmoregulatory disturbances in *Oreochromis niloticus* gills: histopathological and energy dispersive spectrometry analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 13095 – 13102. 2014.

MARCATO, A. C. D. C.; SOUZA, C. P. D.; PAIVA, A. B. D.; EISMANN, C. E.; NAVARRO, F. F.; CAMARGO, A. F. M.; MENEGÁRIO, A. A.; FONTANETTI, C. S. Hybrid treatment system for remediation of sugarcane vinasse. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 659, 2019.

MARÔCO, J. **Análise Estatística com o SPSS Statistics**. ReportNumber, p. 990. 2014.

MARINHO, J.F.U.; CORREIA, J.E.; MARCATO, A.C.C.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C.S. Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 110C, p. 239–245. 2014.

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

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

PAUL, I.; BANERJEE, T. K. Histopathological changes induced by ambient ammonia (ammonium sulphate) on the opercular linings of the catfish *Heteropneustes fossilis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, n. 28, p. 151-161. 1997.

PERRY, S. F.; WOOD, C. M. Kinetics of brachial calcium uptake in the rainbow trout: effects of acclimation to various external calcium levels. **Journal of Experimental Biology**, n. 116, p. 411-433. 1985.

POWEL, M. D. **Respiration in infectious and non-infectious gill diseases**. Pp. 317-339. In: Fernandes, M. N., M. L. Glass, F. T. Rantin & B. G. Kapoor. (Eds.). *Fish Respiration and Environment*. Enfield, Science Publisher, 392p, 2007.

ROBERTS, S. D.; POWELL, M. D. Comparative ionic flux and gill mucous cell histochemistry: effects of salinity and disease status in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Comparative**

Biochemistry and Physiology A, v. 134, n. 3, p. 525-537. 2003.

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

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

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

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

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

WENDELAAR-BONGA, S. E.; VAN DER MEIJ, C. J. M. Degeneration and death, by apoptosis and necrosis the pavement and cells the gills of the teleost *Oreochromis mossambicus*. **Cell and Tissue Research**, n. 255, p. 235-243. 1989.

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

Tabela 1. Valores dos parâmetros analisados na água e diluições dos bioensaios.

Parâmetros/ Amostras	Controle (Água)	Diluição de 1% de vinhaça biorremediada	Diluição de 5% de vinhaça biorremediada
DBO¹	2,7	3,5	11,8
DQO²	<15,0	< 15,0	65
Nitrato¹	2,293	1,618	1,817
Nitrito¹	0,0252	0,0314	0,0325
pH	7,49	7,47	7,68
Cobre¹	< 0,005	< 0,005	0,007
Turbidez	1,8	1,90	3,30
Prata¹	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Alumínio¹	< 0,050	< 0,050	< 0,050
Arsênio¹	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Cádmio¹	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Cobalto¹	< 0,003	< 0,003	< 0,003
Cromo¹	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Ferro¹	< 0,050	< 0,050	0.178
Mercúrio¹	< 0,0002	< 0,0002	< 0,0002
Sódio¹	93,4	94,6	89,7
Níquel¹	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Chumbo¹	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Zinco¹	0,009	0,009	0,017
Condutividade eletrolítica³	604	641	816
Sólidos suspensos totais¹	352	396	534

¹ valores em mg/L² valores em mgO₂/L³valores em µS/cm

Tabela 2. Valores das médias e desvios padrão das alterações e quantidade de células mucosas encontradas nas brânquias de *O. niloticus* do grupo controle e expostos às diferentes diluições de vinhaça biorremediada

	Desprendimento epitelial	Desorganização epitelial	Células mucosas
Controle	0,40 ± 0,828	0,26 ± 0,703	21,85 ± 7,780
Exposição 1%	0,13 ± 0,516	0,26 ± 0,703	17,62 ± 5,760
Exposição 5%	0,26 ± 1,032	0,53 ± 1,187	12,84 ± 4,005

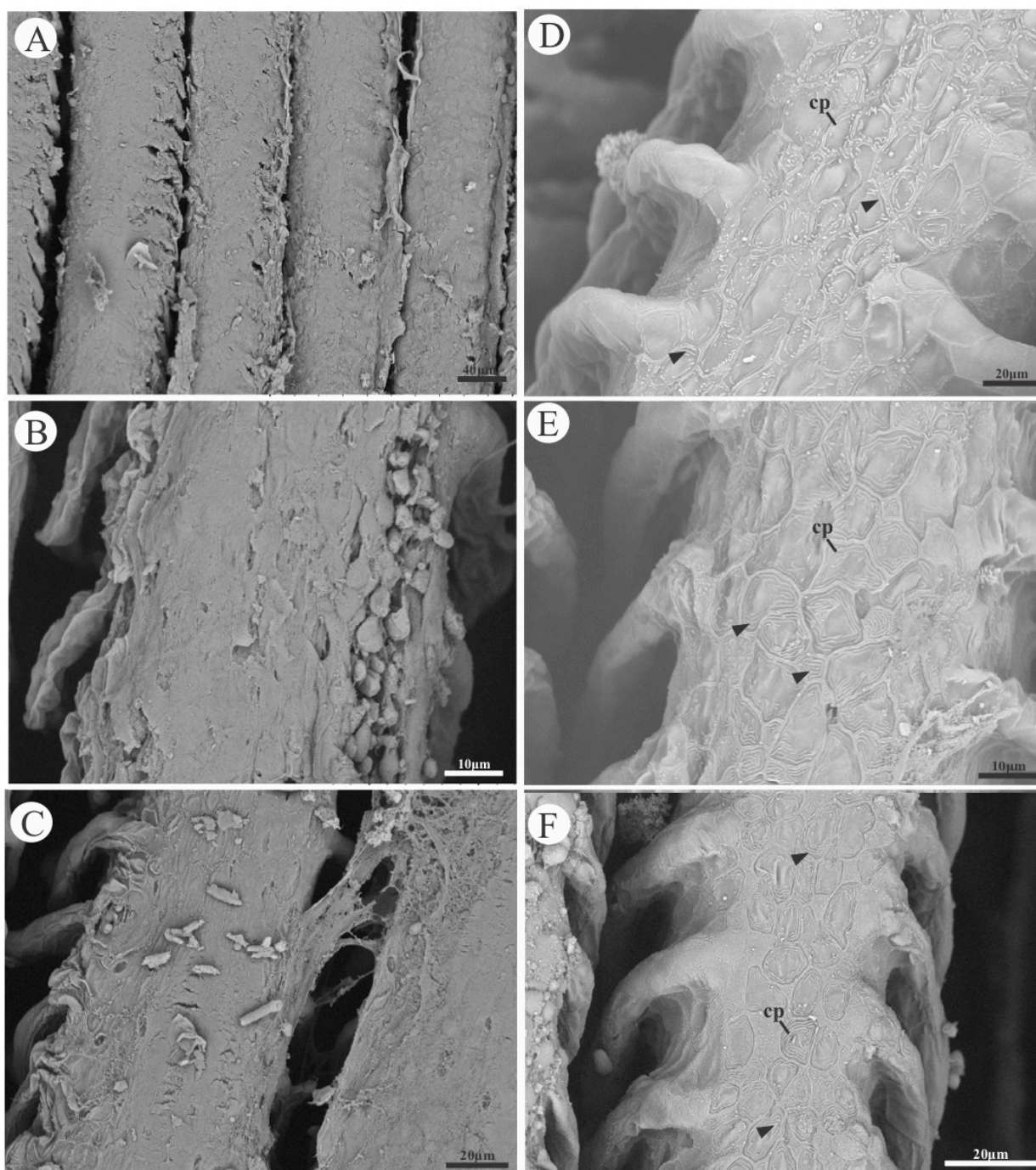


Figura 1. Micrografias eletrônicas de varredura de brânquia de *O. niloticus*. A e D: Grupo controle; B e E: Grupo exposto à diluição de 1% de vinhaça biorremediada. C e F: Grupo exposto à diluição de 5% de vinhaça biorremediada. A, B e C : lamelas primárias e secundárias recobertas por muco; cp: célula pavimentosa; cabeças de setas: cristas das células pavimentosas.

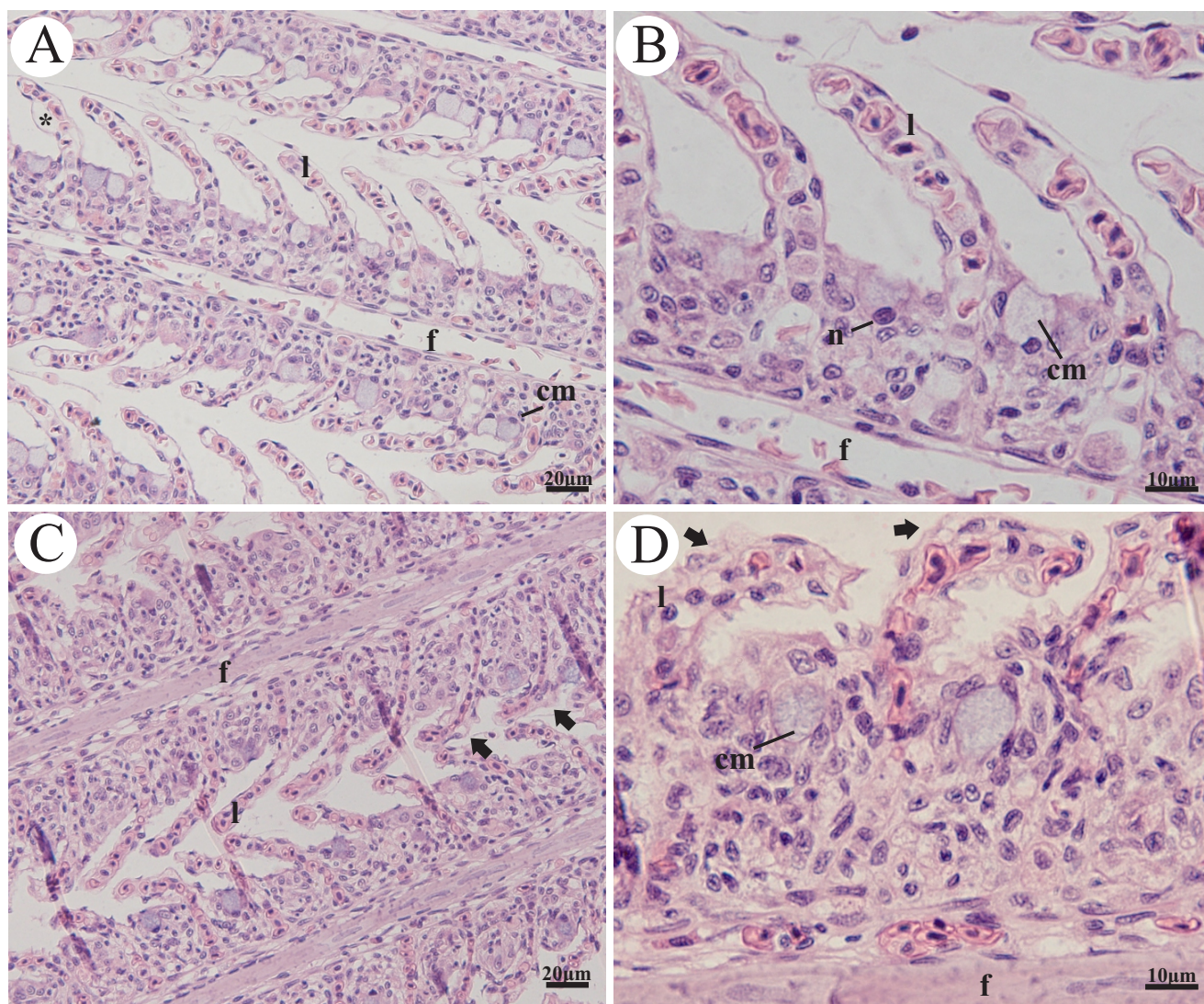


Figura 2. Secções histológicas de brânquias de *O. niloticus* submetidas a coloração de Hematoxilina-Eosina. A e B: Grupo controle. C e D: Grupo exposto às diluições de vinhaça biorremediada. f: filamento, l: lamela, cm: célula mucosa, n: núcleo, setas: desorganização epitelial lamelar.

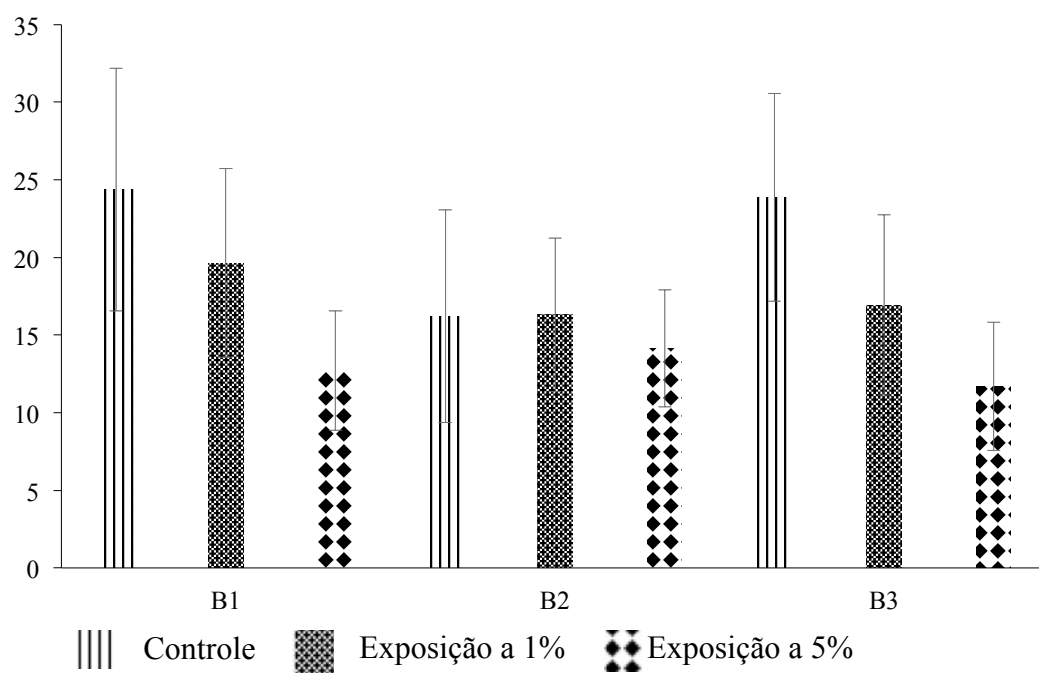


Figura 3: Porcentagem de células mucosas nos animais expostos à vinhaça biorremediada.

B1: bioensaio 1; B2: bioensaio 2; B3: bioensaio 3.

**Análise da toxicidade de vinhaça biorremediada por meio de diferentes análises em
fígado de *Oreochromis niloticus***

Ana Cláudia de Castro Marcato¹, Cleiton Pereira de Souza¹, Jorge Evangelista Correia¹,
Cristina Moreira de Sousa¹, Thays de Andrade Guedes¹, Caio Mateus da Silva¹, Karen
Cristiane Martinez de Moraes¹, Carmem Silvia Fontanetti¹

¹UNESP (Universidade Estadual Paulista), Instituto de Biociências, Rio Claro, São
Paulo, Brasil

*autor correspondente: Tel.: +55 16 33441731

e-mail: marcatoacc@gmail.com

RESUMO

Os peixes são largamente utilizados como modelos de estudo de poluição aquática por acumularem substâncias em seus órgãos. Por ser um órgão muito sensível, o fígado tem sido considerado um dos alvos mais precisos para avaliar os efeitos de substâncias xenobióticas. As respostas dos organismos podem se manifestar em diversos níveis, desde o nível molecular até o nível comportamental, passando por níveis celulares e fisiológicos. É sabido que a vinhaça de cana-de-açúcar, comumente utilizada na fertirrigação de lavouras, possui alto poder poluente. Através de diversas rotas, a vinhaça disponibilizada no solo pode atingir os corpos d'água. Devido ao potencial perigo causado por esta substância ao meio ambiente, métodos como o sistema híbrido de tratamento tem sido proposto. Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade da vinhaça biorremediada utilizando biomarcadores moleculares e celulares em fígado de tilápias expostas à diferentes diluições. Tanto os resultados das análises histopatológicas quanto as análises moleculares demonstraram redução na toxicidade da vinhaça após biorremediação quando comparados com os estudos encontrados na literatura, comprovando a eficácia do tratamento realizado.

Palavras-chave: histopatologia, HSP70, estresse oxidativo

1. INTRODUÇÃO

Os biomarcadores são alterações nas respostas biológicas, que podem ser evidenciadas desde o nível molecular, passando por respostas celulares e/ou fisiológicas até manifestações comportamentais, as quais podem ser correlacionadas à exposição ou efeitos tóxicos de xenobióticos dispersos no meio ambiente (PEAKALL; WALKER, 1994). Posto isto, biomarcadores bioquímicos, moleculares, de genotoxicidade e morfológicos têm sido empregados em peixes para avaliar o impacto de diferentes substâncias no meio aquático (ARANA et al., 2017).

A caracterização dos efeitos adversos das substâncias pode ser realizada histopatologicamente, investigando lesões, alterações ou formação de neoplasias nos tecidos dos peixes (VAN der OOST et al., 2003). O fígado é um órgão muito sensível aos contaminantes encontrados no meio ambiente, sendo um dos primeiros órgãos prejudicados pela toxicidade destas substâncias (ANSOAR-RODRIGUES et al., 2016), representando um dos modos mais precisos para avaliar os efeitos de compostos xenobióticos em campo e em estudos experimentais (FIGUEIREDO-FERNANDES et al., 2007).

Biomarcadores em níveis celulares e moleculares complementam o estudo histopatológico, apresentando mais informações sobre diferentes mecanismos de ação em organismos não alvos (ANSOAR-RODRIGUES et al., 2016). As proteínas de choque térmico (Heat Shock Protein - HSP) são ativadas como uma resposta primária de proteção em organismos contra qualquer alteração induzida por estresse ambiental (MILLER-MOREY; DOLAH, 2004), constituindo um excelente biomarcador (MOREIRA-DE-SOUSA et al., 2018).

Indicadores de estresse oxidativo estão cada vez mais sendo utilizados como biomarcadores para entender as consequências fisiológicas de como os animais são influenciados nos diferentes estágios de vida (BIRNIE-GAUVIN et al., 2017).

O estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e as defesas antioxidantes em organismos vivos (NISHIDA, 2011). O acúmulo de EROs e os danos do sistema antioxidante são fatores-chave para detectar os efeitos tóxicos nos organismos expostos aos poluentes.

O uso da vinhaça, um dos resíduos da indústria sucroalcooleira, como fertilizante, é vantajoso porque contém quantidades relevantes de elementos químicos, especialmente potássio e micronutrientes (zinco, ferro, manganês e cobre) e em níveis mais baixos, cálcio,

magnésio e nitrogênio, essenciais para as plantas. As aplicações da vinhaça podem fornecer a maioria dos nutrientes da fertilização mineral, com vários estudos relatando aumento da produtividade de cana-de-açúcar em resposta ao uso da vinhaça (RESENDE et al., 2006). Porém, essa utilização também merece atenção quanto a possíveis problemas de degradação e contaminação do solo e da água (FERREIRA, 2009; CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

A vinhaça é geralmente ácida (pH 3,5-5), com alto teor de matéria orgânica representada pela alta demanda química de oxigênio (DQO), de coloração castanho-escuro e odor desagradável (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011; HOARAU et al., 2018). O poder poluente deste líquido residual decorre da sua riqueza em matéria orgânica, baixo pH, elevado poder de corrosão e altos índices de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). Assim, a vinhaça é considerada altamente nociva à fauna e flora das águas doces, além de afugentar a fauna marinha que vem às costas brasileiras para procriação (SILVA et al., 2007).

A vinhaça, através de uma rota que abrange a área de fertirrigação como fonte e o movimento vertical de contaminantes pela lixiviação como mecanismo de transporte, pode atingir as águas subterrâneas. Ao atingir a água subterrânea, os componentes da vinhaça podem continuar seu percurso por transporte lateral, sendo possível atingir algum corpo d'água superficial (lagoas, rios) pela descarga do aquífero. A vinhaça também pode ser transportada desde a área de fertirrigação até as águas superficiais por outros fatores como: precipitação, características físicas e hidráulicas do solo, declividade do terreno e/ou manejo do solo que permitem o escoamento superficial (KIANG et al., 2017).

Devido os efeitos tóxicos da vinhaça, diversas tecnologias vêm surgindo com o objetivo de reutilizar ou tratar a vinhaça para a redução de sua toxicidade (RODRIGUES REIS; HU, 2017; CHOWDHARY et al., 2018; HOARAU et al., 2018). Em virtude disso, estudos que avaliem seus efeitos diretos nos organismos e que proponham possíveis tratamentos para esse efluente se fazem necessários, uma vez que, utilizada na fertirrigação da própria cultura da cana, pode influenciar as características físico-químicas do solo e chegar aos corpos hídricos por lixiviação/percolação (CHRISTOFOLETTI et al., 2017; MORINI et al., 2017).

Tendo em vista essa perspectiva, este estudo teve como objetivo verificar o potencial tóxico da vinhaça após ser submetida à um sistema híbrido de tratamento utilizando diferentes biomarcadores no fígado de tilápias expostas a diferentes diluições desta substância.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Biológico

Foram utilizados espécimes juvenis de *Oreochromis niloticus*. Indivíduos de 7–10 cm

de tamanho foram selecionados para evitar diferenças intraespecíficas. Os animais foram aclimatados em tanques com sistema de filtração e aeração adequado, por no mínimo 15 dias e 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.

Para a montagem dos bioensaios este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa no Uso Animal da UNESP – Rio Claro, SP (CEUA – IB – UNESP – CRC) e obteve aprovação com o protocolo nº 2488 de 18 de Junho de 2015.

2.2. Vinhaça biorremediada

Foram utilizadas amostras de vinhaça de cana-de-açúcar submetidas à um sistema híbrido de tratamento composto por três etapas: a) estabilização; b) filtração; c) fitorremediação por macrófitas aquáticas. Todo o sistema utilizado está detalhadamente descrito em Marcato et al. (2019).

2.3. Bioensaio para avaliação da toxicidade da vinhaça

O bioensaio foi realizado em três aquários com capacidade de 40L cada. O grupo controle foi constituído por aquários contendo água limpa de poço artesiano, sem a adição de nenhum composto. Os outros dois grupos continham a água e a vinhaça biorremediada em diluições de 1 e 5%. Estas diluições foram baseadas em estudos prévios realizados com a vinhaça *in natura* (MARINHO et al., 2014; CORREIA et al., 2017a, b). Em todos os aquários foram colocados aleatoriamente cinco espécimes que permaneceram expostos por 96 horas, em local com temperatura de 25°C. O experimento foi realizado em triplicata, os quais serão chamados de Bioensaios 1, 2 e 3.

2.4. Análise físico-química da água e diluições do bioensaio

Foram realizadas análises físico-químicas da água e das diluições em água da vinhaça biorremediada para a montagem dos bioensaios (tabela 1). A análise foi realizada por laboratório especializado, para determinação mais precisa de sua composição. Dados referentes ao pH, DBO, DQO, sólidos totais dissolvidos, condutividade elétrica, nitrito, nitrato, turbidez e dos metais Ag, Al, As, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Hg, Na, Ni, Pb e Zn foram obtidos utilizando a metodologia USEPA - Environmental Protection Authority (2005).

2.5. Coleta dos materiais

Após exposição, os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,1g de benzocaína em

1 mL de álcool etílico para cada 100 mL de água deionizada) e eutanaziados com espinhalamento por tesoura cirúrgica e dissecados em solução fisiológica. Para análise histológica e histoquímica, as amostras de fígado foram fixadas em solução Bouin e formol cálcio; permanecendo em fixador por aproximadamente 24 horas; em seguida, os materiais foram mergulhados em tampão fosfato de sódio pH=7,4 e mantido em geladeira. Para as análises moleculares e imunohistoquímicas, o órgão foi retirado, lavado em solução salina e congelado imediatamente a -80°C até serem processados para uso.

2.4. Histologia e histoquímica

Os materiais coletados foram desidratados em série alcoólica por 20 minutos cada concentração (15, 25, 50, 70, 80, 90, 95 e 100%), colocados em resina de embebição por no mínimo 24 horas e, finalmente, incluído 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.

Depois de secas, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina, para avaliação da morfologia, e submetidas a técnica do PAS (periodic acid-Schiff), de coloração por azul de bromofenol e de azul do Nilo.

2.5. Imunohistoquímica para detecção de HSP70

Para análise da presença da proteína HSP70, o fígado congelado à -80°C foi descongelado em paraformaldeído 4% tamponado, permanecendo no fixador por 24 horas. O material foi incluído em parafina, seguindo o padrão laboratorial, que consta com desidratação em soluções crescentes de álcool (70-100%), diafanização em xilol e imersão em parafina. Foi seguido o protocolo proposto por Silva-Zacarin et al. (2012) adaptado para tilápias por Ansoar-Rodríguez et al. (2016). Para marcação da HSP70 foram utilizados kits com anticorpos primários – monoclonal anti heat shock protein 70 (HSP70) e com anticorpos secundários – anti mouse IgG molécula inteira acoplado com fosfatase alcalina (Kit Dako). A análise dos resultados foi realizada utilizando o programa ImageJ.

2.6. Análises moleculares para detecção de estresse oxidativo

2.6.1. Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real (qPCR)

Para avaliar a expressão de genes correlacionados a mecanismos de estresse celular, foram realizadas análises de qPCR de cinco genes. Para isso, os tecidos congelados foram utilizados na extração do RNA mensageiro (RNAm) utilizando-se Trizol® Reagent

(Invitrogen) e seguindo as recomendações do fabricante. Aproximadamente 1 µg do RNAm de cada amostra foi utilizado em reações de transcrição reversa para preparo do DNA complementar (cDNA), seguindo as especificações do fabricante do High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). Reações de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas utilizando-se os reagentes do SYBR Green/Rox qPCR Master MIX (Life Technologies) e o ciclador Step One Plus – Applied Biosystems. Oligonucleotídeos específicos para verificar o produto transcricional dos genes catalase (CAT) (sense 5'ATGAGGAGGAGCGACAGAGA3'; antisense 5'AATTCTCGACCATGCGTTTC3'), glutathione peroxidase (GPEROX) (sense 5' AGAAATCCTCCTGTCGCTGA3'; antisense 5' GTCCTTCCCGTTCACTTCAA3'), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (sense 5' TGATAAGGACACCGATGTGG3'; antisense 5' CTCCAGCACCTGTAGAAG3'), superóxido dismutase (SOD1) (sense 5'AGGCGGCCACATTAACCACA3'; antisense 5' CATCTTCTGAAAGGAGCC3'), glutathione S-transferases M (GSTM) (sense 5' GGATGAAAAGGTTTCGAGTGG3'; antisense 5'ATTGGTGTAGCACAGCCTCA3') e proteína de choque térmico (HSP70) (sense 5' TTCAAGGTGATTTCAGACGGAG3'; antisense 5'CTTCATCTTCACCAGGACCATG3') foram desenhados com o auxílio do programa Gene Runner e utilizados nas reações de amplificação quantitativa. A análise dos resultados foi realizada utilizando-se o software apropriado do ciclador.

2.6.2. Determinação de Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Para a mensuração da peroxidação de lipídios foi utilizado o TBARS Assay Kit (Cayman Chemical), respeitando-se as orientações do fabricante. O reagente quantifica colorimetricamente a peroxidação lipídica e a formação de malondialdeído (MDA). Alternativamente, a mensuração de TBARS foi realizada pela incubação de homogenatos de tecidos com 8.1% SDS, 20% ácido acético, 0.8% de ácido tiobarbitúrico (TBA) – pH 3,4, n-butanol/piridina (14:1). A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm.

2.7. Análise estatística dos resultados morfológicos

As análises seguiram o protocolo proposto por Bernet et al. (1999) e adaptado por Marinho et al. (2014). Para as lesões encontradas foram atribuídos valores chamados de fator de importância (*w*), definido de acordo com sua importância patológica (tabela 2). As anomalias histopatológicas observadas também foram classificadas em escores (*a*) dependendo do grau e da extensão da alteração. Ao multiplicar o fator de importância pelo

escore, obteve-se o índice da alteração ($\text{Índice}_{\text{total}} = \sum (w \times a)_{\text{ind}}$). Foram analisadas duas lâminas com oito cortes de 6 μm para cada peixe, sendo $n = 15$ para cada triplicada do bioensaio, totalizando 45 animais. Desta forma, foram analisadas um total de 90 lâminas e 720 cortes histológicos por técnica histológica realizada.

Os dados não apresentaram distribuição normal, porém possuem variâncias homogêneas, desta forma foi aplicado um teste paramétrico para análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$) (MARÔCO, 2014).

3. RESULTADOS

3.1. Análise histológica

O padrão comumente observado no fígado de tilápias apresenta o parênquima hepático formado por células poliédricas, com núcleo esférico onde podem ser notados um ou mais nucléolos, citoplasma bem definido, intercalados por sinusóides com eritrócitos no seu interior. Tecido pancreático distribuídos no tecido hepático também são observados (AKIYOSHI; INOUE, 2004).

Os animais submetidos ao bioensaio de toxicidade da vinhaça biorremediada, tanto grupo controle (Fig. 1A,B) quanto os grupos submetidos às diferentes diluições (Fig. 1C-F), apresentaram arquitetura típica do tecido hepático de peixes teleósteos, com presença pontuais de degeneração hidrópica, perda de limite celular, núcleo picnótico e vacúolos citoplasmáticos. As alterações observadas nos animais analisados não foram estatisticamente significativas quando comparados os animais expostos à vinhaça com aos do controle (tabela 3).

3.2. Análise histoquímica

Os resultados para as análises de detecção de polissacarídeos, tanto neutros como ácidos, se apresentaram iguais. Os animais tanto do grupo controle (Fig. 2A) quanto dos grupos expostos às diluições de vinhaça biorremediada apresentaram granulação heterogênea no citoplasma, principalmente localizadas próximas ao tecido pancreático. Os animais dos grupos expostos às diluições de 1% (Fig. 2C) e 5% (Fig. 2E) de vinhaça biorremediada não apresentaram alterações quando comparados ao grupo controle.

As análises dos padrões histoquímicos para detecção de proteínas apresentaram no grupo controle, citoplasma pouco corado com sinusóides e tecido pancreático positivamente mais corados (Fig. 2B). Os animais dos grupos expostos às diluições de 1% (Fig. 2D) e 5% (Fig. 2F) de vinhaça biorremediada não apresentaram alterações quando comparados ao grupo

controle, mantendo assim o padrão fisiológico dos animais submetidos à esse bioensaio.

Não foi observada alteração na detecção de lipídios (dados não demonstrados).

3.3. Análise imunohistoquímica para detecção de HSP70

Verificou-se que o grupo controle apresentou imunocoloração da proteína HSP70, indicando que a proteína é tipicamente expressa neste órgão como chaperona. Nos grupos submetidos a vinhaça, a imunomarcação de HSP70 foi ligeiramente maior nos animais expostos à 1% de vinhaça biorremediada e se manteve semelhante ao controle nos animais expostos à 5% da diluição (Fig. 3). As alterações observadas nos animais do grupo controle e expostos as diluições de vinhaça biorremediada não foram estatisticamente significativas.

3.4. Análises moleculares para detecção de estresse oxidativo no fígado

A GPEROX analisada nos animais apresentaram redução na sua expressão nos grupos expostos à vinhaça quando comparado ao grupo controle, sendo a redução maior nos animais do grupo exposto a 1% quando comparados ao animais do grupo exposto a 5% (Fig. 4A).

Quando comparada ao grupo controle, a CAT expressa nos animais expostos às duas diluições da vinhaça diminui de forma semelhante (Fig. 4B).

O gene *sod1* teve aumento na expressão relativa do RNAm quando comparados os grupos tratamentos com o grupo controle. O aumento foi diluição-dependente, sendo maior no grupo exposto à diluição de 5% de vinhaça biorremediada (Fig. 4C).

A análise de NADPH nos animais apresentou redução da expressão nos grupos expostos quando comparado ao grupo controle. O NADPH expresso nos animais expostos à 1% sofreu uma redução, e quando comparado aos animais expostos a 5%, foi observada uma redução ainda maior na expressão desse gene (Fig. 4D).

A expressão gênica do gene *gstm* nos grupos expostos à vinhaça biorremediada apresentou diminuição em relação ao controle, tendo o grupo exposto a 5% diminuído em relação ao controle e ao grupo exposto a 1% (Fig. 4E).

O gene *hsp70* apresentou aumento no grupo exposto à diluição de 5% de vinhaça biorremediada. O grupo exposto à 1% não apresentou variação na expressão desse gene quando comparado ao grupo controle (Fig. 4F).

Nenhuma alteração nas expressões dos genes foi estatisticamente significativa.

Os resultados das análises da quantidade na produção de MDA nos animais após a exposição às diluições da vinhaça biorremediada não apresentaram alterações significativas em relação ao grupo controle (Fig. 5).

4. DISCUSSÃO

Os hepatócitos, constituintes do tecido hepático, podem ser considerados o primeiro alvo interno atingido pela toxicidade de uma substância, o que caracteriza o fígado como um excelente órgão para análise da poluição ambiental (ZELIKOFF, 1993). Marinho et al. (2014) observaram que após exposição a vinhaça *in natura*, o fígado das tilápias apresentaram alterações como perda da integridade citoplasmática e do limite celular, desorganização do tecido, núcleo picnótico, citoplasma vacuolizado e degeneração hidrópica. Os autores observaram ainda que os padrões de detecção histoquímica apresentaram alterações na quantidade de polissacarídeos, tendo sido observado aumento nos animais expostos a vinhaça *in natura*.

Em outro estudo, assim como a vinhaça *in natura*, o percolado da vinhaça, após passagem por colunas de solo, manteve sua toxicidade, pois as alterações citadas anteriormente também foram observadas nos animais após exposição (COELHO et al., 2018). Os animais expostos a vinhaça biorremediada não sofreram injúrias no tecido hepático quando comparados aos animais expostos à vinhaça *in natura* (MARINHO et al., 2014) e após percolação (COELHO et al., 2018), sendo então, menos prejudicial aos animais do ambiente aquático. Apesar das amostras de vinhaça dos estudos serem diferentes, elas apresentam características físico-químicas semelhantes.

Para complementar as análises histopatológicas, foram realizadas análises moleculares. Os organismos vivos produzem de forma controlada moléculas em formas oxidadas e reduzidas, sendo estas responsáveis por participar na sinalização de diversas vias metabólicas (SUN; OBERLEY, 1996). Os sistemas de defesa que tendem a inibir a formação de oxirradicais incluem as enzimas antioxidante, como SOD, CAT e GPEROX. Os genes cat, gperox e sod são criticamente importantes na desintoxicação de radicais para moléculas não-reativas.

A CAT é uma enzima antioxidante chave na defesa do corpo contra o estresse oxidativo. Esta enzima converte as espécies reativas de oxigênio, peróxido de hidrogênio, em água e oxigênio e, assim, mitiga os efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio (STEGEMAN et al., 1992; FILHO, 1996).

A proteína GPEROX catalisa a redução de hidroperóxidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e, assim, protege as células contra danos oxidativos. Outros estudos indicam que o H₂O₂ também é essencial para a transdução do sinal mediada pelo fator de crescimento, a função mitocondrial e a manutenção do equilíbrio redox; portanto, ao limitar a

acumulação de H_2O_2 , as peroxidases de glutathione também estão envolvidas na modulação desses processos. A CAT está localizada em peroxissomos, enquanto a GPEROX é uma enzima citosólica, portanto, a localização intracelular dessas enzimas catabolizantes de hidrogênio pode ser responsável por diferentes respostas delas ao estresse oxidativo (BAGNYUKOVA et al., 2007).

Estudos utilizando *O. niloticus* expostos à diferentes substâncias apresentaram aumento da atividade dos genes cat e gperox quando expostos à diferentes tipos de toxicantes, como metais e herbicidas (BASHA; RANI, 2003; ATLI et al., 2006; PEIXOTO et al., 2006), sendo assim, com a diminuição da expressão relativa dos genes cat e gperox, infere-se que o sistema de defesa não foi ativado para inibir a formação de oxiradicais nos animais expostos à vinhaça biorremediada.

A proteína codificada pelo gene sod1 é capaz de capturar moléculas como superóxidos gerados pelo processo de desintoxicação de EROs. A isoenzima SOD1 é uma proteína citoplasmática, que atua como um homodímero convertendo radicais de superóxido em moléculas menos agressivas (O'LEARY et al., 2016). Os níveis de expressão gênica observadas nos ensaios realizados indicam um aumento da expressão desse gene pela ativação desse mecanismo celular responsivo a moléculas de superóxidos.

Em relação ao gene nadph, o mesmo é responsável por codificar um membro da família de enzimas NADPH oxidase responsável pela transferência catalítica de um elétron de oxigênio para gerar superóxido ou peróxido de hidrogênio (O'LEARY et al., 2016). Segundo os resultados analisados dos animais expostos à vinhaça biorremediada, esta substância não estimulou a formação de superóxido ou peróxido de hidrogênio.

Levando em consideração que a vinhaça biorremediada não estimulou a produção de superóxidos (resultado observado pela análise de NADPH), pode-se inferir que a expressão do gene sod1 está atuando nos combate de radicais de superóxido livres pré-existente nos animais.

Duas famílias de supergenes distintas codificam as formas citossólicas e ligadas à membrana da GST. Atualmente, foram identificadas oito classes distintas das GSTs de citoplasma solúvel: alfa, kappa, mu, omega, pi, sigma, theta e zeta (O'LEARY et al., 2016). O gene testado codifica uma enzima GST que pertence à classe mu (GSTM). A classe mu de enzimas funciona na desintoxicação de compostos eletrofílicos, incluindo carcinógenos, drogas terapêuticas, toxinas ambientais e produtos de estresse oxidativo, por conjugação com a glutathione (O'LEARY et al., 2016).

Sabendo-se então que a enzima GSTM é responsável pela desintoxicação celular

(FROVA, 2006; BLANCHETTE et al., 2007), os níveis de mRNA observados, em geral, demonstram que esse mecanismo celular não foi ativado.

Segundo Moreira-de-Sousa et al. (2018), os níveis de expressão do gene hsp70 em peixes tende a aumentar quando expostos à poluentes. Coelho et al. (2018) observaram que peixes expostos ao percolado da vinhaça e a vinhaça *in natura* apresentaram aumento na expressão da proteína HSP70, revelando uma perturbação causada pelas diferentes amostras de vinhaça. Porém, Lewis et al. (2016) demonstraram que o aumento da expressão do gene hsp70 não está necessariamente relacionado com a expressão da proteína HSP70. Segundo os mesmos autores, acredita-se que quando existe indução transcricional, mas esta indução não ameaça a vida, o mRNA não é traduzido para proteína para evitar os altos custos energéticos da tradução (LEWIS et al. (2016). Sendo assim, pode-se dizer que, apesar da vinhaça biorremediada ter causado perturbação no nível de expressão gênica do hsp70, essa perturbação não foi suficiente para causar uma mudança na tradução da proteína.

Os aldeídos são sempre produzidos quando hidroperóxidos lipídicos decompõem-se em sistemas biológicos, e é interessante identificar e medir esses compostos como um índice da extensão da peroxidação lipídica e como uma ajuda para elucidar o papel dos aldeídos como agentes causais em certas condições patológicas. O MDA é um dos intermediários mais importantes e o aldeído individual mais abundante produzido durante a peroxidação lipídica, que é conhecida por sua capacidade de interagir com o DNA. O MDA *in vitro* pode também alterar proteínas, RNA e muitas outras biomoléculas (DRAPER; HADLEY, 1990). Segundo Farombi et al. (2007), a exposição de peixes à metais tiveram aumento nos níveis de MDA, assim como a exposição dos peixes à cianobactérias tóxicas (PRIETO et al., 2007). Sabendo-se disso, pode-se afirmar por meio dos resultados apresentados que, a vinhaça biorremediada não apresentou toxicidade para iniciar a degradação dos lipídios.

5. CONCLUSÃO

Sabe-se que tanto a vinhaça *in natura* quanto o percolado da vinhaça percolada são tóxicas aos animais do ambiente aquatic. Entretanto, os resultados em conjunto sugerem que a vinhaça biorremediada em todas as diluições testadas neste estudo não apresentaram ativação sistêmica dos mecanismos celulares responsáveis por combater ou desintoxicar os hepatócitos.

Levando em conta a possibilidade da vinhaça biorremediada atingir os corpos hídricos, os testes de toxicidade apresentaram resultados excelentes quando comparados aos estudos conduzidos com diferentes amostras de vinhaça *in natura*, uma vez que a toxicidade da

vinhaça foi notavelmente reduzida após o tratamento. Os animais expostos não apresentaram alterações histológicas capazes de comprometer a vida aquática destes animais, tornando, assim, a utilização deste resíduo mais segura.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP (2012/50197-2 e 2014/23919-2) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

ATLI, G.; ALPTEKIN, O.; TUKEL, S.; CANLI, M. Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry & Physiology**, v. 143, p. 218–224, 2006.

BAGNYUKOVA, T. V., LUSHCHAK, O. V., STOREY, K. B., & LUSHCHAK, V. I. Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23 C. **Journal of Thermal Biology**, v. 32, p. 227–234, 2007.

BASHA, P.S.; RANI, A.U. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 218–221, 2003.

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.

BIRNIE-GAUVIN, K.; CONSTANTINI, D.; COOKE, S. J.; WILLMORE, W. G. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. **Fish and Fisheries**, n. August 2016, p. 1–15, 2017.

BLANCHETTE, B., FENG, X., SINGH, B.R. Marine glutathione S-transferases. **Marine Biotechnology**, v. 9, p. 513–542, 2007.

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

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

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**. In: Carmem Silvia Fontanetti ; Odair Correa Bueno. (Org.). Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica. 1ed.Bauru, São Paulo: Canal 6 Editora, p. 63-86, 2017.

COELHO, M.P.M.; CORREIA, J.E.; VASQUES, L.I.; MARCATO, A.C.C.; GUEDES, T.A.; SOTO, M.A.; BOSSO, J.B.; KIANG, C.; FONTANETTI, C.S. Toxicity evaluation of leached of sugarcane vinasse: Histopathology and immunostaining of cellular stress protein. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 165, n. April, p. 367–375, 2018.

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

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

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde Determination as Index of Lipid Peroxidation. **Methods in Enzymology**, vol. 186, 1990.

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

FAROMBI, E.O.; ADELOWO, O.A.; AJIMOKO, Y.R. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.4, p. 158–165, 2007.

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

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

FILHO, D.W. Fish antioxidant defenses - a comparative approach. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 1735-1742, 1996.

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

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

KIANG C.H.; BASSO, J.B.; SOTO, M.A. **Impacto da Fertirrigação por vinhaça em corpos d'água**. In: Fontanetti, C.S., Bueno, O.C. (Org.). Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica. Bauru, SP: Canal 6. pp. 215–228, 2017.

LEWIS, M.; GÖTTING, M.; ANTTILA, K.; KANERVA, M.; PROKKOLA, J.M.; SEPPÄNEN, E.; KOLARI, I.; NIKINMAA, M. Different relationship between hsp70 mRNA and hsp70 levels in the heat shock response of two salmonids with dissimilar temperature preference. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. nov, p. 1–12, 2016.

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.

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

MILLER-MOREY, J.S.; DOLAH, F.M.V. Differential responses of stress proteins, antioxidant enzymes, and photosynthetic efficiency to physiological stresses in the Florida red tide dinoflagellate, *Karenia brevis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 138, p. 493–505, 2004.

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

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

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

O'LEARY, N.A.; WRIGHT, M.W.; BRISTER, J.R.; CIUFO, S.; HADDAD, D.; MCVEIGH, R.; RAJPUT, B.; ROBERTSE, B.; SMITH-WHITE, B.; AKO-ADJEI, D.; ASTASHYN, A.; BADRETDIN, A.; BAO, Y.; BLINKOVA, O.; BROVER, V.; CHETVERNIN, V.; CHOI, J.; COX, E.; ERMOLAEVA, O.; FARRELL, C.M.; GOLDFARB, T.; GUPTA, T.; HAFT, D.; HATCHER, E.; HLAVINA, W.; JOARDAR, V.S.; KODALI, V.K.; LI, W.; MAGLOTT, D.;

MASTERSON, P.; MCGARVEY, K.M.; MURPHY, M.R.; O'NEILL, K.; PUJAR, S.; RANGWALA, S.H.; RAUSCH, D.; RIDDICK, L.D.; SCHOCH, C.; SHKEDA, A.; STORZ, S.S.; SUN, H.; THIBAUD-NISSEN, F.; TOLSTOY, I.; TULLY, R.E.; VATSAN, A.R.; WALLIN, C.; WEBB, D.; WU, W.; LANDRUM, M.J.; KIMCHI, A.; TATUSOVA, T.; DICUCCIO, M.; KITTS, P.; MURPHY, T.D.; PRUITT, K.D. **Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation.** *Nucleic Acids Res.* Jan 4; 44(D1): 733-45, 2016.

PEAKALL, D. B.; WALKER, C. H. The role of biomarkers in environmental assessment. *Vertebrates. Ecotoxicology*, v. 3, n. 3, p. 173-179, 1994.

PEIXOTO, F.; ALVES-FERNANDES, D.; SANTOS, D.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 85, p. 91–96, 2006.

PRIETO, A.I.; PICHARDO, S.; JOS, A.; MORENO, I.; CARMEÁN, A.M. Time-dependent oxidative stress responses after acute exposure to toxic cyanobacterial cells containing microcystins in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, v. 84, n. 3, p. 337–345, 2007.

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

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

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

SILVA-ZACARIN, E.C.M.; CHAUZAT, M.P.; ZEGGANE, S.; DRAJNUDEL, P.; SCHURR, F.; FAUCON, J.P.; MALASPINA, O.; ENGLER, J.A. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology*, p. 696-703. 2012.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; RICHARD, T.D.G. FÖRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. **Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect.** In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M., Jr, Bergman, H.L. (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers: Chelsea, MI, USA, pp. 235-335, 1992.

SUN, Y. I.; OBERLEY, L. W. Redox regulation of transcriptional activator. *Science*, v. 21, n. 3, p. 335–348, 1996.

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

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

ZELIKOFF, J.T. Metal pollution-induced immunomodulation in fish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 4, p. 305-325, 1993.

Tabela 1. Valores dos parâmetros resultantes da caracterização da água e diluições dos bioensaios.

Parâmetros/ Amostras	Controle (Água)	Diluição de 1% de vinhaça biorremediada	Diluição de 5% de vinhaça biorremediada
DBO¹	2.7	3.5	11.8
DQO²	<15,0	< 15,0	65
Nitrato¹	2.293	1.618	1.817
Nitrito¹	0.0252	0.0314	0.0325
pH	7.49	7.47	7.68
Cobre¹	< 0,005	< 0,005	0.007
Turbidez	1.8	1.90	3.30
Prata¹	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Alumínio¹	< 0,050	< 0,050	< 0,050
Arsênio¹	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Cádmio¹	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Cobalto¹	< 0,003	< 0,003	< 0,003
Cromo¹	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Ferro¹	< 0,050	< 0,050	0.178
Mercúrio¹	< 0,0002	< 0,0002	< 0,0002
Sódio¹	93.4	94.6	89.7
Níquel¹	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Chumbo¹	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Zinco¹	0.009	0.009	0.017
Condutividade eletrolítica³	604	641	816
Sólidos dissolvidos totais¹	352	396	534

¹ valores em mg/L

² valores em mgO₂/L

³ valores em µS/cm

Tabela 2. Alterações observadas em fígado de *O. niloticus* expostos à vinhaça biorremediada e seus fatores de importância.

	Alterações observadas	Fator de importância (w)
Hepatócitos	Degeneração hidrópica	2
	Núcleo picnótico	3
	Perda de limite celular	3
	Vacúolo citoplasmático	1

Tabela 3. Análise das alterações observadas em fígado de *O. niloticus* expostos à vinhaça biorremediada.

	Controle	1% de vinhaça biorremediada	5% de vinhaça biorremediada
Degeneração hidrópica	2,26±1,98	2±2	2,4±1,88
Núcleo picnótico	0±0	0,4±1,54	0,4±1,54
Perda de limite celular	2,2±2,88	2±2,69	1,8±2,48
Vacúolo citoplasmático	0,73±0,88	0,86±0,99	0,8±1,01

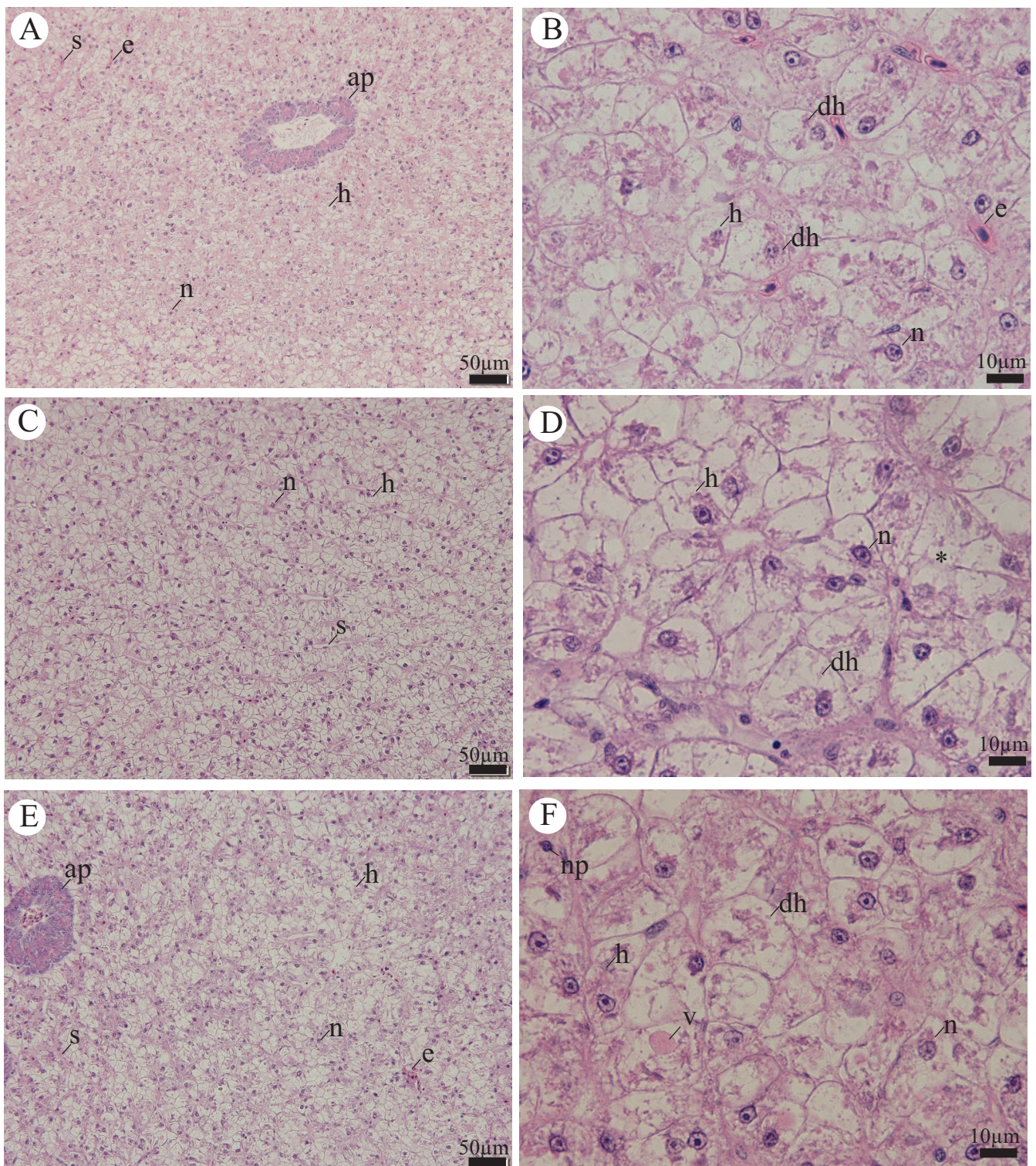


Figura 1. Secções histológicas de fígados de *O. niloticus* submetidas a coloração de Hematoxilina-Eosina. A e B: Grupo controle. C e D: Grupo exposto à diluição de 1% de vinhaça. E e F: Grupo exposto à diluição de 5% de vinhaça. ap: ácino pancreático, s: sinusóide, h: hepatócito, e: eritrócito, n: núcleo, dh: degeneração hidrópica, np: núcleo picnótico, v: vacúolo citoplasmático, asterisco: perda de limite celular.

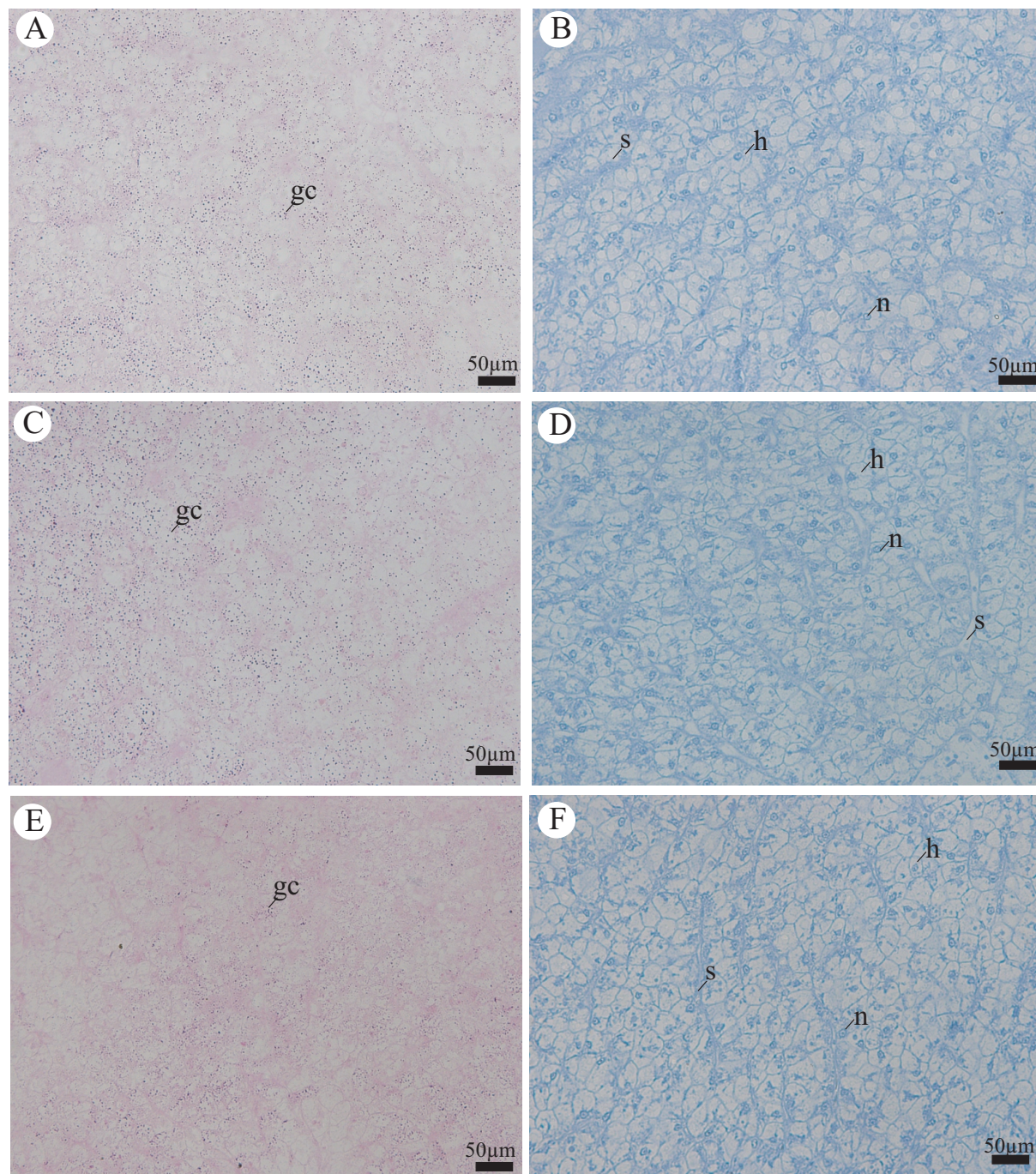


Figura 2. Secções histológicas de fígados de *O. niloticus* submetidas a coloração de PAS (A, C, E) e Azul de Bromofenol (B, D, F). A e B: Grupo controle. C e D: Grupo exposto à diluição de 1% de vinhaça. E e F: Grupo exposto à diluição de 5% de vinhaça. gc: grânulos citoplasmáticos, s: sinusóide, h: hepatócito, n: núcleo.

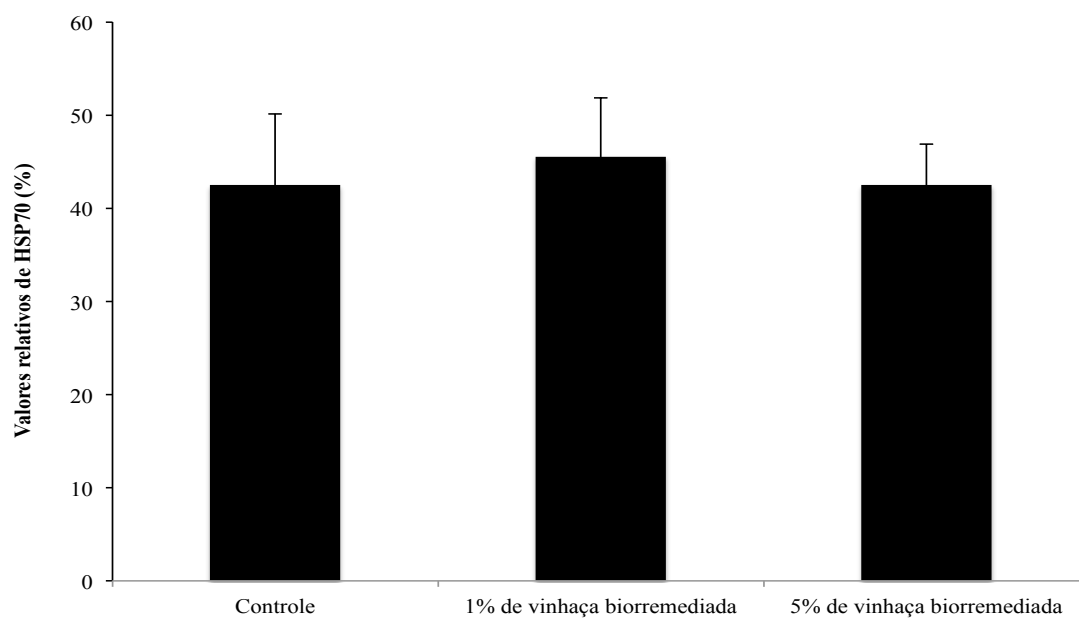


Figura 3. Valores relativos de HSP70 (média e desvio padrão) em fígado de *O. niloticus* nos grupos controle e expostos à diluições de 1% e 5% à vinhaça biorremediada.

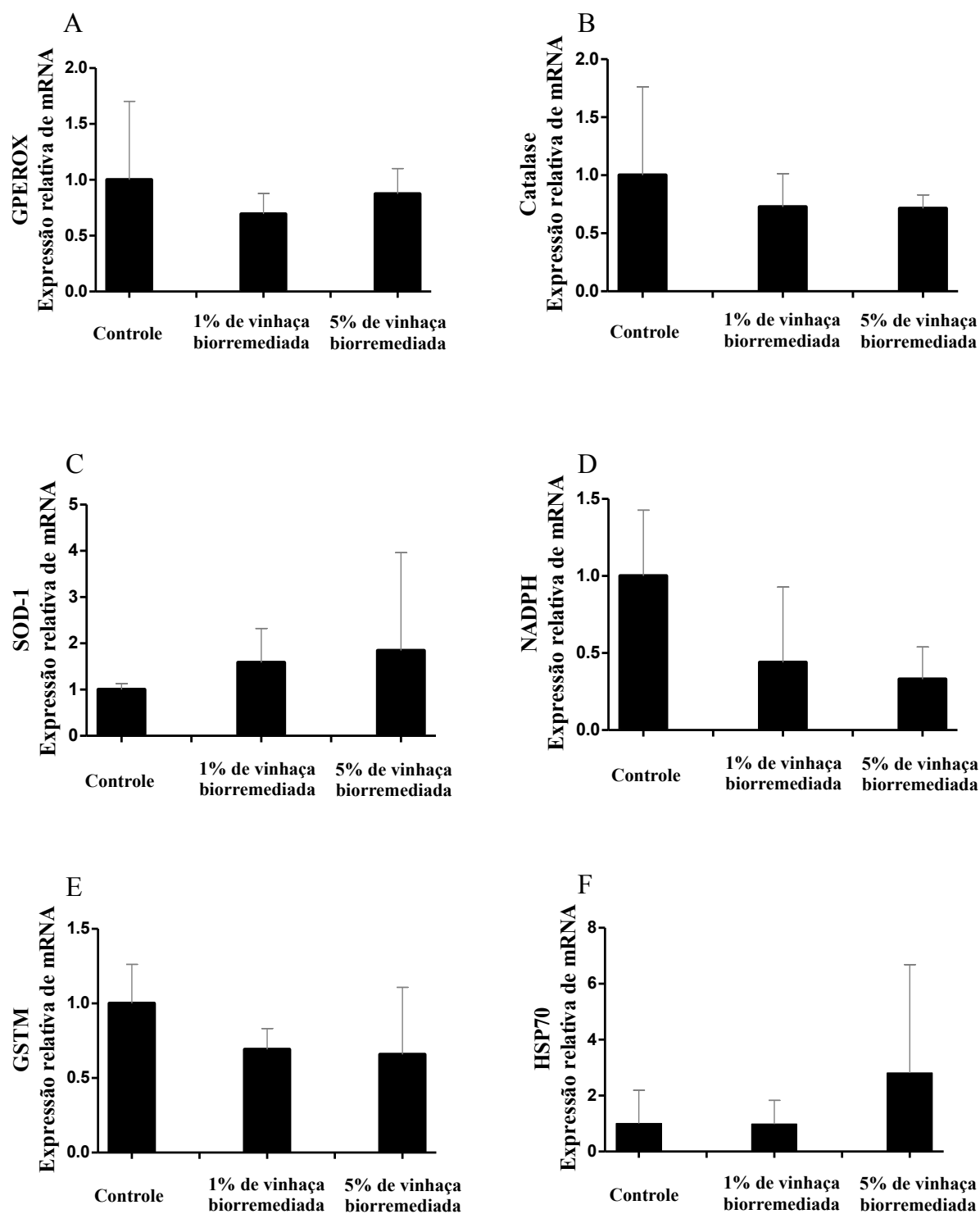


Figura 4. Expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo.

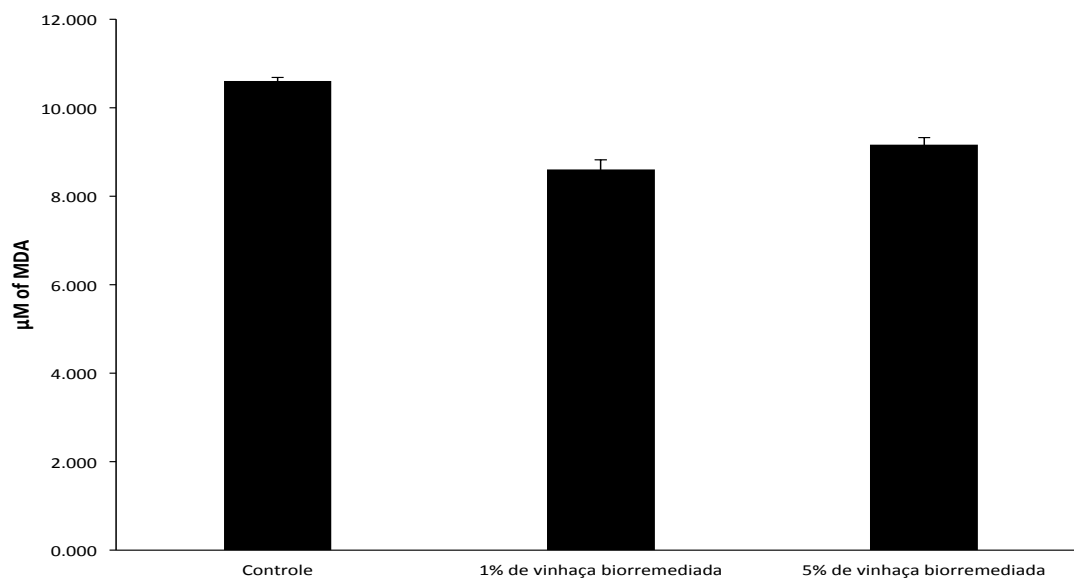


Figura 5. Média e desvio padrão dos valores de MDA analisados no fígados dos animais expostos à vinhaça biorremediada.

**Análise comportamental de anfípodas expostos a vinhaça *in natura* e
biorremediada**

Ana Claudia de Castro Marcato^{1*}, Cleiton Pereira de Souza¹, Monizze Vannuci e Silva¹,
Shanelle A. Kohler², Carmem Silvia Fontanetti¹, Alex T. Ford²

¹UNESP (Universidade Estadual Paulista), Instituto de Biociências, Rio Claro, Brasil

²School of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Portsmouth,
Portsmouth, Reino Unido

*autor correspondente: Tel.: +55 16 33441731

e-mail: marcatoacc@gmail.com

RESUMO

Atualmente, estudos sobre a vinhaça estão se tornando importantes para melhor entender os efeitos e avaliar os riscos do uso deste composto como fertilizante nas lavouras. Dados sobre as consequências comportamentais da exposição à vinhaça em invertebrados, como os anfípodos, são inexistentes. A resposta comportamental relacionada à exposição química são parâmetros importantes, pois permitem ligar os efeitos obtidos nos níveis bioquímicos e celulares aos impactos observados na saúde e aptidão da população. Este estudo teve com objetivo avaliar as alterações comportamentais em animais expostos à vinhaça biorremediada e *in natura* no anfípoda *Gammarus pulex*. Os dados obtidos mostraram que a vinhaça alterou o comportamento de natação dos animais. Embora ambas as vinhaças testadas tenham alterado o comportamento, a vinhaça *in natura* apresentou maior toxicidade, já que um maior número de animais expostos a ela morreu. Assim, os resultados obtidos mostraram que a vinhaça biorremediada apresentou redução da sua toxicidade quando comparada com a *in natura*.

Palavras-chave: *Gammarus pulex*, velocidade, distância

1. INTRODUÇÃO

Os principais constituintes químicos da vinhaça são geralmente a matéria orgânica como ácidos orgânicos, altas concentrações de íons potássio, cálcio e magnésio, seguidos dos sais sulfato, cloreto, fosfato (fósforo) e nitrato e, em menor concentração, metais traço. O pH é comumente ácido e a condutividade elétrica é alta; devido à matéria orgânica, os níveis de DBO e DQO são altos (SOTO et al., 2017). Assim, a vinhaça é considerada altamente nociva à fauna, flora, microfauna e microflora de água doce (SILVA et al., 2007).

Devido aos efeitos tóxicos da vinhaça, muitas tecnologias surgiram com o objetivo de reutilizar ou tratar a vinhaça para reduzir sua toxicidade (MOHANA et al., 2009). Marcato et al. (2019) propuseram um sistema híbrido de tratamento, onde foram observadas alterações significativas na vinhaça ao final do tratamento.

As interações entre os níveis de respostas às perturbações dentro de um sistema biológico seguem o caminho em que as perturbações nos níveis moleculares e celulares afetam todo o organismo pela obtenção de comportamento, capacidade reprodutiva e sobrevivência. O comprometimento de indivíduos submetidos à perturbação do ecossistema afeta toda a população, interferindo na taxa de crescimento populacional, interações intraespecíficas, taxa de reprodução, viabilidade das espécies, o que gerará um desequilíbrio que acarreta mudanças nas interações intraespecíficas, no sistema de competição e de predação entre as diferentes espécies (CONNON et al., 2012).

Estudar os efeitos do estresse em organismos individuais é importante pois auxilia em: (1) elucidar a mecânica da variação interpopulacional; (2) prever efeitos ao nível da população; e (3) monitorar o estresse nas comunidades naturais. O conhecimento das respostas no nível do corpo é essencial para entender como os estressores causam efeitos biológicos adversos e as estratégias adotadas pelos organismos para tolerar o estresse, bem como os efeitos dos estressores nas populações podem ser previstos a partir do conhecimento dos efeitos destes nos gastos energéticos. As respostas no nível do corpo podem ser usadas para monitorar o estresse em ambientes naturais (MALTBY, 1999).

O comportamento pode ser definido como o resultado final de uma sequência de eventos neurofisiológicos. Esses eventos incluem a estimulação de neurônios sensoriais e motores, contrações musculares e liberação de mensagens químicas (LAGADIC; CAQUET; RAMADE, 1994). Além disso, as respostas comportamentais integram muitos processos celulares vitais para a sobrevivência e a reprodução dos organismos, refletindo, assim, as consequências bioquímicas e ecológicas do impacto tóxico (GERHARDT, 1995).

Vários estudos utilizaram respostas comportamentais como ferramentas para testes de

ecotoxicidade e monitoramento da qualidade da água (por exemplo, atividade locomotora, atividade ventilatória, taxa de alimentação) porque é sensível, rápido, simples de executar e barato (WALLACE; ESTEPHAN, 2004). A mobilidade do organismo também é um marcador comportamental ecologicamente relevante, uma vez que a locomoção é necessária para encontrar alimento, escapar de predadores e obter sucesso no acasalamento. Qualquer poluente que interfira com a mobilidade provavelmente reduzirá a aptidão dos organismos e poderá envolver a "morte ecológica" (VELLINGER et al., 2012; ARCE FUNCK et al., 2013). Os parâmetros comportamentais têm sido considerados muito úteis como biomarcadores para avaliar a exposição e/ou efeito químico, e algumas vezes até mais sensíveis que outros testes (SANCHEZ-HERNANDEZ, 2011). A relevância do uso de anfípodas em estudos ecotoxicológicos é devido ao fato de serem abundantes e ecologicamente relevantes, pois são fundamentais para muitas cadeias alimentares e têm um papel importante na dinâmica dos ecossistemas (MELO; NIPPER, 2007; CARTLIDGE et al., 2017). Eles têm ciclos de vida e de reprodução curtos e são capazes de tolerar diferentes tipos de sedimentos e diferentes níveis de salinidade. Além disso, eles não precisam de muito espaço no laboratório para criação e testes.

Os anfípodas gamarídeos são frequentemente utilizados em estudos de ecotoxicologia, sendo considerados excelentes para monitorar a saúde dos biotipos aquáticos e os efeitos de contaminantes antropogênicos (ARCE FUNCK et al., 2013; FELTEN et al., 2008; GERHARDT, 1995; VELLINGER et al., 2012). Muitos estudos encontrados na literatura utilizam invertebrados e alterações comportamentais, principalmente utilizando anfípodas *Gammarus* sp. Metais e pesticidas, por exemplo, são focos destes estudos. Usando *Gammarus pulex*, Nørum et al. (2011) observaram mudanças no comportamento locomotor exposto a um pesticida e Vellinger et al. (2012) investigaram os efeitos do cádmio e do arsenato. Arce Funck et al. (2013) estudaram as respostas comportamentais do anfípoda *G. fossarum* expostos a prata.

Portanto, tendo em base estudos que comprovam que a vinhaça *in natura* pode causar danos nos níveis moleculares e celulares, ensaios comportamentais utilizando anfípodas são importantes para melhor compreender os efeitos e avaliar os riscos da utilização desta substância como fertilizante nas culturas de cana-de-açúcar.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta dos anfípodas

Foram utilizados anfípodas da espécie *G. pulex*. Indivíduos adultos foram capturados

em rede de malha de 1 mm utilizando o método delineado pela Associação Biológica de Água Doce (FBA, 2015). As coletas foram realizadas no rio Ems, em Westbourne (N50°51'34,8", W0°55'45,8"), Reino Unido, e os animais foram transportados para o Instituto de Ciências Marinhas (IMS) da Universidade de Portsmouth, Reino Unido.

2.2. Vinhaça

As amostras de vinhaça utilizadas neste estudo foram coletadas em usina de cana-de-açúcar localizada no interior do estado de São Paulo, Brasil. A vinhaça foi submetida a um sistema híbrido de tratamento com dois períodos distintos de fitorremediação, 7 e 15 dias, descrito em Marcato et al. (2019). Como controle para o tratamento, utilizou-se a vinhaça sem tratamento, denominada *in natura*.

2.3. Bioensaio

Após período de aclimação em laboratório, anfípodas machos foram expostos a duas diluições diferentes (1 e 5%) de todas as amostras de vinhaça e à água do rio, que foi utilizada como controle. Quinze organismos por grupo foram mantidos individualmente em recipientes plásticos preenchidos com água do rio e as diluições sob um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro e temperatura de 6°C por 96 horas (BOSSUS et al., 2014; De CASTRO-CATALA et al., 2017). O experimento foi realizado em réplica (bioensaio 1 e bioensaio 2). A terminologia tratamentos será utilizada para representar todas as exposições as diluições de vinhaças biorremediada e *in natura*.

2.4. Análise físico-química da água controle e diluições do bioensaio

Foram realizadas análises físico-químicas da água, usada como controle, e das 6 diluições das vinhaça (biorremediadas e *in natura*) utilizadas para a montagem dos bioensaios (tabelas 1 e 2). A análise foi realizada pelo laboratório de Biogeoquímica, da Universidade de Portsmouth, Inglaterra. Foram analisados os dados referentes ao pH, DBO, DQO, sólidos totais dissolvidos, condutividade elétrica, nitrito, nitrato, turbidez e dos metais Ag, Al, As, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Hg, Na, Ni, Pb e Zn. As análises foram realizadas seguindo a metodologia USEPA - Environmental Protection Authority (2005).

2.5. Análise comportamental

Após 96 horas de exposição, foram realizados ensaios comportamentais para cada condição usando DanionVision™ (Noldus Information Technology, Wageningen, Holanda)

e seu software EthoVision® XT. Os animais foram colocados em placas de seis poços contendo água do rio e tiveram as medidas de velocidade de nado (cm/s) e distância percorrida (cm) registradas por 12 minutos, tendo períodos alternados de luminosidade e escuridão a cada 2 minutos. As análises estatísticas foram realizadas com os dados obtidos de cada anfípoda durante os períodos de gravação dos ensaios comportamentais (BOSSUS et al., 2014). Os dados foram subdivididos em períodos de 30 segundos e 2 minutos.

2.6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no IBM SPSS®Statistics 24. Foram realizados testes de análise de variância one-way (ANOVA) para os dados de comportamento usando concentrações e tempo de exposição como fatores de forma independente. O teste de Tukey HSD foi usado para análise post hoc. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADO

3.1. Mortalidade

As mortes dos animais durante os experimentos foram resumidas na tabela 3. Durante os experimentos, animais expostos tanto a vinhaça biorremediada quanto à vinhaça *in natura* morreram. Porém, a vinhaça *in natura* apresentou maior toxicidade.

3.2. Distância percorrida pelos anfípodas

No primeiro bioensaio, com dados de períodos de 30 segundos, foram observadas diferenças significativas na distância percorrida pelos animais comparando os tratamentos entre si ($F(5; 3447,500)=10,854$, $p=0,000$) (Fig. 1). Comparados aos do grupo controle, os animais expostos à 5% da vinhaça biorremediada por 7 dias e 1% da vinhaça biorremediada por 15 dias tiveram alterações significativas. Quando a luminosidade foi utilizada como fator da análise estatística, períodos de 30 segundos, a diferença entre os tratamentos foi significativa ($F(23; 6256,173)=24,646$, $p=0,000$). Quando os dados foram divididos em períodos de 2 minutos (Fig. 2), a diferença entre os tratamentos e o controle foi significativa ($F(5; 13789,984)=3,406$, $p=0,005$), assim como quando a luminosidade foi usada como fator ($F(5; 108059,656)=35,373$, $p=0,000$).

No segundo bioensaio, para períodos de 30 segundos, comparando os tratamentos com o controle, a diferença foi significativa ($F(6; 9919,299)=42,724$, $p=0,000$) para os animais expostos à 1% da vinhaça biorremediada por 7 e 15 dias e 5% à vinhaça *in natura* (Fig. 3). Quando o fator é a luminosidade, a diferença entre os tratamentos também foi significativa

($F(23; 4058,213)=18,735$, $p=0,000$). Para períodos de 2 minutos, comparando os tratamentos com o controle, a diferença foi significativa ($F(6; 39677,204)=12,617$, $p=0,000$), assim como usando a luminosidade como fator ($F(5; 68595,315)=23,494$, $p=0,000$) (Fig. 4).

3.3. Velocidade de nado dos anfípodas

No primeiro bioensaio, foram observadas diferenças significativas na velocidade do nado dos animais entre os tratamentos nos períodos de 30 segundos ($F(5; 3,831)=10,840$, $p=0,000$) (Fig. 5). A diferença foi significativa comparando-se o grupo controle com os animais expostos à 1% da vinhaça biorremediada 15 dias e 5% da vinhaça biorremediada por 7 dias. Quando o fator analisado é a luminosidade, em períodos de 30 segundos, a diferença entre o controle e os tratamentos também foi significativa ($F(23; 6,966)=24,670$, $p=0,000$). Com os dados separados em períodos de 2 minutos, a diferença entre os tratamentos foi significativa ($F(5; 0,958)=3,400$, $p=0,005$) (Fig. 6), porém, não foi observada diferenças significativas quando comparado o controle com os tratamentos. Quando a luminosidade é fator, os resultados foram significativos ($F(5; 7,522)=35,403$, $p=0,000$).

No segundo bioensaio, para períodos de 30 segundos, comparando os tratamentos, a diferença entre os grupos foi de $F(6; 11,023)=42,722$, $p=0,000$. Comparado ao grupo controle, os resultados foram significativos para os animais expostos a 1% de vinhaça biorremediada por 7 e 15 dias e 5% de vinhaça *in natura*. A diferença entre os tratamentos foi significativa ($F(23; 4,510)=18,737$, $p=0,000$) quando usada a luminosidade como fator (Fig. 7). Para os dados em intervalos de 2 minutos, comparando os tratamentos, a diferença entre eles foi significativa ($F(6; 2756)=12,617$, $p=0,000$). Quando comparado o grupo controle com os tratamentos, os resultados foram significativos para o animais expostos a 1% de vinhaça biorremediada por 7 e 15 dias e 5% de vinhaça *in natura*; assim como, utilizando a luminosidade como fator, a diferença foi significativa ($F(5; 4764) = 23,496$, $p=0,000$) (Fig. 8).

4. DISCUSSÃO

Alterações no comportamento parecem ser os mecanismos mais relevantes pelos quais os animais se adaptam às mudanças em seu ambiente, incluindo a exposição a contaminantes (KANE et al., 2005). Além disso, o comportamento é o resultado final integrado aos processos bioquímicos e fisiológicos e é considerado adequado para agregar relevância ecológica aos estudos de laboratório, tendo a vantagem de ser uma técnica não invasiva (HELLOU, 2011). Posto isto, o comportamento fornece uma perspectiva toxicológica única

que liga as consequências bioquímicas e ecológicas da contaminação ambiental (HELLOU, 2011).

Característica comportamental, como a velocidade de nado, é um dos parâmetros comportamentais mais utilizados para avaliar o estado fisiológico de organismos aquáticos e tem sido amplamente utilizado para avaliar os efeitos de poluentes (DE LANGE et al., 2009; GRAVATO; GUILHERMINO, 2009; ALMEIDA et al., 2010, 2012; CAILLEAUD et al., 2011; KOHLER et al., 2018).

Neste estudo, observou-se que a vinhaça alterou o comportamento de nado dos animais em todas as diluições. A locomoção está na base de praticamente todos os outros comportamentos complexos, devido à sua ligação com os processos fisiológicos, metabólicos e neurológicos do animal e sua condição anatômica, sendo ao mesmo tempo, importante na interação inter e intraespecífica entre os animais (AMIARD-TRIQUET, 2009; BAATRUP, 2009).

Embora os resultados dos dois experimentos tenham sido antagônicos, já que no bioensaio 1, as amostras de vinhaça, em geral, inibiu os comportamentos, enquanto que no bioensaio 2, a vinhaça estimulou esses mesmos comportamentos, segundo a literatura, a velocidade é um comportamento sensível que pode ser alterado pela exposição à luz. Bossus et al. (2014) e Kohler et al. (2018) corroboram a ideia de que o aumento da velocidade é uma resposta de escape do animal. Baatrup (2009) também relaciona a atividade de locomoção aos processos fisiológicos, metabólicos e neurológicos, além de condições anatômicas. O comprometimento da velocidade de nado pode ter consequências sobre outros comportamentos necessários à sobrevivência do animal, como a capacidade de encontrar alimento, relacionamento social, migração, reprodução ou até mesmo evitar lugares desfavoráveis (NØRUM et al., 2010; MORILLO-VELARDE et al., 2011). Assim, tanto o aumento quanto a diminuição da velocidade dos animais expostos a diferentes diluições de vinhaça são prejudiciais, pois podem interferir na adequação da população e, consequentemente, no nível da comunidade e do ecossistema (NØRUM et al., 2010; MORILLO-VELARDE et al., 2011). Concomitantemente à velocidade, a distância durante os períodos de avaliação também foi alterada.

Apesar dos resultados obtidos nos experimentos, dentre todas as diluições testadas, quando comparados os resultados obtidos da vinhaça biorremediada com a *in natura*, observou-se que a vinhaça *in natura* apresentou-se mais tóxica aos animais expostos, pois teve alto índice de mortalidade. Sabe-se que o poder poluente da vinhaça é, principalmente, causado pelas altas taxas de DBO e DQO (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; FONTANETTI;

BUENO, 2017), características observadas nas diluições da vinhaça *in natura* utilizada neste estudo.

Sendo assim, pode-se inferir que a vinhaça, mesmo após passar por um sistema híbrido de tratamento, mantém características capazes de alterar o comportamento desses animais e interferir na sobrevivência da espécie.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP (Processos nº 2012/50197-2, 2014/23919-2 e 2018/2018/06971-1) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALMEIDA, J., OLIVEIRA, C., GRAVATO, C., GUILHERMINO, L. Linking behavioural alterations with biomarkers responses in the European seabass *Dicentrarchus labrax* L. exposed to the organophosphate pesticide fenitrothion. **Ecotoxicology**, 19, 1369–1381, 2010.

ALMEIDA, J., GRAVATO, C., GUILHERMINO, L. Challenges in assessing the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine organisms: a case study on the acute toxicity of pyrene to the European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Chemosphere**, 86, 926–937, 2012.

AMIARD-TRIQUET, C. Behavioural disturbances: the missing link between sub- organismal and supra-organismal responses to stress? Prospects Based on aquatic research. **Hum. Ecol. Risk Assess.** 15, 87–110, 2009.

ARCE FUNCK, J., DANGER, M., GISMONDI, E., COSSU-LEGUILLE, C., GUÉROLD, F., FELTEN, V. Behavioural and physiological responses of *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda) exposed to silver. **Aquatic Toxicology**, v. 142-143, p. 73–84, 2013.

BAATRUP, E. Measuring complex behaviour patterns in fish- effects of endocrine disruptors on the guppy reproductive behaviour. **Hum Ecol Risk Assess.** 15, 53–62, 2009.

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

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

CAILLEAUD, K., MICHALEC, F., FORGET-LERAY, J., BUDZINSKI, H., HWANG, J., SCHMITT, F.G., SOUISSI, S. Changes in the swimming behavior of *Eurytemora affinis* (Copepoda, Calanoida) in response to a sub-lethal exposure to nonylphenols. **Aquat. Toxicol.** 102, 228–231, 2011.

CARTLIDGE, R., NUGEGODA, D. AND WLODKOWIC, D. 'Millifluidic Lab-on-a-Chip technology for automated toxicity tests using the marine amphipod *Allorchestes compressa*, **Sensors & Actuators**. Elsevier B.V., 239, pp. 660–670, 2017. doi: 10.1016/j.snb.2016.08.058.

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

CONNON, R.E., GEIST, J., WERNER, I. Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. **Sensors** (Switzerland) 12, 12741–12771, 2012. <https://doi.org/10.3390/s120912741>

DE CASTRO-CATALÀ, N.; MUÑOZ, I.; RIERA, J.L.; FORD, A.T. Evidence of low dose effects of the antidepressant fluoxetine and the fungicide prochloraz on the behavior of the keystone freshwater invertebrate *Gammarus pulex*. **Environmental Pollution**, v. 231, p. 406–414, 2017.

DE LANGE, H.J., PEETERS, E.T.H., LURLING, M. Changes in ventilation and locomotion of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) in response to low concentrations of pharmaceuticals. **Hum. Ecol. Risk Assess.** 15, 111–120, 2009.

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

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

FONTANETTI, C.S.; BUENO, O.C. **Cana-de-açúcar e seus impactos**. Canal 6: Bauru, 2017.

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

GRAVATO, C., GUILHERMINO, L. Effects of benzo(a)pyrene on seabass (*Dicentrarchus labrax* L.): biomarkers, growth and behaviour. **Hum. Ecol. Risk Assess.** 15, 121–137, 2009.

HELLOU, J. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. **Environ. Sci. Pollut. R** 18, 1–11, 2011.

KANE, A.S., SALIERNO, J.D., BREWER, S.K. **Fish models in behavioral toxicology: automated techniques, updates and perspectives**. In: Ostrander, G.K. (Ed.), *Methods in, Aquatic Toxicology*, pp. 559–590, 2005.

KANE, A.S.; SALIERNO, J.D.; BREWER, S.K. Fish models in behavioral toxicology: automated techniques, updates and perspectives. In: Ostrander, G.K. (Ed.), *Methods in, Aquatic Toxicology*, p. 559–590, 2005.

KOHLER, S.A., PARKER, M.O., FORD, A.T., Species-specific behaviours in amphipods

highlight the need for understanding baseline behaviours in ecotoxicology. **Aquatic Toxicology**, 2018.

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

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

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

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

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.

MORILLO-VELARDE, P.S., LLORET, J., MARÍN, A., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, S.J. Effects of cadmium on locomotor activity rhythms of the amphipod *Gammarus aequicauda*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 60, 444–451, 2011.

NØRUM, U., FREDERIKSEN, M.A.T., BJERREGAARD, P. Locomotory behaviour in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* exposed to the pyrethroid cypermethrin. **Chem. Ecol.** 27, 569–577, 2011. <https://doi.org/10.1080/02757540.2011.596831>

NØRUM, U., FRIBERG, N., JENSEN, M.R., PEDERSEN, J.M., BJERREGAARD, P. Behavioural changes in three species of freshwater macroinvertebrates exposed to the pyrethroid lambda-cyhalothrin: laboratory and stream microcosm studies, **Aquat. Toxicol.** 98, pp. 328–335, 2010.

SANCHEZ-HERNANDEZ, J.C. Pesticide Biomarkers in terrestrial invertebrates. In: Stoytcheva, M. (Ed.), **Pesticides in the Modern World** – Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity, Assessment, pp. 213–240, 2011.

SILVA, M.A.S., GRIEBELER, N.P., BORGES, L.C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Ver. Bras. Eng. Agríc. Ambient.** 11, 108–114, 2007.

SOTO, M.A., BASSO, J.B., KIANG, C.H. **Impacto da fertirrigação da cana-de-açúcar por vinhaça nas propriedades físicas, químicas e hidráulicas do solo.** in: Fontanetti, C.S.; Bueno, O.C. (Org). *Cana- de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica*. Bauru, SP: Canal 6, 13-30, 2017.

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

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

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

Tabela 1. Valores dos parâmetros das amostras de vinhaça dos bioensaios.

Parâmetros	Vinhaça <i>in natura</i>	Vinhaça	Vinhaça
		biorremediada por 7 dias	biorremediada por 15 dias
Fósforo total¹	49,30	17,70 ± 2,94	13,94 ± 1,23
Nitrogênio amoniacal²	10,77	0,17 ± 0,04	0,47 ± 0,41
Nitrogênio total²	278,90	29,07 ± 9,28	21,87 ± 3,49
pH	4,32	7,66 ± 0,05	7,99 ± 0,28
Cálcio¹	992	253,33 ± 1,15	226 ± 20,42
Potássio¹	3210	956,67 ± 49,34	1069 ± 79,57
Sódio¹	12,40	23,39 ± 19,40	41,77 ± 1,20
Sulfato¹	2787	26,31 ± 15,97	<10,00
DBO¹	11635	961,33 ± 276,44	675 ± 138,87
DQO³	28220	2827 ± 301,69	3077,67 ± 248,57
Cádmio¹	<0,001	< 0,0001	< 0,0001
Chumbo¹	<0,005	<0,005	<0,005
Cobre¹	0,19	0,01 ± 0,03	0,009 ± 0,03
Cromo¹	0,02	0,01 ± 0,03	0,015 ± 0,04
Níquel¹	0,02	0,01 ± 0,03	0,02 ± 0,06
Zinco¹	0,75	0,06 ± 0,20	1,38 ± 4,14

¹ valores em mg/L² valores em mgNH₃-N/L³ valores em mgO₂/L

Tabela 2. Valores dos parâmetros resultantes da caracterização da água e das diluições das vinhaças dos bioensaios.

	Controle	1% de vinhaça biorremediada por 7 dias	5% de vinhaça biorremediada por 7 dias	1% de vinhaça biorremediada por 15 dias	1% de vinhaça biorremediada por 15 dias	1% vinhaça <i>in natura</i>	5% vinhaça <i>in natura</i>
DBO¹	2.2	9.4	31.2	4.8	13.5	141.3	523.8
DQO¹	11	19	102	13	66	210	1103
Condutividade Elétrica²	286	333	541	330	548	459	1089
pH	8.15	7.54	7.56	7.76	7.75	6.5	4.55
Sólidos totais suspensos¹	8.2	4.2	13.6	1.4	4.4	21.5	39.5
Turbidez	0.45	1.57	6.76	2.1	6.34	13.54	31.7
NO₃³	18	17	20	18	19	12	20
NO₂³	0.003	0.006	0.6	0.003	0.012	0.003	0.003
Cromo¹	< 0.0004	< 0.0005	< 0.0006	< 0.0007	< 0.0008	< 0.0009	< 0.0004
Cádmio¹	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Cobre¹	< 0.0020	< 0.0020	< 0.0020	< 0.0020	< 0.0020	< 0.0020	0.0031
Zinco¹	0.0395	0.0173	0.1034	< 0.0004	0.0102	0.0141	0.0474
Chumbo¹	< 0.0011	< 0.0011	< 0.0011	< 0.0011	< 0.0011	< 0.0011	< 0.0011
Ferro¹	< 0.0004	0.0167	0.0981	0.0187	0.1370	0.0630	0.3641
Alumínio¹	0.0070	0.0045	0.0307	0.0053	0.0302	< 0.0035	0.0330
Níquel¹	< 0.0008	< 0.0008	< 0.0008	< 0.0008	< 0.0008	< 0.0008	0.0012
Prata¹	< 0.0027	< 0.0027	< 0.0027	< 0.0027	< 0.0027	< 0.0027	< 0.0027
Arsênio¹	< 0.0010	< 0.0010	< 0.0010	< 0.0010	< 0.0010	< 0.0010	< 0.0010
Cobalto¹	< 0.0002	< 0.0002	< 0.0002	< 0.0002	< 0.0002	< 0.0002	< 0.0002
Mercúrio¹	0.0017	0.0016	0.0010	0.0012	< 0.0004	0.0009	< 0.0004
Sódio¹	12.2761	12.9734	16.2067	12.4811	16.7792	12.5246	15.7304

¹ valores em mg/L² valores em uS/cm³ valores em mg/L-N

Tabela 3: Taxa de mortalidade de *Gammarus pulex* durante 96 horas de exposição à diferentes vinhaças (n=15)

	Diluição	Bioensaio 1	Bioensaio 2
Controle	-	0	0
Vinhaça biorremediada por 7 dias	1%	0	2
	5%	2	0
Vinhaça biorremediada por 15 dias	1%	0	3
	5%	0	3
Vinhaça <i>in natura</i>	1%	8	5
	5%	15	11

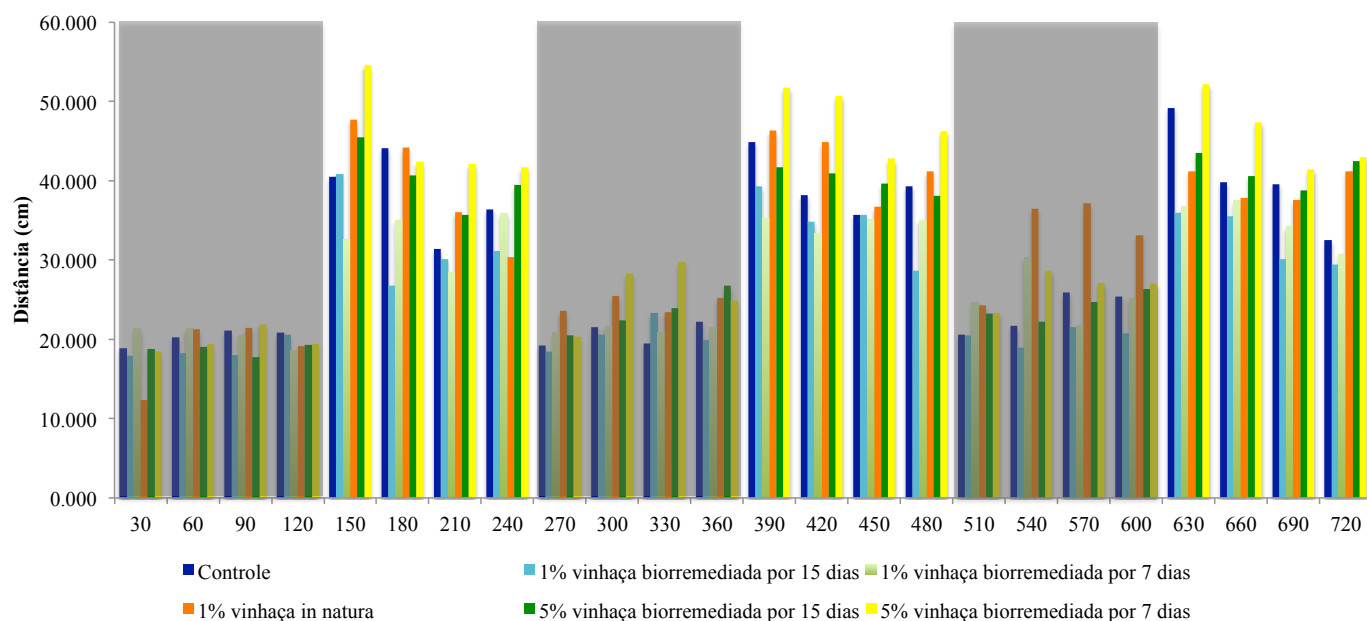


Figura 1: Média da distância percorrida (cm) pelos animais no período de 30 segundos (bioensaio 1). Áreas sombreadas representam os períodos de luz apagada.

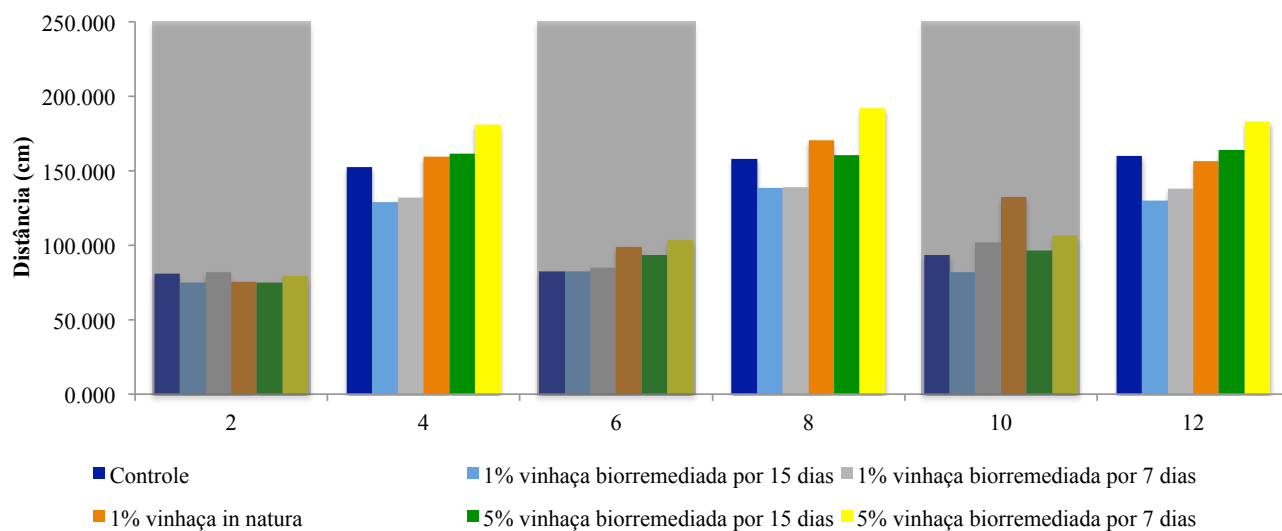


Figura 2: Média da distância percorrida (cm) pelos animais no período de 2 minutos (bioensaio 1). Áreas sombreadas representam os períodos de luz apagada.

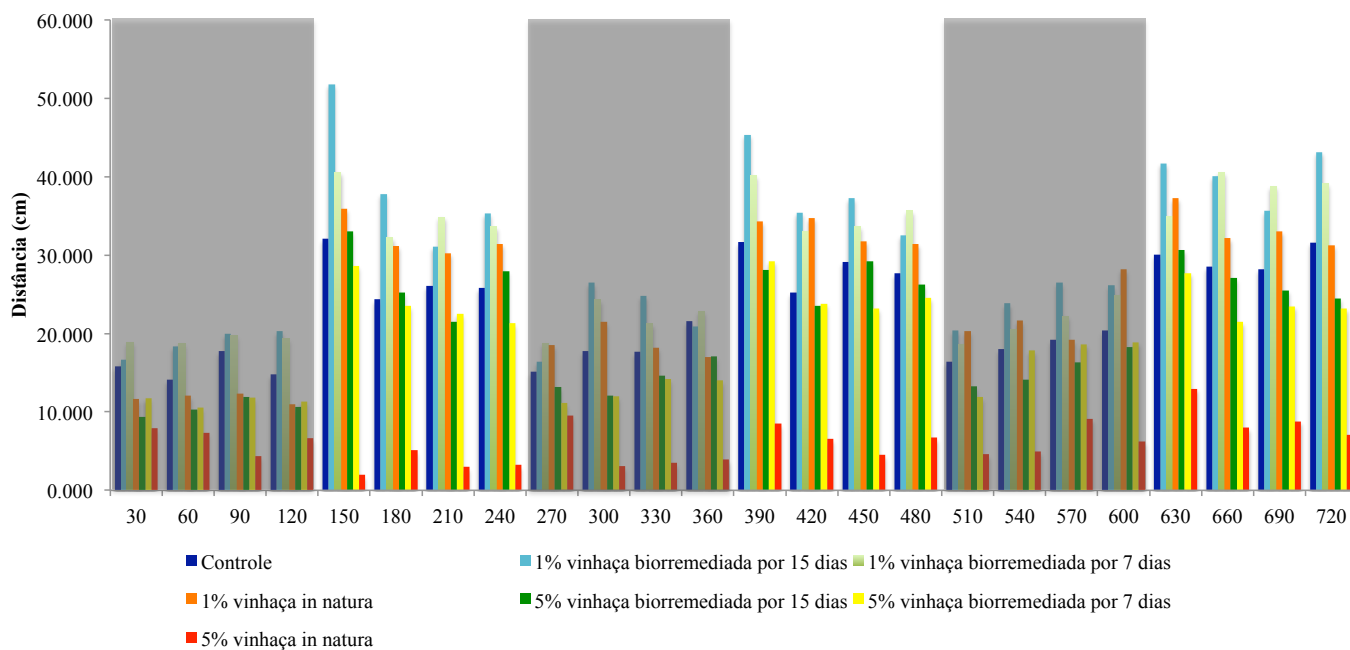


Figura 3: Média da distância percorrida (cm) pelos animais no período de 30 segundos (bioensaio 2). Áreas sombreadas representam os períodos de luz apagada.

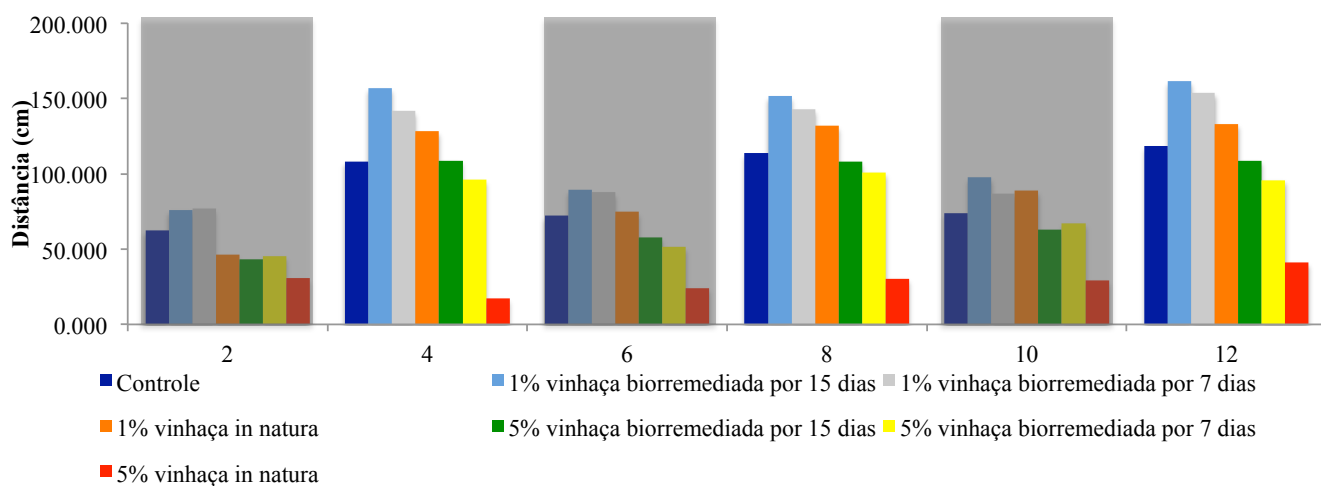


Figura 4: Média da distância percorrida (cm) pelos animais no período de 2 minutos (bioensaio 2). Áreas sombreadas representam os períodos de luz apagada.

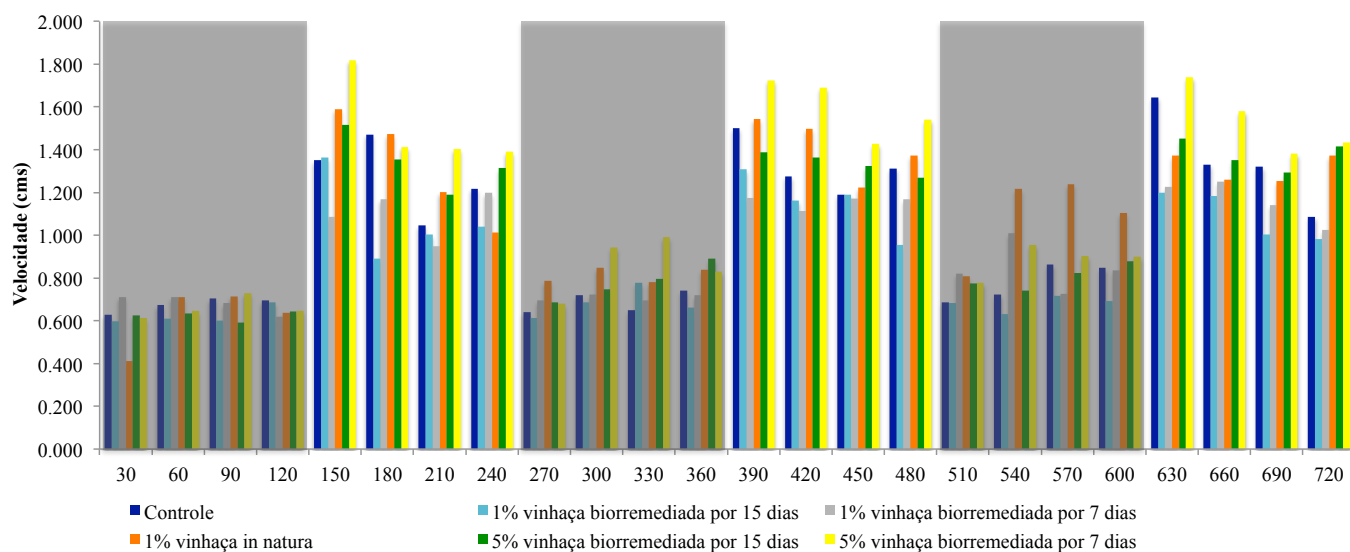


Figura 5: Velocidade média (cm/s) no período de 30 segundos (bioensaio 1). Áreas sombreadas representam os períodos de luz apagada.

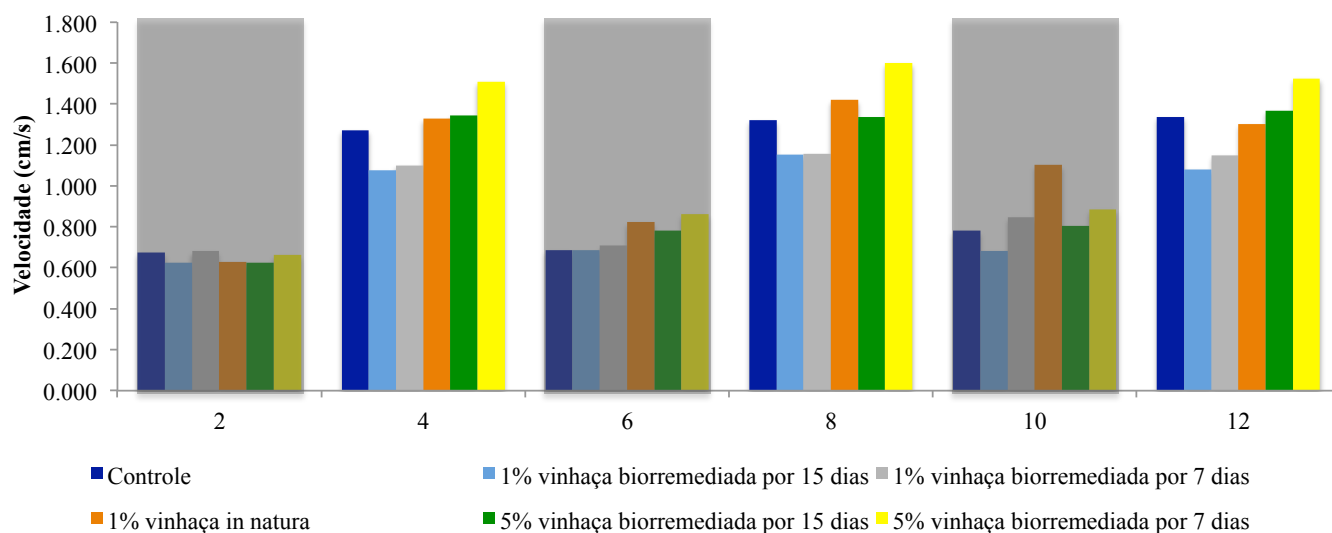


Figura 6: Velocidade média (cm/s) no período de 2 minutos (bioensaio 1). Áreas sombreadas representam os períodos de luz apagada.

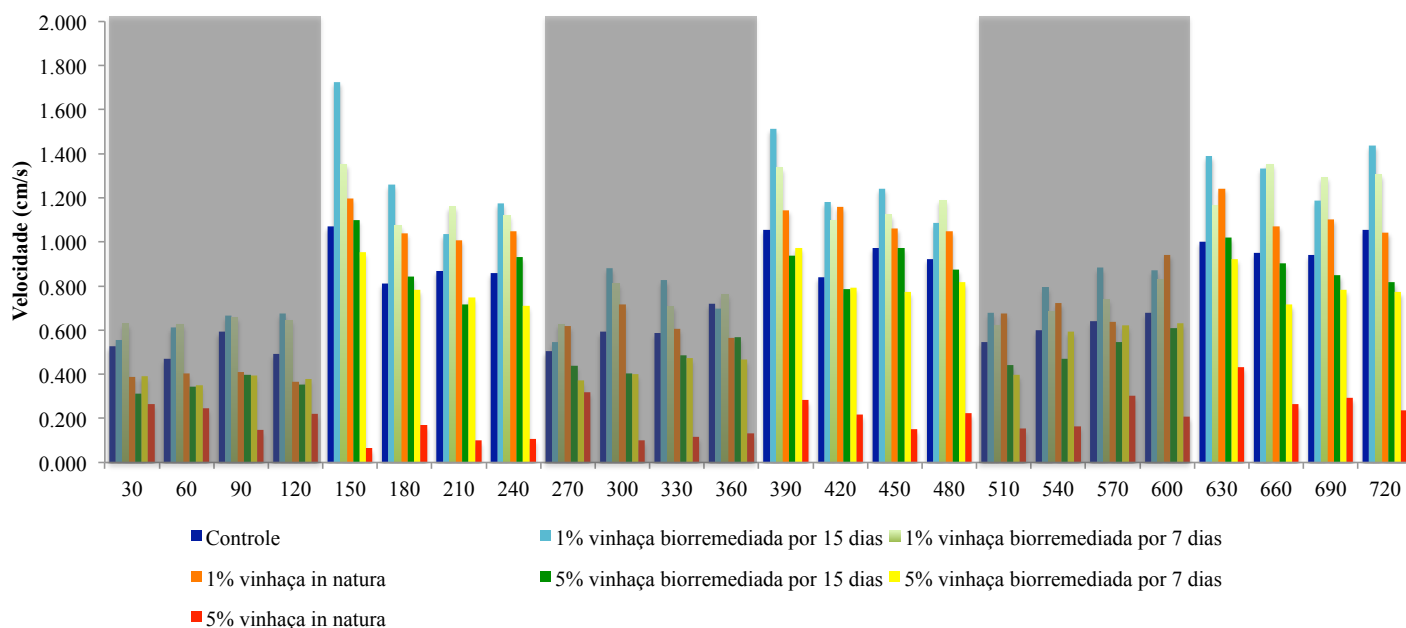


Figura 7: Velocidade média (cm/s) no período de 30 segundos (bioensaio 2). Áreas sombreadas representam os períodos de luz apagada.

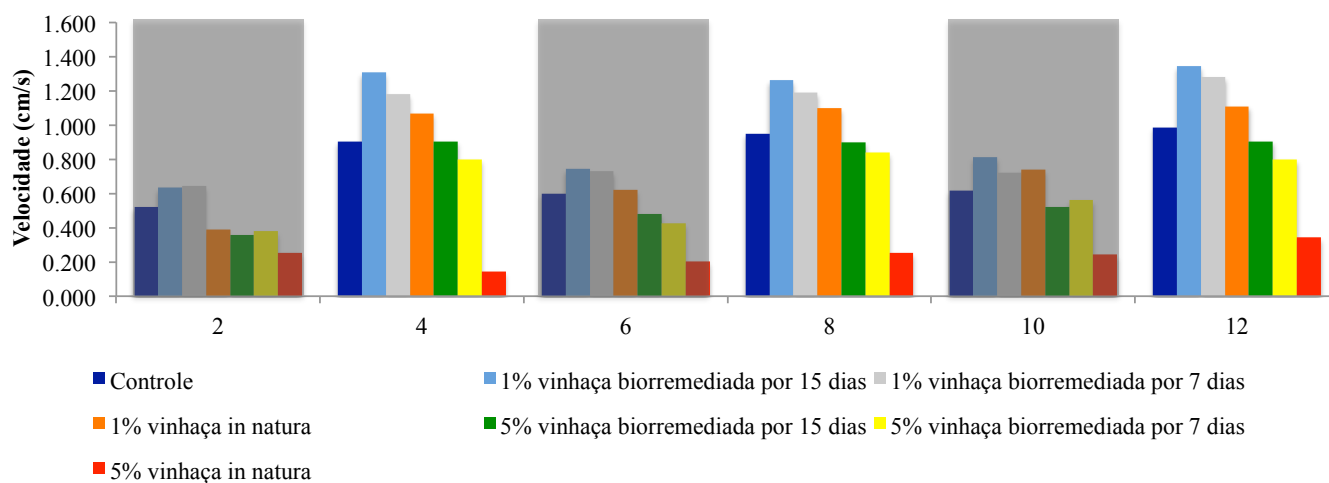


Figura 8: Velocidade média (cm/s) no período de 2 minutos (bioensaio 2). Áreas sombreadas representam os períodos de luz apagada.

6. CONCLUSÃO

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

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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

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

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

AL-SHAMSI, L.; HAMZA, W.; EL-SAYED, A-F. Effects of food sources on growth rates and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. **Aquatic Ecosystem Health & Management**, Vol. 9, Iss. 4, 2006.

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

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

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

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

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

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

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

Amphipoda) exposed to silver. **Aquatic Toxicology**, v. 142-143, p. 73–84, 2013.

ARORA, A.; SETH, A.; DIEN, B.S.; BELYEA, R.L.; SINGH, V.; TUMBLESON, M.E.; RAUSCH, K.D. Microfiltration of thin stillage: Process simulation and economic analyses. **Biomass and Bioenergy**, n. 35, p. 113–120, 2011.

ATEEQ, B.; ABUL FARAH, M.; NIAMAT ALI, M.; WASEEM, A. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. v. 518, p. 135–144, 2002.

BAILLY Y.; DUNEL-ER S.; LAURENT P. The neuroepithelial cells of the fish gill filament indolamine immunocyto chemistry and innervation. **Anatomical Record**, v. 233, p. 143–61, 1992.

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

BERNET, D.; SCHMIDT-POSTHAUS, H.; WAHLI T.; BURKHARDT-HOLM, P. Evaluation of two monitoring approaches to assess effects of waste water disposal on histological alterations in fish. **Hydrobiologia**, v.524, p.53–66, 2004.

BEZBARUAH, A.N.; ZHANG, T.C. pH, redox, and oxygen microprofiles in rhizosphere of bulrush (*Scirpus validus*) in a constructed wetland treating municipal wastewater. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 60–70, 2004.

BIDOIA, E.D.; CORREIA, J.E.; PRACHNOU, E.L.S.; AZEVEDO, G.O.; SHIMIZU, F.L. **Tratamentos de águas de abastecimento e residuárias**. Joinville: Clube de Autores Publicações S/A. 2016.

BIRNIE-GAUVIN, K.; CONSTANTINI, D.; COOKE, S. J.; WILLMORE, W. G. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. **Fish and Fisheries**, n. August 2016, p. 1–15, 2017.

BITAR, A.L. Utilização de protótipos para simulação de sistema construído de áreas alagadas (constructed wetland) para tratamento de efluentes de pesque- pague. 2006. 125f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

BLANCHETTE, B., FENG, X., SINGH, B.R. Marine glutathione S-transferases. **Marine Biotechnology**, v. 9, p. 513–542, 2007.

BNDES – Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social e CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro, Brasil: BNDES; 2008.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M.F. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: Comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 52, p. 5195–5200, 2004.

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

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

BRITO, L. T. Análise de brânquias de peixes expostos às águas de ambiente lântico. Trabalho de conclusão de curso (TCC). UNESP – IB – Rio Claro/SP, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LAURENT, P.; HOBE, H.; DUNEL-ERB, S. The role of environmental sodium chloride relative to calcium in gill morphology of freshwater salmonid fish. **Cell and Tissue Research**, v. 240, p. 675-692, 1985.

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

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

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

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

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

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

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

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

MALLAT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 42, p. 630-648, 1985.

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

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

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

MARINHO, J.F.U.; CORREIA, J.E.; MARCATO, A.C.C.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C.S. Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 110C, p. 239–245. 2014.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ROSETY-RODRÍGUEZ, M.; ORDOÑEZ, F. J.; ROSETY M.; ROSETY, J. M.; ROSETY, I.; RIBELLES, A.; CARRASCO, C. Morpho-histochemical Changes in the Gills of Turbot, *Scophthalmus maximus* L., Induced by Sodium Dodecyl Sulfate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.51, p.223-228, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

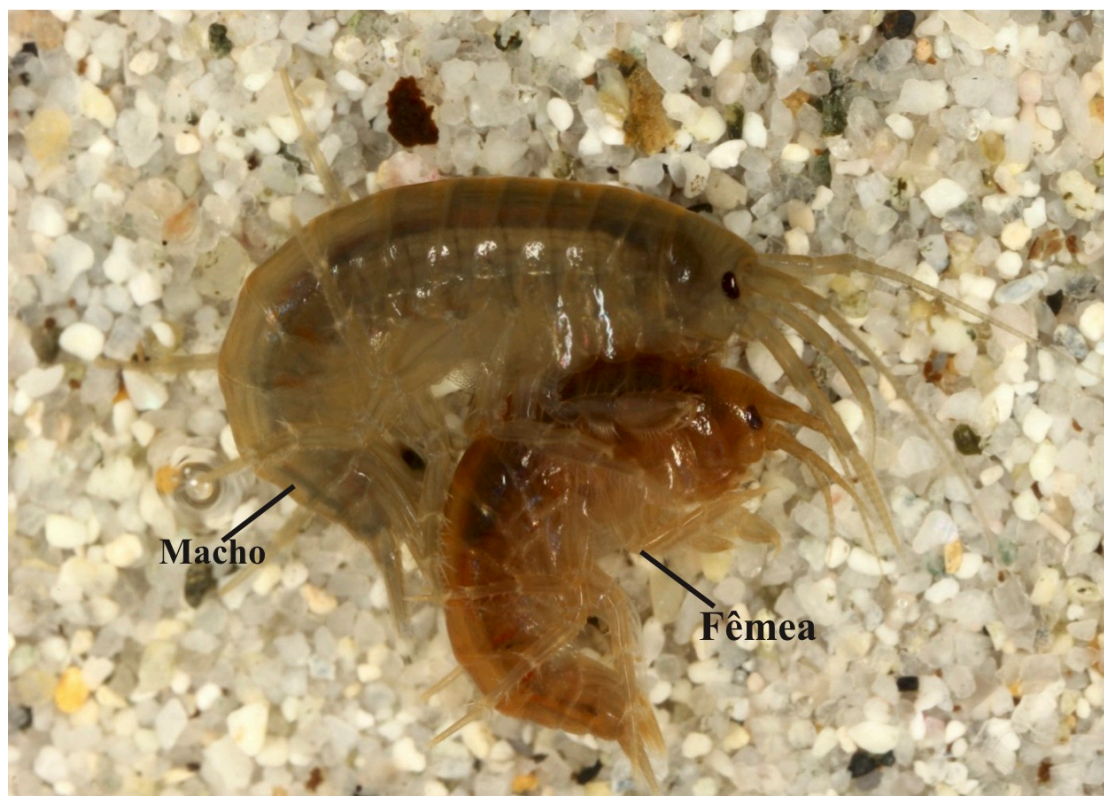


Figura 1: Casal de anfípoda *Gammarus pulex* no momento de cópula (adaptado de GRAF, F., 2007).



Figura 2: Macrófita aquática flutuante *Eichhornia crassipes* sendo utilizada no sistema híbrido de tratamento.

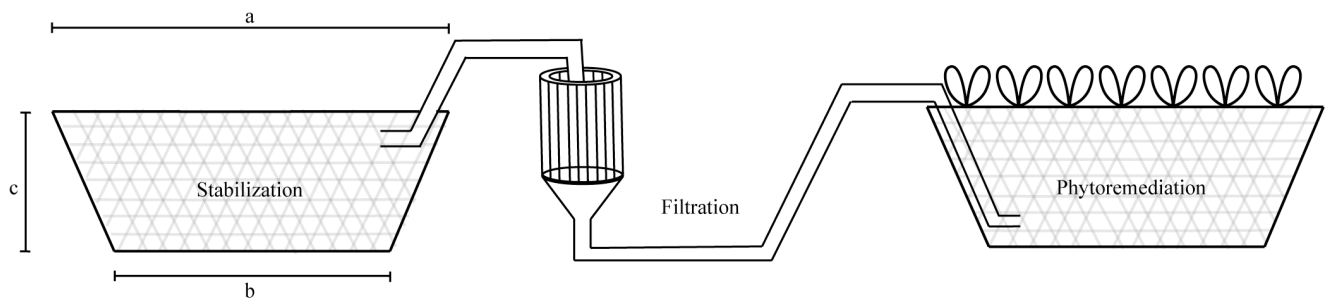


Figura 3: Sistema Híbrido de Tratamento em escala de mesocosmo (Marcato et al., 2019).