


---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**Júlia Fernanda Urbano Marinho**

**Avaliação da toxicidade da vinhaça por  
meio da análise histológica de fígados de  
peixes *Oreochromis niloticus***



Rio Claro  
2013

**Júlia Fernanda Urbano Marinho**

**Avaliação da toxicidade da vinhaça por meio da análise histológica de fígados de peixes *Oreochromis niloticus***

**Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti**

**Co-orientador: Janaína Pedro-Escher**

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

Rio Claro  
2013

574.82 Marinho, Julia Fernanda Urbano  
M338a Avaliação da toxicidade da vinhaça por meio da análise  
histológica de fígados de peixes *Oreochromis niloticus* / Julia  
Fernanda Urbano Marinho. - Rio Claro, 2013  
57 f. : il., figs., tabs.

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

Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti  
Coorientador: Janafna Pedro-Escher

1. Histologia. 2. Resíduo agroindustrial. 3. Cana-de-açúcar.  
4. Poluição aquática. I. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Bete e Marinho, com carinho.

“A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais voltará ao seu tamanho original.”

**(Albert Einstein)**

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos às instituições:

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por acreditar no meu trabalho e conceder-me a bolsa de estudos (Processo 2011/06845-7).

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, por ter me acolhido excepcionalmente ao longo dos meus cinco anos de graduação.

Ao Instituto de Biociências e Laboratório de Histologia pelo suporte e apoio indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos Gerson, Pablo, Antônio e Mônica, pela ajuda imprescindível ao longo desta pesquisa e pelos bons momentos de descontração.

Meus agradecimentos carinhosos à minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti, por todo o apoio (profissional e psicológico!) ao longo destes anos de parceria. Agradeço pelo privilégio de trabalhar ao seu lado, um exemplo de profissional e de mulher que levarei pra vida toda.

A todos os “fofoletes”, querido grupo de pesquisa que tenho muito orgulho de fazer parte. Obrigada por tornarem meu dia a dia (e muitas vezes noite) mais divertido! Um obrigada especial pela ajuda e apoio com meus experimentos, mesmo nos momentos mais difíceis pra mim.

Aos meus pais, Bete e Marinho, por todo o suor derramado para que eu chegasse até aqui. Agradeço o carinho, o amor incondicional, a companhia nos finais de semana, as ligações telefônicas diárias... Agradeço também todas as cartas enviadas pelo meu pai, semana após semana, ao longo dos meus cinco anos de faculdade, para que a distância nunca nos separasse. Agradeço aos eternos mimos da minha mãe, que nunca mediu esforços pra me ver com um sorriso no rosto. Devo a vocês todas as minhas conquistas. Amo vocês!

À minha vó Elza, querida e amada de uma maneira inexplicável. Agradeço por todas as vezes que fez da minha estadia em Rio Claro a melhor possível, sendo com um presentinho pra minha casa, com uma ajudinha na minha bagunça ou com a companhia nas viagens. Te amo muito!

A toda a minha família pelo carinho. Em especial às minhas irmãs, Cró e Carlinha, e minha prima querida Bibi, mulheres incríveis que me inspiram.

Ao meu namorado e companheiro de todos os momentos, Rafael. Não agradeço somente pelo amor e carinho doados ao longo desses quatro anos e meio de namoro, mas também por sempre cuidar de mim e me fazer rir, por todos os momentos épicos que

passamos juntos e por milhões de outras coisas! Um obrigada muito especial por me ensinar com muita paciência e dedicação tudo o que você aprendeu durante dez anos de estudos celulares e morfológicos. Obrigada também pelas contribuições e pitacos dados neste trabalho, os quais foram essenciais para que eu pudesse me orgulhar do que realizei até hoje. Você é um exemplo de profissional e ser humano, no qual me inspiro diariamente. Espero ter você comigo por toda a vida, te amo!

A todas minhas companheiras “formiguinhas”, em especial Baby, Nô e Mari. Obrigada pelo dia a dia mega divertido na nossa casa, que me motivaram na minha caminhada. Agradeço pelas risadas (e quantas!), fofocas, conversas jogadas fora, conselhos, jantas, almoços, café da tarde com bolinho de chuva, luau na mesa de jantar... E por nunca me negarem um ombro pra chorar nos momentos ruins. Tenho muita sorte de poder morar com as melhores companheiras e amigas que alguém poderia desejar.

A todo o CBI 2009, por ser a melhor sala que a UNESP já viu. Em especial, aos amigos queridos Jorge, Boi, Gabi, Rê, Day, Baby, Ana e Fininho, por tornarem até mesmo as aulas mais chatas o melhor lugar pra ver quem a gente gosta. Também à Dé, Rodrigo, Nelore, Bia e Henrique, por todas as jogatinas, comilanças e amizade. Aos queridos amigos de infância e adolescência que levo no coração para todos os lugares: Kamila, Rana, Ligia, Cami, Mands, Fê, Lea, Deco, Leka, Luchiari, Paschoal, Everton e Tigu. A todos os outros amigos que não foram mencionados, mas que se considerem no direto de estar aqui.

Aos projetos de extensão dos quais fiz parte: SEBio, PRO-CDA e Bio Logus Jr., pela vivência, experiências indescritíveis e bons momentos ao longo destes anos. Agradeço também os amigos que fiz nestes grupos e que levo com muito carinho comigo.

A Deus, por sempre me iluminar e me dar forças.

Por fim, meu agradecimento especial à Rachel Campos, minha professora de biologia e amiga, que me inspirou a escolher a profissão que opto por seguir com tanta paixão. Obrigada!

## RESUMO

Os ecossistemas aquáticos são os principais receptores de substâncias tóxicas provenientes de atividades humanas. Com o crescimento da produção de cana-de-açúcar no Brasil, a vinhaça – principal resíduo da produção de álcool – destaca-se como um potencial contaminante dos recursos hídricos, uma vez que sua riqueza em matéria orgânica lhe confere um alto poder poluente. Desta maneira, este estudo procurou avaliar a toxicidade da vinhaça por meio da análise de fígados de peixes *Oreochromis niloticus*, expostos a diferentes diluições de vinhaça em dois bioensaios laboratoriais. Porções dos fígados foram coletadas e fixadas para serem analisadas por meio de técnicas histológica e histoquímicas para detecção de proteínas totais, polissacarídeos e lipídios. Na análise histológica, os grupos tratados com vinhaça apresentaram alterações estatisticamente significativas observadas nos dois bioensaios, como perda da integridade citoplasmática, perda de limite celular e desorganização do tecido. Os padrões proteicos e lipídicos não apresentaram alterações. A análise para detecção de polissacarídeos mostrou maior acúmulo desse elemento nos animais expostos ao tratamento com menor concentração de vinhaça, com intensidade gradativamente menor nas maiores diluições. Este fato pode ser devido ao alto teor de matéria orgânica presente na vinhaça e à alta concentração de cromo no efluente, como uma resposta direta à toxicidade. Concluiu-se, portanto, que a vinhaça possui potencial tóxico e citotóxico dose-dependente em corpos d'água e que o fígado constitui um órgão bastante afetado quando em exposição aguda a este contaminante.

**Palavras chave:** resíduo agroindustrial, cana-de-açúcar, poluição aquática.

## ABSTRACT

Aquatic ecosystems are the main receptors of toxic substances from human activities. With the increase in sugarcane production in Brazil, vinasse – the main residue of ethanol production – is a potential contaminant of water resources, due to its high organic matter content. This study was aimed at evaluating the toxicity of vinasse by examining the liver of the fish *Oreochromis niloticus* exposed to different dilutions of vinasse in two laboratory bioassays. Portions of liver were collected and fixed for histological and histochemical techniques to detect total proteins, polysaccharides, and lipids. In the histological analysis, the groups treated with vinasse exhibited significant alterations, such as loss of cytoplasmic integrity and cell boundaries, and tissue disorganization. Protein and lipid profiles were not altered. Higher accumulation of polysaccharides was detected in fish exposed to lower concentrations of vinasse, with a gradual decrease in animals treated with vinasse in higher concentrations. This may be due to the high organic matter content and the high concentration of chromium in vinasse, as a direct response to toxicity. We concluded that vinasse has a dose-dependent toxic and cytotoxic potential in water bodies and that the liver is strongly affected when acutely exposed to this contaminant.

**Keyword:** agroindustrial residue, sugarcane, aquatic pollution.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Vinhaça como Contaminante .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Peixes como Bioindicadores .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3 O Fígado nos Teleósteos .....</b>	<b>15</b>
<b>2.4 Histopatologia do Fígado como Biomarcador da Poluição Aquática .....</b>	<b>16</b>
<b>3 OBJETIVO.....</b>	<b>19</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1 Material .....</b>	<b>20</b>
<i>4.1.1 Material biológico.....</i>	<i>20</i>
<i>4.1.2 Vinhaça como substância tóxica.....</i>	<i>20</i>
<b>4.2 Metodologia .....</b>	<b>20</b>
<i>4.2.1 Análise físico-química da vinhaça .....</i>	<i>20</i>
<i>4.2.2 Bioensaio com O. niloticus.....</i>	<i>21</i>
<i>4.2.3 Dissecção dos animais .....</i>	<i>21</i>
<i>4.2.4 Técnica para análise histológica.....</i>	<i>21</i>
<i>4.2.5 Histoquímica.....</i>	<i>22</i>
<i>4.2.6 Documentação e interpretação dos resultados .....</i>	<i>23</i>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Neste limiar do século XXI, o agronegócio tem se destacado como um setor muito forte em nosso país, principalmente por sua natureza exportadora. Como consequência, tem se tornado um dos setores da economia que mais causa impacto ambiental, dado a necessidade de grandes porções de terras, uso excessivo de agrotóxicos e pesticidas, bem como a geração de grande quantidade de resíduos, os quais podem conter elementos e substâncias potencialmente poluidoras (RIBEIRO et al., 2007; UNICA, 2007).

Sabendo que cada efluente possui propriedades e impactos específicos na biota, é imprescindível avaliar sua contribuição à contaminação ambiental. Neste sentido, o manejo e a disposição de resíduos agroindustriais têm merecido destaque nos dias atuais, frente ao despejo inadequado e indiscriminado de muitos efluentes no meio ambiente (SRIVASTAVA; SAHAI, 1987). Dentro deste contexto, um agrosíduo pouco estudado é a vinhaça.

A vinhaça é um subproduto, principalmente da indústria sucroalcooleira, geralmente ácido (pH 3,5-5), de coloração castanho-escuro, de odor incômodo para a espécie humana e com alto conteúdo orgânico (WALISZEWSKI et al., 1997; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011), caracterizada como efluente com alto poder poluente e alto valor fertilizante. 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, elevada corrosividade e altos índices de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), além de elevada temperatura na saída dos destiladores. 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). Por outro lado, a vinhaça apresenta grande potencial para utilização em solos agrícolas, principalmente na forma de fertirrigação (PEDROSA et al., 2005).

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).

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

Ademais, a histopatologia aplicada em peixes como biomarcadora de poluição aquática foi revista por Hinton et al. (1992), os quais estabeleceram que a relação entre danos em peixes e poluição ambiental poderia ser fornecida por meio da histologia do fígado.

De maneira geral, o fígado dos peixes é constituído por células do parênquima hepático, que são os tipos celulares dominantes e apresentam forma variável, de oval a polígonos irregulares; estão concentricamente arranjados ao redor de capilares sanguíneos (sinusóides) formando os cordões de hepatócitos. Estas células possuem núcleos geralmente esféricos, um abundante retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias, que lhes conferem uma alta atividade metabólica e biossintética (HEATH, 1995; TAKASHIMA; HIBIYA, 1995).

Nos peixes, as células hepáticas possuem diversas funções vitais, como a metabolização de proteínas, lipídios e carboidratos, processamento e armazenamento dos nutrientes absorvidos no trato digestivo, atuam na desintoxicação do organismo e na hematopoese durante a fase larval, além de estarem envolvidos na produção de anticorpos (VERLAG, 1982; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

De acordo com Hinton e Lauren (1990), existem muitas razões para selecionar o fígado como um importante órgão em estudos de toxicologia. Este é o primeiro órgão a atuar na biotransformação de xenobiontes e excreção de alguns metais pesados; atua na estocagem de carboidratos (glicogênio) e, especialmente em peixes, acumulam lipídios.

Assim, muitos dos danos hepáticos podem ser causados devido às toxinas acumuladas pelo fígado, consequência do processo de desintoxicação de xenobióticos, que ao causarem a degeneração dos hepatócitos acabam por limitar as funções vitais do fígado, prejudicando o organismo como um todo (SIMONATO et al., 2008; JIRAUNGKOOSKUL et al., 2002). Por isso, diversas alterações histológicas são

comumente observadas em estudos de toxicidade (YILDIRIM et al., 2006; FIGUEIREDO-FERNANDES et al., 2007a).

A resposta à toxicidade resulta também em uma rápida mobilização de reservas energéticas, como alterações nos níveis de proteínas plasmáticas e de glicogênio hepático, que permitem ao organismo atender ao aumento na demanda energética durante a exposição a fatores estressantes (MARTINEZ; CÓLUS, 2002). Essas alterações são consideradas respostas típicas ao estresse, como um mecanismo adaptativo que disponibiliza energia ao organismo para responder a esses fatores (WENDELAAR BONGA, 1997).

Segundo Junqueira e Carneiro (2004), o fígado armazena lipídios e carboidratos na forma de triglicerídeos e glicogênio, respectivamente, sendo esta capacidade de armazenar metabólitos importante, porque supre o organismo de substratos energéticos no período entre refeições. Como observado em estudos recentes de histopatologia em peixes (PEREIRA, 2009), indivíduos expostos a ambientes poluídos podem apresentar uma diminuição na concentração do glicogênio hepático; isto revela o recrutamento deste nutriente para o combate contra a intoxicação. Além disso, com a deteriorização dos hepatócitos, pode haver uma diminuição em sua capacidade de armazenamento de nutrientes. Um aumento no tamanho dos hepatócitos também foi observado na histologia qualitativa de tilápias expostas ao cobre, devido ao alto teor de lipídios (FIGUEIREDO-FERNANDES, 2007a).

Além disso, alterações nos níveis de proteínas do fígado também são observadas. Em situações de toxicidade, pode ocorrer uma concentração protéica no entorno dos vasos sanguíneos hepáticos, devido à alta atividade das células próximas aos vasos, que acabam por entrar em contato com as toxinas mais rapidamente do que as células que se encontram no interior do tecido. Por isso, observa-se uma vacuolização mais rápida dos hepatócitos mais próximos aos grandes vasos, indicando toxicidade (PEREIRA, 2009).

Neste sentido, diante da ampla contaminação dos recursos hídricos por resíduos industriais e do destaque da produção de cana-de-açúcar no país, faz-se necessária a verificação do real potencial tóxico da vinhaça em organismos de ambiente aquático. Assim sendo, o uso de bioensaios em tilápias possibilitará o estudo dos efeitos tóxicos deste poluente, sem a influência das variáveis ambientais. Além disso, o fígado possui elevada capacidade de acumular contaminantes, tornando a histopatologia deste órgão um excelente biomarcador de poluição aquática.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Vinhaça

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo, com cerca de 5 milhões de hectares de área cultivada, seguido por Índia, China, Tailândia, México, Quênia e Paquistão. De acordo com o último censo realizado, desde o início da safra 2011/2012 foram processadas 492,70 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, gerando um volume de 12,71 bilhões de litros de etanol hidratado (CANAOESTE, 2012).

Apesar da riqueza que o setor canavieiro gera, este apresenta problemas relacionados desde o processo do plantio até a colheita da cana (ALVARENGA; QUEIROZ, 2009). Neste contexto, um dos pontos mais críticos e pouco discutidos a respeito dos impactos negativos da cana-de-açúcar, diz respeito a um subproduto do etanol: a vinhaça. A vinhaça é o produto de calda na destilação do licor de fermentação do álcool de cana-de-açúcar. É um líquido residual, também conhecido regionalmente por restilo, vinhoto, mosto, dunder ou garapão (WILKIE et al., 2000; CAMARGO et al., 2009; GIANCHINI; FERRAZ, 2009). É produzida em muitos outros países como subproduto do álcool, uma vez que a matéria-prima pode variar: cana-de-açúcar na América do Sul, beterraba, vinho e frutas na Europa, milho na América do Norte (GIANCHINI; FERRAZ, 2009). Assim sendo, a vinhaça apresenta diferentes propriedades. Uma revisão recente sobre as diferentes composições da vinhaça e tratamentos disponíveis foi realizada por España-Gamboa et al. (2011). De acordo com os autores, as características da vinhaça dependem da matéria-prima (biomassa) utilizada para a produção do etanol.

De acordo com Camargo et al. (2009), os primeiros estudos para a aplicação da vinhaça nos solos, no Brasil, datam da época de 1950 e foram realizados pela Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz (ESALQ). Seu uso como fertilizante, por meio da fertirrigação, se tornou frequente entre as usinas a partir da década de 80. A adoção da prática de fertirrigação consiste na infiltração da vinhaça *in natura* no solo, por meio da irrigação das culturas de cana-de-açúcar (CAMARGO et al., 2009).

O uso da vinhaça por meio da fertirrigação constitui uma tecnologia que propõe usar de forma racional os recursos naturais, impedindo que a vinhaça seja lançada nos rios, possibilitando a fertilização dos solos agricultáveis (GIANCHINI; FERRAZ, 2009).

No entanto, de acordo com vários autores, o despejo direto da vinhaça no solo pode causar sua salinização, a lixiviação dos metais presentes no solo para às águas subterrâneas, alterações na qualidade do solo devido ao desbalanceamento dos nutrientes, redução da alcalinidade e perda das culturas e aumento da fitotoxicidade. (AGRAWAL; PANDEY, 1994).

## **2.2 Peixes como Bioindicadores**

Os peixes são ecologicamente e economicamente muito importantes. Eles representam um grupo de vertebrados com diversos comportamentos e estratégias reprodutivas, além de desempenhar importante papel na cadeia alimentar, quer como predadores ou como presas. Embora nem sempre sejam considerados os organismos aquáticos mais sensíveis aos estressores químicos, possuem ampla variação de comportamento e habitat, que aumentam seu potencial para a exposição a substâncias tóxicas (RAND, 2008; FRANÇA, 2009).

Peixes acumulam poluentes diretamente de águas contaminadas ou indiretamente pela ingestão de organismos contaminados, uma vez que desempenham diferentes papéis na cadeia trófica, sendo capazes de bioacumular contaminantes dissolvidos na água (MINISSI et al., 1997). Por isso, os peixes são excelentes modelos para avaliação do ecossistema aquático e para realização de estudos toxicológicos como um todo, podendo sinalizar o potencial perigo de novas substâncias químicas ou a possibilidade de poluição ambiental (STREIT, 1998).

Segundo Van Dick (2003), os peixes são organismos relativamente sensíveis a mudanças em seu ambiente, incluindo o aumento da poluição. Assim, o estado de saúde dos peixes é capaz de refletir e dar uma boa indicação da condição de um ecossistema aquático. Além disso, existe extensa literatura sobre seu comportamento, fisiologia e requerimentos ambientais, que os tornam relevantes como grupo de organismos testes para avaliar os efeitos biológicos de substâncias tóxicas (RAND, 2008). Neste sentido, são frequentes os estudos toxicológicos utilizando-se diferentes espécies de peixes como bioindicadores de poluição aquática (ARELLANO et al., 2004; COUTINHO; GOKHALE, 2000; FONTANETTI et al., 2010).

A “tilápia do Nilo”, *Oreochromis niloticus*, é um peixe de água doce, onívoro, de origem africana (STARLING, 1998); a principal característica que distingue a

espécie é a presença de listras verticais por todo comprimento da nadadeira caudal (COSTA-PIERCE, 2003).

Foi introduzida no Brasil pelo Centro de Pesquisas Ictiológicas do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS), em 1971, com a finalidade de ingerir o lodo que se acumulava nas estruturas das usinas hidroelétricas, limpando-as. Quando essa fonte alimentar se esgotava, as tilápias passavam a explorar outras fontes de alimentos se adaptando com sucesso no ambiente, muitas vezes prejudicando espécies endêmicas ali residentes (RODRIGUES, 1994; TANAKA, 2001).

A espécie apresenta o corpo alto e comprimido lateralmente, cobertos por escamas e de coloração clara com faixas transversais escuras. A boca é terminal, os olhos laterais e apresentam linha lateral dividida (NELSON, 2002). As nadadeiras possuem coloração clara, sendo a caudal com pintas escuras unidas entre si formando listas transversais; as nadadeiras dorsal e anal apresentam espinhos (RODRIGUES, 2009).

Várias espécies de tilápia estão sendo utilizadas com sucesso para fins de criação, sendo que as três mais cultivadas são *O. niloticus*, *O. aureus* e *O. mossambicus*. A tilápia é criada em abundância no Brasil por apresentar elevado valor econômico. Por este motivo, é explorada atualmente em 22 estados brasileiros, excetuando-se apenas alguns da região Norte. Ademais, a espécie *O. niloticus* é a mais importante espécie de tilápia cultivada, representando mais de 80% da produção total de tilápias (MOUSA; MOUSA, 1999; AL-SHAMSI et al., 2006). Assim, a alta qualidade de sua carne faz dela um produto de grande interesse industrial e de boa aceitação pelo mercado consumidor (OSTRENSKY et al., 2000).

Além do interesse para a aquicultura, as tilápias estão sendo cada vez mais utilizadas em pesquisas biológicas, quer em estudos de monitoramento ambiental ou em bioensaios toxicológicos, principalmente por seu pequeno porte e por serem facilmente manipuláveis (HATANAKA et al., 1982; HOOVER, 1984; FIGUEIREDO-FERNANDES et al., 2007b). Além disso, Alves-Costa (2001) também considera que peixes dessa espécie são bons organismos bioindicadores, uma vez que as alterações decorrentes da sua exposição são facilmente detectadas. Por isso, inúmeros trabalhos vêm empregando tilápias em estudos de poluição aquática (FIGUEIREDO-FERNANDES et al., 2006; VAN DICK et al., 2007; BIAGINI et al., 2009). Neste sentido, Biagini et al. (2009) empregaram peixes *O. niloticus* em bioensaios

laboratoriais, de maneira a avaliar alterações histopatológicas em indivíduos expostos a águas poluídas, tratadas por flotação.

### 2.3 O Fígado nos Teleósteos

Todos os vertebrados possuem um fígado definido, sendo o órgão mais volumoso do corpo, ocupando sempre uma área considerável do abdômen (HILDEBRAND, 1995). Na organogênese, o fígado se desenvolve a partir de uma evaginação do tubo digestivo, no mesentério ventral, abaixo da parte anterior do intestino. 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, ductos biliares, tecido pancreático e centros melanomacrofágicos (HIBIYA, 1982).

No entanto, uma definição geral para a estrutura de um fígado que represente os peixes teleósteos está muito longe de ser alcançada, em parte pela enorme diversidade existente, com uma estimativa variando de 20.000 a 25.000 espécies (FIGUEIREDO-FERNANDES et al., 2007a). Com base nisso, Akiyoshi e Inoue (2004) realizaram um trabalho no qual foi avaliada a morfologia do fígado de 200 espécies de teleósteos como modelo para o estudo das relações filogenéticas entre os representantes desse grupo de vertebrados.

Podemos considerar, entretanto, a existência de dois tipos básicos de fígados de peixes: os que contêm tecido pancreático e aqueles que não contêm. Em certas espécies de peixes, como a tilápia (*O. niloticus*), o fígado se combina com o pâncreas de modo a formar o *hepatopâncreas*, com as células do pâncreas exócrino distribuídos no parênquima hepático ao redor das vênulas portais (MUNSHI; DUTTA, 1996). O pâncreas exócrino consiste de aglomerados de células piramidais principalmente organizadas em ácinos, como é observado em mamíferos. As células possuem citoplasma basófilo escuro, núcleos basais distintos e grandes grânulos de zimogênio, os quais contem enzimas responsáveis pela digestão de proteínas, carboidratos, gorduras e nucleotídeos (GENTEN et al., 2009). Em outras espécies, entretanto, o fígado pode ser encontrado completamente separado do pâncreas (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995;

GENTEN et al., 2009). Segundo Rotta (2003), a função do pâncreas dos peixes é bastante semelhante à dos mamíferos: secreta insulina e glucagon em resposta à absorção de nutrientes, além de enzimas digestivas e bicarbonato para o intestino.

De um modo geral, o parênquima do fígado está contido dentro de uma cápsula fina de tecido fibroconectivo, denominada cápsula de Glisson, e é composto principalmente de hepatócitos poliédricos normalmente com núcleos centrais, os quais podem ser em número de um ou dois. Sinusóides são alinhados com as células endoteliais, as quais possuem núcleos alongados e que sobressaem no lúmen sinusoidal. Além disso, o endotélio é fenestrado por pequenos poros. Células de Kupffer macrofágicas, por outro lado, não são encontradas em teleósteos, embora células capazes de ingerir partículas estranhas tenham sido descritas entre os hepatócitos de algumas espécies (Salmonidae). Ductos biliares também ocorrem dentro do parênquima hepático, de modo que canalículos biliares anastomosam-se para produzir ductos de diâmetro crescente. Os menores ductos do fígado são revestidos com uma única camada de células epiteliais cubóides, de modo que ductos maiores podem, ainda, incorporar tecido conjuntivo e musculatura magra (GENTEN et al., 2009).

Outra estrutura associada é a vesícula biliar, um saco contrátil com parede delgada e com a função de armazenamento temporário da bile, a qual é coletada pelos ductos biliares provindos do fígado. Quando conduzida ao lúmen do intestino, a bile efetua a emulsificação das gorduras e a neutralização da acidez do quimo; esses processos auxiliam na digestão e na absorção dos lipídios e das vitaminas lipossolúveis que entram no intestino (ROTTA, 2003).

Em geral, o fígado de peixes apresenta funções semelhantes ao de 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, albumina, e fatores do complemento (GENTEN et al., 2009).

## **2.4 Histopatologia do Fígado como Biomarcador da Poluição Aquática**

O uso de ferramentas biológicas capazes de revelar o modo de ação de compostos potencialmente poluidores em ambientes aquáticos está em expansão, uma vez que a conservação da água e a prevenção dos efeitos deletérios decorrentes de sua

contaminação são uma preocupação crescente. Por isso, o uso de biomarcadores morfológicos pode diminuir os riscos para a saúde humana e contribuir para o desenvolvimento de programas que visam preservar este ecossistema (FONTANETTI et al., 2012).

Estudos histológicos são capazes de revelar-se uma ferramenta eficaz para a determinação da saúde de populações de peixes, podendo refletir até mesmo a condição de ecossistemas aquáticos como um todo. Neste contexto, Hinton et al. (1992) assumem que os biomarcadores histopatológicos são valiosos como indicadores do estado geral de saúde do peixe, refletindo os efeitos da exposição a uma variedade de poluentes antropogênicos.

A sua principal vantagem reside na capacidade de integrar os efeitos dos fatores abióticos, tais como substâncias químicas e temperatura, e de fatores bióticos, como agentes patogênicos que afetem a função de órgãos e a saúde do peixe (HANDY et al., 2002; ZIMMERLI, 2007).

Além do mais, a análise histológica constitui um parâmetro muito sensível para o estudo patológico em peixes, sendo crucial para determinar as alterações celulares que podem ocorrer em órgãos-alvos, tais como brânquias, fígado e gônadas (DUTTA, 1996). Segundo Figueiredo-Fernandes et al. (2007a), a monitorização 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).

Assim, a exposição a agentes tóxicos pode causar alterações histológicas no fígado, que por este motivo pode ser utilizado como biomarcador para indicar contato prévio com tais substâncias. Embora o fígado tenha a capacidade de degradar compostos tóxicos, seus mecanismos de regulação podem ser sobrecarregados por concentrações elevadas destes produtos, resultando, conseqüentemente, em danos na estrutura do órgão (HINTON; LAUREN, 1990; VAN DICK, 2003). A histologia de fígados de peixes pode, portanto, servir como um modelo para o estudo das interações entre fatores ambientais – como biotoxinas, parasitas, poluentes – e as estruturas hepáticas, bem como suas funções (BRUSLÉ; GONZALEZ, 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).

### **3 OBJETIVO**

O presente trabalho teve como objetivo verificar, qualitativamente e semiquantitativamente, o possível potencial tóxico e citotóxico da vinhaça, por meio de análises histológicas e histoquímicas em fígados de tilápias (*O. niloticus*) expostas a este resíduo.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Material**

#### ***4.1.1 Material biológico***

Para este estudo, 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 10 cm, para evitar diferenças intra-específicas relacionadas ao tamanho e idade dos peixes. Os espécimes, oriundos de piscicultura (UNESP – Campus de Rio Claro), foram aclimatados em tanque.

O presente projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências da UNESP Rio Claro, com nº de protocolo 2866.

#### ***4.1.2 Vinhaça como substância tóxica***

As amostras de vinhaça de cana-de-açúcar foram coletadas na Usina Santa Lúcia, localizada na cidade de Araras – SP, provenientes de duas safras distintas (safras 2010 e 2011). Esse efluente foi mantido em câmara fria (4°C), no Departamento de Bioquímica e Microbiologia da UNESP de Rio Claro, até o início dos experimentos.

### **4.2 Metodologia**

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

Foram realizadas análises físico-químicas do efluente, por laboratório especializado (TASQA Serviços Analíticos Ltda. – Paulínia/SP), para determinação mais precisa de sua composição. Foram mensurados os parâmetros: pH, condutividade elétrica, dureza, resíduo não filtrável total, nitrogênio nitrato e nitrito, nitrogênio Kjeldahl, amônia, cálcio, enxofre total, fosfato total, magnésio, potássio, sódio, sulfato, DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), DQO (Demanda Química de Oxigênio) e metais (Arsênio, Bário, Cádmio, Chumbo, Cobre, Cromo, Mercúrio, Molibdênio, Níquel, Selênio e Zinco).

#### **4.2.2 Bioensaio com *O. niloticus***

Os bioensaios foram montados em aquários com capacidade de 40 litros. Em cada aquário, foram dispostos cinco peixes já aclimatados (machos e fêmeas, distribuídos aleatoriamente), no qual permaneceram 96 horas, a temperatura ambiente de aproximadamente 24°C, com sistemas de filtragem e aeração.

Em cada aquário houve um tratamento, como segue:

- Aquário 1: Controle com água limpa proveniente de poço artesiano;
- Aquário 2: Concentração de 1% de vinhaça;
- Aquário 3: Concentração de 5% de vinhaça;
- Aquário 4: Concentração de 10% de vinhaça.

No segundo bioensaio (safra 2011) foram utilizadas as mesmas concentrações, acrescida da diluição 2,5% de vinhaça, para que se pudessem obter maiores resultados, por conta da mortalidade dos peixes submetidos aos tratamentos de 5% e 10% de vinhaça no primeiro bioensaio (safra 2010).

A escolha dos valores de diluições (1%, 5% e 10%) tem como base estudos anteriores de Algur e Kadioglu (1992), os quais utilizaram concentrações similares de vinhaça para analisar seu efeito nas plantas *Pisum sativum* e *Helianthus annuus*, e de Kumar e Gopal (2001), os quais também utilizaram estas diluições de vinhaça em bioensaios com os peixes de água doce *Channa punctatus*.

#### **4.2.3 Dissecção dos animais**

Decorrido o tempo de exposição de 96 horas, os espécimes de *O. niloticus* foram retirados dos aquários, anestesiados com benzocaína (0,1g de benzocaína em 1 mL de álcool etílico para cada 100 mL de água deionizada), eutanaziados com espinhalamento por tesoura cirúrgica e dissecados em solução fisiológica. Em seguida, o fígado foi fixado em solução Bouin ou formol cálcio (de acordo com a técnica de coloração a ser empregada) permanecendo no fixador por pelo menos 2 horas.

#### **4.2.4 Técnica para análise histológica**

Após fixação, os fragmentos de fígado foram transferidos para solução tampão de fosfato de sódio, onde permaneceram por pelo menos 24 horas, e depois foram

desidratados em solução de etanol a 70, 80, 90 e 95%. Em seguida, foram submetidos à resina de embebição (Leica Histo-resin – Embedding Kit), por 24 horas, em geladeira. Posteriormente, o material foi transferido para moldes plásticos contendo resina de inclusão. Os blocos foram cortados com auxílio de micrótomo Leica. Os cortes foram então corados por Hematoxilina/Eosina ou ainda submetidos a técnicas histoquímicas.

#### **4.2.5 Histoquímica**

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

##### **A. Polissacarídeos**

Dois técnicas foram utilizadas para a observação de polissacarídeos: PAS (Ácido Periódico Schiff), para a detecção de polissacarídeos neutros, e a coloração simultânea por PAS + azul de Alcian, para detecção, também, de polissacarídeos ácidos. O material foi fixado em solução Bouin. No método PAS foi necessária à 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 do 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 foram submetidas ao reativo de Schiff, de modo semelhante à técnica de PAS (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

##### **B. Proteínas Totais**

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

##### **C. Lipídios**

Para a detecção de lipídios foram realizadas duas técnicas diferentes, sudan black B (lipídios totais) e azul do Nilo (lipídios ácidos). Na técnica de sudan black B, o

material foi fixado em formol cálcio. As lâminas foram imersas em solução de sudan black B a 1%, dissolvido em álcool 70%, por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas em água destilada, secas e montadas com gelatina glicerinada (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). Para a técnica de azul do Nilo, o material foi fixado em formol cálcio. 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, foram secas e montadas com gelatina glicerinada (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

#### ***4.2.6 Documentação e interpretação dos resultados***

A análise dos materiais foi realizada em microscópio de luz nas objetivas de 10, 40 e 100x. Foram analisadas duas lâminas com oito cortes de 6 µm para cada peixe, sendo n=5 para cada um dos bioensaios. Assim, foram analisados um total de 60 lâminas e 480 cortes histológicos para cada técnica realizada, por bioensaio. Os resultados obtidos foram fotografados em fotomicroscópio, fazendo-se uso de programa próprio para captura de imagens – Leica Qwin Standard v. 2.8. Os resultados encontrados no controle e nos tratamentos foram comparados entre si e entre os resultados do primeiro bioensaio.

A descrição e a avaliação das alterações histopatológicas tiveram como base o protocolo padronizado de Bernet et al. (1999). Este foi adaptado pelo grupo de pesquisa da professora Carmem S. Fontanetti Chistofolletti para a análise semiquantitativa das principais alterações histopatológicas encontradas nos fígados de tilápias expostas à contaminantes, o qual encontra-se sintetizado na Tabela 1.

Um fator de importância ( $w$ ) é definido para cada lesão, de acordo com sua importância patológica, ou seja, como isso afeta a função do órgão e a capacidade de sobrevivência dos peixes. As alterações são previamente classificadas em três fatores de importância: (1) Importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível quando a exposição ao irritante termina; (2) Importância patológica moderada, a lesão é reversível na maioria dos casos, quando o estressor é neutralizado; e (3) Importância patológica acentuada, a lesão é geralmente irreversível, levando à perda parcial ou total da função do órgão.

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

	<b>Características</b>	<b>Fator de Importância (w)</b>
<b>Hepatócitos</b>	Hipertrofia/ Degeneração hidrópica	2
	Atrofia	2
	Perda de limite celular	3
	Núcleo picnótico	3
	Hipertrofia do núcleo	2
	Esteatose macrovesicular	1
	Esteatose microvesicular	1
	Citoplasma vacuolizado	1
	Citoplasma claro/lavado	3
	Acúmulo de proteínas	1
	Acúmulo de polissacarídeos	1
<b>Tecidos Intersticiais (hepatopâncreas, sinusóides, espaço intercelular)</b>	Sinusóides dilatados	1
	Eritrócito com citoplasma degradado	2
	Acúmulo de proteínas	1
	Acúmulo de polissacarídeos	1
	Esteatose macrovesicular	1
	Esteatose microvesicular	1
	Edema intercelular	1
<b>Parênquima Hepático (órgão como um todo)</b>	Desorganização do tecido	2
	Hiperplasia	2
	Necrose	3
	Tumor	3

Fonte: elaborada pelo autor

Foi desenvolvida, então, uma tabela própria para o presente estudo (Tabela 2), com as principais alterações encontradas nos fígados dos peixes expostos à vinhaça.

**Tabela 2** - Principais alterações encontradas em fígado de *O. niloticus* expostos à vinhaça e seus respectivos fatores de importância

	<b>Características Analisadas</b>	<b>Fator de Importância (w)</b>
<b>Hepatócitos</b>	Hipertrofia/ Degeneração hidrópica	2
	Atrofia	2
	Núcleo picnótico	3
	Citoplasma vacuolizado	1
	Citoplasma claro/lavado	3
	Perda de limite celular	3
	Acúmulo de polissacarídeos	1
<b>Tecido Intersticial</b>	Sinusóides dilatados	1
<b>Parênquima Hepático</b>	Desorganização do tecido	2

Fonte: elaborada pelo autor

Para melhor compreensão dos resultados, as anomalias histopatológicas descritas são também 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 também podem ser considerados.

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

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

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 através do teste Mann-Whitney em níveis de 5% e 1% de significância, utilizando-se o programa Bioestat - versão 5.3.

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

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados serão apresentados na forma de um artigo científico, o qual será submetido para publicação em revista especializada na área.

## ARTIGO CIENTÍFICO

VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR EM CORPOS D'ÁGUA: IMPACTO  
ANALISADO PELA HISTOPATOLOGIA EM FÍGADOS DE TILÁPIAS

Júlia Fernanda Urbano Marinho<sup>1</sup>; Jorge Evangelista Correia<sup>1</sup>; Ana Claudia de  
Castro Marcato<sup>1</sup>; Janaína Pedro-Escher<sup>1</sup>; Carmem Silvia Fontanetti<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia – Instituto de Biociências, Rio Claro, SP, Brasil.

Av. 24-A, 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil

<sup>2</sup> Autor correspondente

## RESUMO

Os ecossistemas aquáticos são os principais receptores de substâncias tóxicas provenientes de atividades humanas. Com o crescimento da produção de cana-de-açúcar, a vinhaça – principal resíduo da produção de álcool – destaca-se como um potencial contaminante dos recursos hídricos, uma vez que sua riqueza em matéria orgânica lhe confere um alto poder poluente. Desta maneira, este estudo procurou avaliar a toxicidade da vinhaça por meio da análise de fígados de peixes *Oreochromis niloticus*, expostos a diferentes diluições de vinhaça (1%, 2,5%, 5% e 10%) em dois bioensaios laboratoriais. Porções dos fígados foram coletadas e fixadas para serem analisadas por meio de técnicas histológica e histoquímicas para detecção de proteínas totais, polissacarídeos e lipídios. Na análise histológica, os grupos tratados com vinhaça apresentaram alterações estatisticamente significativas comuns aos dois bioensaios, como perda da integridade citoplasmática, perda de limite celular e desorganização do tecido. Os padrões proteicos e lipídicos não apresentaram alterações. A análise para detecção de polissacarídeos mostrou maior acúmulo desse elemento nos animais expostos ao tratamento com menor concentração de vinhaça, com intensidade gradativamente menor nas maiores diluições. Concluiu-se, portanto, que a vinhaça possui potencial tóxico e citotóxico dose-dependente em corpos d'água e que o fígado constitui um órgão bastante afetado quando em exposição aguda a este contaminante.

**Palavras chave:** resíduo agroindustrial, peixes, poluição aquática, toxicidade.

## 1. INTRODUÇÃO

Tendo em vista o contexto atual, no qual a preocupação com o meio ambiente e a valorização de recursos renováveis são crescentes, a demanda por combustíveis renováveis aumenta a perspectiva de crescimento do setor sucroalcooleiro. Este aumento na produção implica também em um aumento de agrosíduos e, concomitantemente, em impactos causados ao ambiente. Dessa maneira, o monitoramento dos efluentes gerados é de fundamental importância, pois são produzidos em larga escala e podem ser descartados ou reutilizados de maneira inapropriada.

Neste contexto, a vinhaça de cana-de-açúcar se destaca como um agrosíduo pouco estudado. Este efluente consiste em um subproduto oriundo da produção do álcool, com composição e propriedades bastante variáveis (SILVA et al., 2007). Em geral, é caracterizada pelo seu pH ácido e alto conteúdo orgânico (BELTRAN et al., 2005), sendo produzidos de 10 a 18 litros de vinhaça por litro de etanol, dependendo das configurações dos equipamentos da destilaria. Além disso, seu alto poder poluente é cerca de 100 vezes maior que o do esgoto doméstico, principalmente pelo baixo pH, elevada corrosividade e alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (FREIRE; CORTEZ, 2000; ROSSETO, 1987; SILVA et al., 2007).

Por ser rica em matéria orgânica e micronutrientes, a vinhaça possui também alto valor fertilizante e é amplamente reutilizada para fertirrigação da própria cana-de-açúcar, mas devido às altas quantidades utilizadas, é capaz de saturar o solo e contaminar corpos d'água que estejam próximos a estes cultivos (SILVA et al., 2007). Dessa forma, a vinhaça pode acarretar diversos danos à vida aquática.

Neste sentido, os peixes têm sido amplamente utilizados como modelos experimentais, tanto em avaliações de saúde dos ecossistemas aquáticos como em estudos de patologia toxicológica (LAW, 2003; LEDY et al., 2003; SIMONATO et al., 2008). Segundo Figueiredo-Fernandes et al. (2006), a tilápia tem sido considerada um excelente modelo para estudos toxicológicos devido a suas altas taxas de crescimento, grande resistência ao manejo, fácil adaptação às dietas comerciais, boa reprodução em cativeiro e tolerância a diversas condições ambientais.

Ademais, a histopatologia aplicada em peixes como biomarcadora de poluição aquática foi revista por Hinton et al. (1992), os quais estabeleceram que a relação entre danos em peixes e poluição ambiental poderia ser fornecida por meio da histopatologia do fígado. Este órgão pode apresentar diversas alterações morfológicas em condições

tóxicas devido ao seu papel fundamental no metabolismo e excreção de compostos xenobióticos (ROCHA; MONTEIRO, 1999).

Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial tóxico da vinhaça em corpos d'água, utilizando a histopatologia do fígado de tilápias do Nilo, após exposição aguda a diferentes diluições deste efluente, em bioensaios laboratoriais.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

#### **2.1.1 Material biológico**

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 10 cm, para evitar diferenças intra-específicas relacionadas ao tamanho e idade dos peixes. Os espécimes, oriundos de piscicultura, foram aclimatados em tanques antes da exposição.

O presente trabalho foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brasil, protocolo nº 2866.

#### **2.1.2 Vinhaça como substância tóxica**

As amostras de vinhaça de cana-de-açúcar foram coletadas na Usina Santa Lúcia, localizada na cidade de Araras, São Paulo, Brasil, oriundas de duas safras distintas (safras 2010 e 2011). Os efluentes foram mantidos em câmara fria (4°C), no Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, UNESP (Universidade Estadual Paulista), Rio Claro, São Paulo, Brasil, até o início dos experimentos.

### **2.2 Metodologia**

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

Foram realizadas análises físico-químicas do efluente, por laboratório especializado (TASQA Serviços Analíticos Ltda., Paulínia, São Paulo, Brasil), para determinação precisa de sua composição. Foram mensurados os parâmetros: pH, condutividade elétrica, dureza, resíduo não filtrável total, nitrogênio nitrato e nitrito, nitrogênio Kjeldahl, amônia, cálcio, enxofre total, fósforo total, magnésio, potássio,

sódio, sulfato, DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), DQO (Demanda Química de Oxigênio) e metais (Arsênio, Bário, Cádmiu, Chumbo, Cobre, Cromo, Mercúrio, Molibdênio, Níquel, Selênio e Zinco).

### **2.2.2 Bioensaios com *O. niloticus***

Foram montados dois bioensaios em aquários com capacidade de 40 litros. Em cada aquário, foram dispostos cinco peixes já aclimatados (machos e fêmeas, distribuídos aleatoriamente), no qual permaneceram 96 horas, à temperatura ambiente de aproximadamente 24°C, com sistemas de filtragem e aeração.

Em cada aquário houve um tratamento, como segue:

- Aquário 1: Controle com água limpa;
- Aquário 2: Concentração de 1% de vinhaça;
- Aquário 3: Concentração de 5% de vinhaça;
- Aquário 4: Concentração de 10% de vinhaça.

No segundo bioensaio (safra 2011) foram utilizadas as mesmas concentrações, acrescida da diluição 2,5% de vinhaça.

A escolha dos valores de diluições tem como base estudos anteriores, os quais utilizaram diluições similares de vinhaça para analisar seu efeito em diferentes organismos (ALGUR; KADIOGLU, 1992; KUMAR; GOPAL, 2001).

### **2.2.3 Dissecção dos animais**

Decorrido o tempo de exposição de 96 horas, os espécimes de *O. niloticus* foram retirados dos aquários, anestesiados, sacrificados com espinhalamento por tesoura cirúrgica e dissecados em solução fisiológica. O fígado foi retirado e fixado em solução Bouin aquoso e formol cálcio, de acordo com a técnica de coloração a ser empregada, permanecendo no fixador por pelo menos 2 horas.

### **2.2.4 Histologia e Histoquímica**

Após fixação, os fragmentos de fígado foram transferidos para solução tampão de fosfato de sódio, onde permaneceram por pelo menos 24 horas, e depois foram desidratados em solução de etanol a 70, 80, 90 e 95%. Em seguida, foram imersos em resina de embebição (Leica Histo-resin – Embedding Kit), por 24 horas, em geladeira. O material foi então transferido para moldes plásticos contendo resina de inclusão e, posteriormente, cortados com auxílio de micrótopo. As secções foram coradas por

hematoxilina e eosina (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983), de acordo com rotina histológica, ou submetidas aos seguintes testes histoquímicos: azul de bromofenol para a detecção de proteínas totais (PEARSE, 1985), PAS (Periodic Acid-Schiff) para a detecção de polissacarídeos neutros, coloração simultânea por PAS e Alcian blue, para detecção de polissacarídeos ácidos (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) e sudan black B e azul do Nilo para lipídeos (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

### 2.2.5 Interpretação dos resultados

Foram analisadas duas lâminas com oito cortes de 6 µm para cada peixe, sendo n=5 para cada um dos bioensaios. Assim, foram analisados um total de 60 lâminas e 480 cortes histológicos para cada técnica realizada, por bioensaio. Os resultados encontrados no controle e nos tratamentos dos dois bioensaios foram comparados entre si.

A descrição e a avaliação das alterações histopatológicas tiveram como base o protocolo padronizado de Bernet et al. (1999), adaptado para este estudo. Um fator de importância ( $w$ ) foi definido para cada lesão, de acordo com sua importância patológica, ou seja, como isso afeta a função do órgão e a capacidade de sobrevivência dos peixes. As alterações foram previamente classificadas em três fatores de importância: (1) Importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível quando a exposição ao irritante termina; (2) Importância patológica moderada, a lesão é reversível na maioria dos casos, quando o estressor é neutralizado; e (3) Importância patológica acentuada, a lesão é geralmente irreversível, levando à perda parcial ou total da função do órgão. Para melhor compreensão dos resultados, as anomalias histopatológicas descritas foram também classificadas em escores ( $a$ ) que variaram de 0 a 6, dependendo do grau e da extensão da alteração, sendo: (0) nenhuma ocorrência; (2) pouca ou rara ocorrência; (4) ocorrência frequente; e (6) ocorrência muito frequente. Além disso, valores intermediários também foram considerados. Ao multiplicar o fator de importância pelo escore, obtêm-se o índice da alteração. Para o cálculo do índice total de cada indivíduo, ou seja, o índice correspondente à avaliação das alterações histopatológicas do fígado de cada animal avaliado, foi utilizado o seguinte cálculo:  $\text{Índice}_{\text{ind}} = \sum (\text{fator de importância} \times \text{escore})$ . 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 através do teste Mann-Whitney em níveis de 5% e 1% de significância, utilizando-se o programa Bioestat - versão 5.3.

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

### **3. RESULTADOS**

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

Pelas análises realizadas, foi possível observar que ambas as safras de vinhaça (2010 e 2011) apresentaram baixo pH, altos valores de DBO e DQO, bem como de potássio. Além disso, no segundo bioensaio, o sulfato apresentou uma concentração 400% maior que o primeiro bioensaio. Por outro lado, os valores obtidos para dureza foram bastante distintos, sendo que a amostra da segunda coleta mostrou uma dureza muito menor que a da primeira (Tabela 1).

Em relação aos metais (Tabela 1), observou-se que a primeira coleta de vinhaça revelou diferentes elementos, como bário, cobre, cromo, mercúrio, molibdênio, níquel e zinco, enquanto a segunda detectou apenas a presença de cobre e cromo. Entretanto, ao considerarmos os elementos arsênio, cádmio, chumbo, mercúrio, níquel e selênio no segundo bioensaio, é importante salientar que o limite de quantificação (LQ) destes, com o método utilizado pelo laboratório, são acima dos parâmetros delimitados pela CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo/Brasil). A tabela mostrou, ainda, que a concentração de cromo detectado na vinhaça do segundo bioensaio foi superior ao recomendado para este elemento. Calculando a concentração total desse metal para cada grupo tratamento, este ainda encontra-se acima de seu valor de intervenção para os tratamentos 10%, 5% e 2,5%.

#### **3.2 Observação dos bioensaios**

Durante a execução do primeiro bioensaio, foi verificada a mortalidade de todos os indivíduos expostos às diluições de 5% e 10% de vinhaça após 48h de experimento. Por outro lado, o segundo bioensaio apresentou 60% de mortalidade dos peixes expostos à diluição de 10% do efluente.

#### **3.3 Análise histológica**

O grupo controle apresentou arquitetura típica do tecido hepático de peixes teleósteos (Fig. 1A, B), com ausência de anormalidades patológicas. Os hepatócitos são arranjados em fileiras e entremeados por sinusóides, nos quais é possível observar eritrócitos. O citoplasma dos hepatócitos aparece homoganeamente corado (Fig. 1A) ou por vezes menos corado, podendo apresentar alguns vacúolos (Fig. 1B). Como descrito para a espécie, o órgão exibiu ácinos pancreáticos exócrinos.

As principais alterações histopatológicas encontradas nos fígados de tilápias expostas à vinhaça encontram-se sintetizadas na Tabela 2. As alterações estatisticamente significativas comuns aos dois bioensaios foram perda da integridade citoplasmática (Fig. 1C), perda de limite celular (Fig. 1D) e desorganização do tecido (Fig. 1E) (Tabelas 3 e 4). No primeiro bioensaio foram observados também núcleos picnóticos e dilatação dos espaços sinusóides, os quais não mostraram significância estatística (Tabela 3). No segundo bioensaio observou-se também citoplasma vacuolizado (Fig. 1F), degeneração hidrópica (Fig. 1E) e núcleos picnóticos (Figs 1C, D), sendo estes dois últimos estatisticamente significativos (Tabela 4). Não foram observadas alterações associadas ao tecido pancreático.

### **3.4 Análise histoquímica**

Os padrões histoquímicos para detecção proteica e lipídica não sofreram alterações neste estudo (Figs 2A, B, C). Ambos apresentaram o citoplasma de seus hepatócitos moderadamente positivo aos testes, apresentando áreas menos coradas conforme o padrão da coloração histológica. Por outro lado, a análise para detecção de polissacarídeos mostrou que o grupo controle apresenta pequenos estoques destes elementos, tanto ácidos como neutros, no citoplasma da célula, em forma de fina granulação espalhada por todo o citoplasma ou em acúmulos maiores (Figs 3A, B).

O grupo tratamento 1% foi o que apresentou maior concentração de polissacarídeos, em ambos os bioensaios, em comparação a todos os outros grupos (Figs 3C, D, E). O grupo tratamento 2,5% apresentou intensidade de coloração semelhante ao tratamento 1%, enquanto no grupo 5%, a coloração dos conteúdos celulares foi menos intensa, com regiões fracamente positivas ao teste (Fig. 3F). Todos os grupos tratamentos apresentaram acúmulo estatisticamente significativo (Tabelas 3 e 4). Além disso, foram observadas células inteiramente positivas aos dois reagentes, sendo homogênea para polissacarídeos ácidos e em forma de grânulos para neutros. De uma

maneira geral, tanto no controle quanto nos tratamentos, os polissacarídeos pareceram estar mais associados aos arredores dos vasos sanguíneos e hepatopâncreas.

Quando se avaliou a média do conjunto de lesões por grupo nos dois bioensaios, verificou-se que todos os tratamentos foram significativos para o teste Mann-Whitney para  $p < 0,05$ , de modo que apenas o tratamento 1% do segundo bioensaio não se mostrou significativo para  $p < 0,01$  (Tabela 5).

#### 4. DISCUSSÃO

A composição química da vinhaça de cana-de-açúcar varia em função da individualidade de cada planta utilizada na produção do etanol, bem como do posterior processo de destilação (ROBERTIELLO, 1982). Pela possibilidade de haver variações também entre safras, foi feita a repetição do bioensaio para avaliar a composição e a toxicidade da vinhaça em diferentes épocas, de modo a comparar e complementar os resultados obtidos. Tendo em vista a mortalidade dos peixes nas concentrações mais altas, uma diluição adicional de 2,5% foi acrescentada ao desenho experimental no segundo bioensaio, de modo a compreender melhor os possíveis efeitos tóxicos da vinhaça.

A mortalidade dos indivíduos expostos às maiores concentrações de vinhaça pode ser explicada pela alta carga orgânica do efluente e sua elevada DBO e DQO, de maneira a esgotar o oxigênio na água, levando à mortalidade dos peixes. É possível supor que a grande quantidade de potássio, o baixo pH e a presença de diferentes metais também poderiam contribuir para os efeitos tóxicos da vinhaça, assim como a alta dureza da amostra no primeiro bioensaio.

O potássio é comumente encontrado na forma iônica e pronto para ser acumulado pela biota aquática, pois é um elemento nutricional essencial. As concentrações em águas naturais são usualmente menores que 10 mg/L (CETESB, 2013), assim, a detecção de altas concentrações na vinhaça pode influenciar diretamente no potencial tóxico do efluente.

Por outro lado, a influência do pH em um ecossistema pode se dar de modo direto, com efeitos sobre a fisiologia das espécies, ou de modo indireto, podendo em determinadas condições contribuir para a precipitação de elementos químicos tóxicos, como metais pesados (CETESB, 2013). Ainda, segundo a CETESB (2013), estabelece-se faixa de pH entre 5 e 9 para o lançamento direto de efluentes nos corpos receptores,

sendo que os critérios de proteção à vida aquática fixam o pH dos corpos d'água entre 6 e 9. As amostras de vinhaça bruta utilizadas neste estudo apresentaram valores abaixo destes estabelecidos, podendo ter efeito direto em sua toxicidade.

Já os metais podem modificar as atividades das enzimas hepáticas e conduzir a alterações histopatológicas no fígado, de acordo com o tipo de metal e sua concentração, da espécie de peixe, do tempo de exposição e de outros fatores (PARIS-PALACIOS et al., 2000). O cromo, presente em alta quantidade na vinhaça utilizada, embora constitua um nutriente essencial em baixas doses, pode ser mutagênico e carcinogênico em determinados estados de oxidação (FERREIRA, 2002; CETESB, 2013). Já a quantidade detectada de cobre foi menos elevada, mas merece atenção. Estudos indicam que uma concentração de 20 mg/L de cobre na água é capaz de produzir intoxicações no homem, incluindo lesões no fígado. Para peixes, as doses elevadas de cobre são ainda mais nocivas, de maneira que concentrações de 0,5 mg/L podem ser letais para diversas espécies de peixes (CETESB, 2013). Vale lembrar que a vinhaça pode apresentar valores de metais pesados muito abaixo daqueles detectáveis pelo método analítico empregado (CAMILOTTI et al., 2007). Dessa forma, não é possível mensurar os prováveis danos de todos os elementos, embora possam trazer inúmeras lesões aos peixes caso estejam presentes (ALVARADO et al., 2006; BLEAU et al., 1996; RANDI et al., 1996; SREEDEVI et al.; 1992).

Alterações histológicas típicas de respostas agudas puderam ser encontradas nos indivíduos de todos os grupos tratamentos, decorrentes da exposição à vinhaça. Isso porque os hepatócitos podem ser considerados o primeiro alvo da toxicidade de uma substância, o que caracteriza o fígado como um excelente biomarcador da poluição ambiental (ZELIKOFF, 1998).

A degeneração hidrópica observada nos hepatócitos é caracterizada pelo aumento de volume da célula devido ao acúmulo de água e eletrólitos em seu interior (ROBBINS et al., 1989). Yildirim et al. (2006) também observaram tal alteração em fígado de tilápias expostas ao inseticida Deltametrin.

Em algumas áreas hepáticas nos grupos tratados, principalmente com maiores concentrações de vinhaça, foram observados núcleos com diâmetro reduzido e aspecto picnótico. Esta alteração indica condensação da cromatina, sugerindo o início do processo de morte celular. No presente estudo, este processo pode ter ocorrido em razão do potencial tóxico dos componentes da vinhaça.

As áreas com citoplasma mais claro se referem a áreas com perda da integridade citoplasmática e indicam um processo de degradação, uma vez que são áreas negativas à maioria das técnicas realizadas, de modo a serem positivas às colorações para detecção de polissacarídeos apenas nas menores concentrações de vinhaça. Além disso, sua crescente frequência, concomitante ao aumento das concentrações de vinhaça nos tratamentos, pode indicar a ocorrência de um processo tóxico no fígado.

A perda do limite celular e a desorganização do tecido hepático foram características encontradas com frequência nos indivíduos expostos. Akaishi et al. (2004), ao estudar fígados de peixes contaminados com petróleo, também puderam observar perda de limites celulares nos hepatócitos. Segundo os autores, essa característica sugere alterações drásticas na distribuição de organelas, o que pode trazer consequências graves para o funcionamento do órgão.

Os testes histoquímicos para detecção de polissacarídeos citoplasmáticos indicaram maior acúmulo deste elemento, tanto ácidos como neutros, em todos os grupos tratados com vinhaça. Este fato pode ser explicado pela alta quantidade de compostos orgânicos presentes no efluente, particularmente açúcares, os quais são metabolizados pelo organismo, fornecendo a matéria prima para produção de glicogênio nos hepatócitos. Uma vez que é função do cromo potencializar os efeitos da insulina no organismo (MERTZ, 1969), sua presença é capaz de estimular a captação de glicose pelos tecidos. Assim, a elevada quantidade deste metal também pode ter contribuído para a maior concentração de polissacarídeos nos grupos tratamentos.

Embora pareça evidente pensar em um aumento dose-dependente na quantidade de polissacarídeos quando consideramos a vinhaça como poluente, um efeito contrário foi observado. Entre os fatores que podem ter contribuído para este resultado, é possível considerar que a vinhaça diluída em doses pequenas é juntamente metabolizada pelo organismo, sendo que seus polissacarídeos são armazenados pelos hepatócitos ao atingir o fígado. Mas quando se encontra em maior quantidade, o efluente é capaz de comprometer o tecido hepático, de modo a desorganizar e degradar parte do tecido, motivo pelo qual há um aumento das respostas negativas ao teste histoquímico nas maiores concentrações. Outra possibilidade deve-se ao fato de que os depósitos de carboidrato em tecidos como o fígado podem fornecer as necessidades energéticas imediatas em peixes teleósteos, particularmente em casos de estresse (DANGÉ, 1986; HORI et al., 2006), o que permite ao organismo atender a este aumento na demanda energética.

Em relação à sua forma de acúmulo nas células, os polissacarídeos puderam ser encontrados, nos indivíduos dos dois bioensaios, na forma de pequenos vacúolos citoplasmáticos ou espalhados por todo o citoplasma hepático. Tais dados são condizentes com estudos de Santos et al. (2004) realizados com tilápias, nos quais foram encontradas regiões hepáticas vacuolizadas com provável concentração de glicogênio em seu interior. Em contrapartida, Paris-Palacios et al. (2000) analisaram fígado de zebrafish com partículas de glicogênio espalhadas ao longo do citoplasma, também corroborando os resultados encontrados.

## **5. CONCLUSÕES**

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que a vinhaça de cana-de-açúcar nas diluições analisadas neste estudo possui potencial tóxico e citotóxico dose-dependente em corpos d'água. Isto foi demonstrado pelas alterações na morfologia e no conteúdo de polissacarídeos do fígado dos indivíduos, comprovando que as análises morfológicas qualitativa e semiquantitativa podem ser consideradas importantes metodologias para observação de alterações hepáticas decorrentes de processos toxicológicos. Além disso, a vinhaça pode ser até mesmo letal dependendo da concentração e da sua composição, que por sua vez varia de acordo com a safra. Dessa forma, a reutilização deste efluente na prática de fertirrigação deve ser avaliada com cautela, uma vez que ao atingir o meio aquático, seu efeito na fauna pode ser extremamente nocivo. Por este motivo, outros meios para substituir seu uso como fertilizante devem ser considerados.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Processos nº 2011/06845-7, 2011/06749-8 e 2012/50197-2) e FUNDUNESP pelo suporte financeiro, a Gerson Mello Souza pelo suporte técnico e a Dra. Cintya Aparecida Christofolletti, Cristina Moreira de Sousa e Nilton Righetto Neto pela ajuda ao longo dos experimentos.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AKAISHI, F.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; JAKOBI, S.C.G.; EIRAS-STOFELLA, D.R.; ST-JEAN, S. D.; COURTENAY, S.C.; LIMA, E.F.; WAGENER, A.L.R.; SCOFIELD, A.L.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Morphological and Neurotoxicological Findings in Tropical Freshwater Fish (*Astyanax* sp.) After Waterborne and Acute Exposure to Water Soluble Fraction (WSF) of Crude Oil. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v.46, p.244–253. 2004.

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

ALVARADO, N.E.; QUESADA, I.; HYLLAND, K.; MARIGÓMEZ, I.; SOTO, M. Quantitative changes in metallothionein expression in target cell-types in the gills of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu, Zn and after a depuration treatment. **Aquatic Toxicology**, v.77, p.64–77. 2006.

BELTRAN, J.; DOMINGUEZ, J.; PARTIDO, E. Physico-chemical treatment for the depuration of wine distillery wastewaters (vinasses). **Water Science and Technology**, v.51, p.159-166. 2005.

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.

BLEAU, H.; DANIEL, C.; CHEVALIER, G.; VAN TRA, H.; HONTELA, A. Effects of acute exposure to mercury chloride and methylmercury on plasma cortisol, T3, T4, glucose and liver glycogen in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v.34, n.3, p.221–235. 1996.

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

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Variáveis de qualidade das águas superficiais. 2013. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguassuperficiais/34-variaveis-de-qualidade-das-aguas>>. Acesso em: 22/05/13.

DANGÉ, A.D. Changes in carbohydrates metabolism in Tilapia, *Oreochromis* (Sarotherrdon) *mossambicus*, during short-term exposure to different type of pollutants. **Environ. Pollut.** 41A, 165–177. 1986.

FERREIRA, A.D.Q. Impacto do crômio nos sistemas biológicos. **Química Nova**, v.5, n.4. 2002.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A., FONTAÍNHAS-FERNANDES A., MONTEIRO R., REIS-HENRIQUES M.A., ROCHA, E. Effects of the Fungicide Mancozeb on Liver Structure of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*: Assessment and Quantification of Induced Cytological Changes Using Qualitative Histopathology and the Stereological Point-Sampled Intercept Method. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.76, p.249–255. 2006.

FREIRE, W.J.; CORTEZ, L.A. Vinhaça de cana-de-açúcar. **Agropecuária**, 2000, 203p.

HINTON, D.E., BAUMANN, P.C., GARDNER, G.C., HAWKINS, W.E., HENDRICKS, J.D., MURCHELANO, R.A., OKIHIRO, M.S., Histopathologic Biomarkers. 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, p.155-210. 1992.

HORI, T.S.F.; AVILEZ, I.M.; INOUE, L.K.; MORAES, G. Metabolical changes induced by chronic phenol exposure in matrinxã *Brycon cephalus* (teleostei: characidae) juveniles. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.143, n.1, p.67-72. 2006.

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

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

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

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

MERTZ, W. The essential trace elements. **Science**, v.213, p.1332-1338. 1969.

PARIS-PALACIO, S., BIAGIANTI-RISBOURG, S., VERNET G. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae)

exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. **Aquatic Toxicology**, v.50, p.109–124. 2000.

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

RANDI, A.S.; MONSERRAT, J.M.; RODRIGUEZ, E.M.; ROMANO, L.A. Histopathological effects of cadmium on the gills of the freshwater fish, *Macropsobrycon uruguayanae* Eigenmann (Pisces, Atherinidae). **Journal of Fish Diseases**, v.19, p.311–322. 1996.

ROBBINS, S.L. COTRAN, R.S., KUMAR, V. **Robbins pathologic basis of disease**. 4ed. Philadelphia, W.B. Saunders Co. 1519p. 1989.

ROBERTIELLO, A. Upgrading of agricultural and agroindustrial wastes: the treatment of distillery effluents (vinasses) in Italy. **Agricultural Wastes**, v.4, p.387-395, 1982.

ROCHA, E., MONTEIRO, R.A.F., **Histology and cytology of fish liver: a review**. In: Saksena, D.N. (Ed.), *Ichthyology: Recent Research Advances*. Oxford, IBH Publishing Co. Pvt. Ltd.; Science Publishers Inc., New Delhi, India; Enfield, New Hampshire, USA, p. 321–344. 1999.

ROSSETTO, A. J. Utilização agrônômica dos subprodutos e resíduos da indústria açucareira e alcooleira. In: Paranhos, S.B. (ed.). **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargill, 1987, v.2, p.435-504.

SANTOS, A.A., RANZANI-PAIVA, M.J.T., FELIZARDO, N.N., RODRIGUES, E.L. Análise histopatológica de fígado de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, criada em tanque-rede na represa de Guarapiranga, São Paulo, SP, Brasil. **B. Inst. Pesca**, v.30, n.2, p.141-145. 2004.

SILVA, M.A.S.; GRIEBELER, M.P.; BORGES, L.C. Uso da vinhaça e impacto nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.11, n.1, p.108-114, 2007.

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

SREEDEVI, P.; SIRAVAMAKRISHNA, B.; SURESH, A.; RADHAKRISHNAIAH, F. Effects of nickel on some aspects of protein metabolism in the gill and kidney of the freshwater fish *Cyprinus carpio*. **Environmental Pollution**, v.77, p.59-63, 1992.

YILDIRIM, M. Z., BENLÝ, A.Ç.K., SELVÝ, M., ÖZKUL, A., ERKOC, F., KOÇAK, O. Acute Toxicity, Behavioral Changes and Histopathological Effects of Deltamethrin on Tissues (Gills, Liver, Brain, Spleen, Kidney, Muscle, Skin) of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Fingerlings. **Environ. Toxicol.**, 21: 614–620. 2006

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

**Tabela 1.** Características quali-quantitativas e análise de metais das vinhaças utilizadas

Parâmetros	1º Bioensaio (safra 2010)	2º Bioensaio (safra 2011)	CETESB (mg/L)	Métodos de análises
Amônia (mg/L)	<LQ	<LQ	-	USEPA 440/5-85-001
Arsênio (mg/L)	<LQ	<LQ	0,01	SM21 3120 B
Bário (mg/L)	0,41	<LQ	0,7	SM21 3120 B
Cádmio (mg/L)	<LQ	<LQ	0,005	SM21 3120 B
Cálcio (mg/L)	719	671	-	SM21 3120 B
Chumbo (mg/L)	<LQ	<LQ	0,01	SM21 3120 B
Cobre (mg/L)	0,35	0,76	2	SM21 3120 B
Condutividade Elétrica (µs/cm)	13530	15110	-	SM21 2510 B
Cromo (mg/L)	0,04	3,56	0,05	SM21 3120 B
DBO (mg/L)	5046	7941	-	SM21 5210 B
DQO (mg/L)	13380	25225	-	SM21 5220 D
Dureza (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	2493	276	-	SM21 2340 B
Enxofre Total (mg/mL)	1219	1681	-	SM21 3120B
Fosfato total (mg/L)	1,30	-	-	SM21 4500-P C
Magnésio (mg/L)	237	264	-	SM21 3120 B
Merúrio (mg/L)	0,0019	<LQ	0,001	EPA 7470 <sup>a</sup>
Molibdênio (mg/L)	0,008	<LQ	0,07	SM21 3120 B
Níquel (mg/L)	0,03	<LQ	0,02	SM21 3120 B
Nitrato (mg/L)	1,30	1,49	-	SM21 4500- NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> F
Nitrito (mg/L)	0,008	0,033	-	SM21 4500- NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> B
Nitrogênio Kjeldahl (mg/Kg)	267	171	-	SM21 4500-Norg B
pH	3,9	4,37	-	SM21 4500- H <sup>+</sup> B
Potássio (mg/L)	2056	3401	-	SM21 3120 B
Resíduo não Filtrável (mg/L)	2765	1800	-	SM21 2540 D
Selênio (mg/L)	<LQ	<LQ	0,01	SM21 3120 B
Sódio (mg/L)	50,2	114	-	SM21 3120 B
Sulfato (mg/L)	710	2993	-	SM21 4500- SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> E
Zinco (mg/L)	1,66	<LQ	5	SM21 3120 B

**LQ:** limite de quantificação (variável); **DBO:** Demanda Bioquímica de Oxigênio; **DQO:** Demanda Química de Oxigênio; **EPA:** Environmental Protection Agency; **USEPA:** United States Environmental Protection Agency; **SM21:** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21th Edition 2005.

**Tabela 2.** Principais alterações encontradas em fígado de *O. niloticus* expostos à vinhaça e seus respectivos fatores de importância

	<b>Características Analisadas</b>	<b>Fator de Importância (w)</b>
<b>Hepatócitos</b>	Hipertrofia/ Degeneração hidrópica	2
	Atrofia	2
	Núcleo picnótico	3
	Citoplasma vacuolizado	1
	Perda da integridade citoplasmática	3
	Perda de limite celular	3
	Acúmulo de polissacarídeos	1
<b>Tecido Intersticial</b>	Sinusóides dilatados	1
<b>Parênquima Hepático</b>	Desorganização do tecido	2

**Tabela 3.** Frequência de ocorrência de alterações hepáticas significativas encontradas em *O. niloticus* expostos à vinhaça no primeiro bioensaio (safra 2010)

<b>1º Bioensaio</b>	<b>Controle</b>	<b>T 1%</b>
<b>Perda da integridade citoplasmática</b>	0 ± 0	2 ± 1,225**
<b>Perda de limite celular</b>	0 ± 0	1,4 ± 1,517*
<b>Acúmulo de polissacarídeos</b>	1,2 ± 0,447	3,8 ± 0,837**
<b>Desorganização do tecido</b>	0 ± 0	1,6 ± 1,342**

Dados apresentados como média ± desvio padrão

**T1%:** Tratamento 1%.

\*: Valor significativo para  $p < 0,05$  pelo teste Mann-Whitney

\*\* : Valor significativo para  $p < 0,01$  pelo teste Mann-Whitney

**Tabela 4.** Frequência de ocorrência de alterações hepáticas significativas encontradas em *O. niloticus* expostos à vinhaça no segundo bioensaio (safra 2011)

2° Bioensaio	Controle	T 1%	T 2,5%	T 5%
Degeneração Hidrópica	0 ± 0	1,6 ± 1,673	4 ± 3,742*	4 ± 3,162*
Núcleo picnótico	0,6 ± 1,342	1,8 ± 1,643	5,4 ± 4,930*	8,4 ± 2,510**
Perda da integridade citoplasmática	7,2 ± 1,643	7,2 ± 4,025	10,8 ± 4,025	12,6 ± 2,510*
Perda de limite celular	0,6 ± 1,342	1,8 ± 1,643	6,6 ± 2,51*	10,2 ± 1,643**
Acúmulo de polissacarídeos	2 ± 0,707	5 ± 1,225*	3 ± 0,707*	2,8 ± 0,447*
Desorganização do tecido	1,2 ± 1,095	1,6 ± 0,894	6,8 ± 1,790**	8 ± 1,414**

Dados apresentados como média ± desvio padrão

**T1%:** Tratamento 1%. **T2,5%:** Tratamento 2,5%. **T5%:** Tratamento 5%

\*: Valor significativo para  $p < 0,05$  pelo teste Mann-Whitney

\*\*: Valor significativo para  $p < 0,01$  pelo teste Mann-Whitney

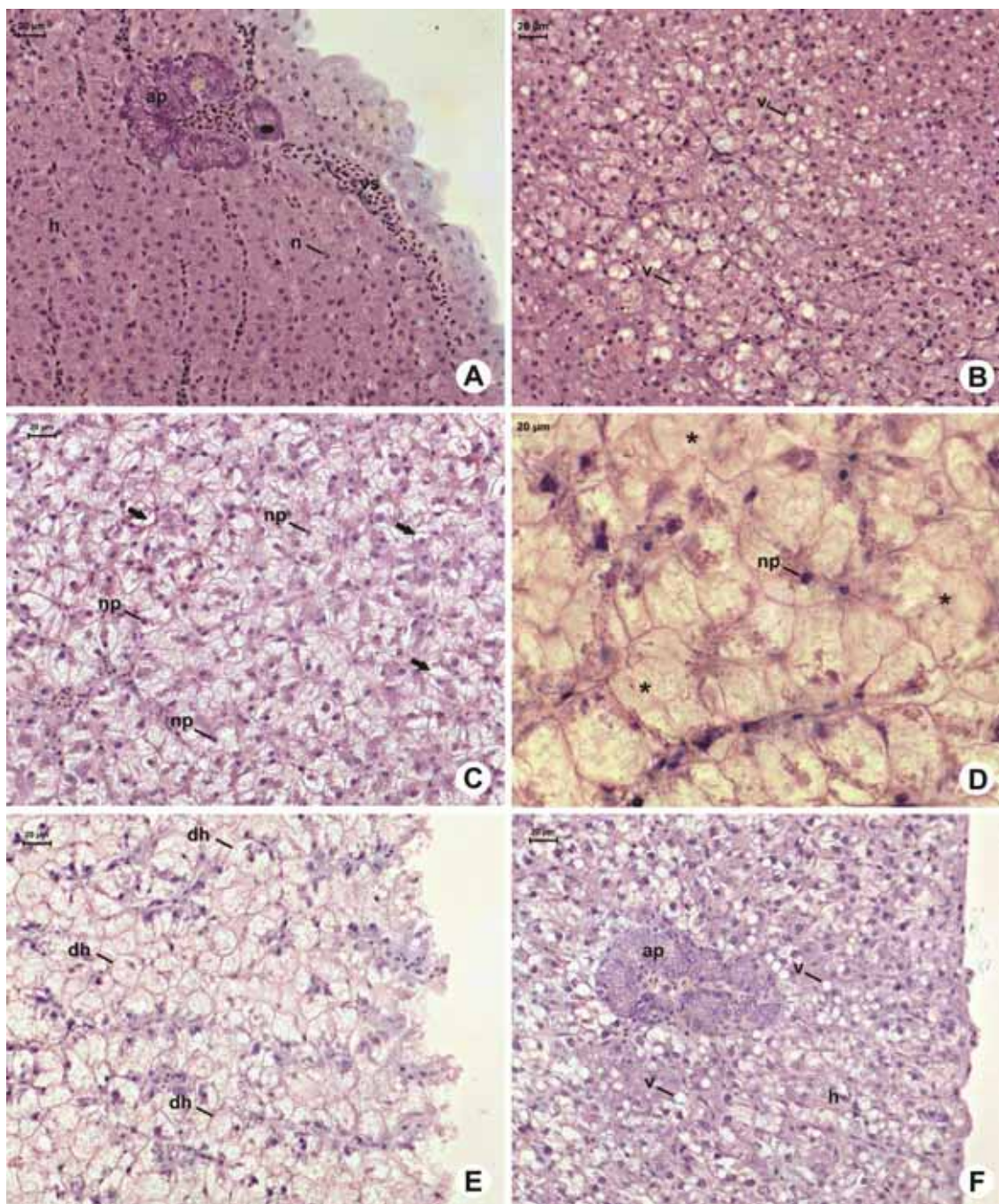
**Tabela 5.** Conjunto de alterações hepáticas em cada grupo

	Controle	T 1%	T 2,5%	T 5%
1° Bioensaio	3 ± 1,225	13,6 ± 6,050**	-	-
2° Bioensaio	11,6 ± 3,362	19,6 ± 7,830*	38,4 ± 14,153**	46,2 ± 5,805**

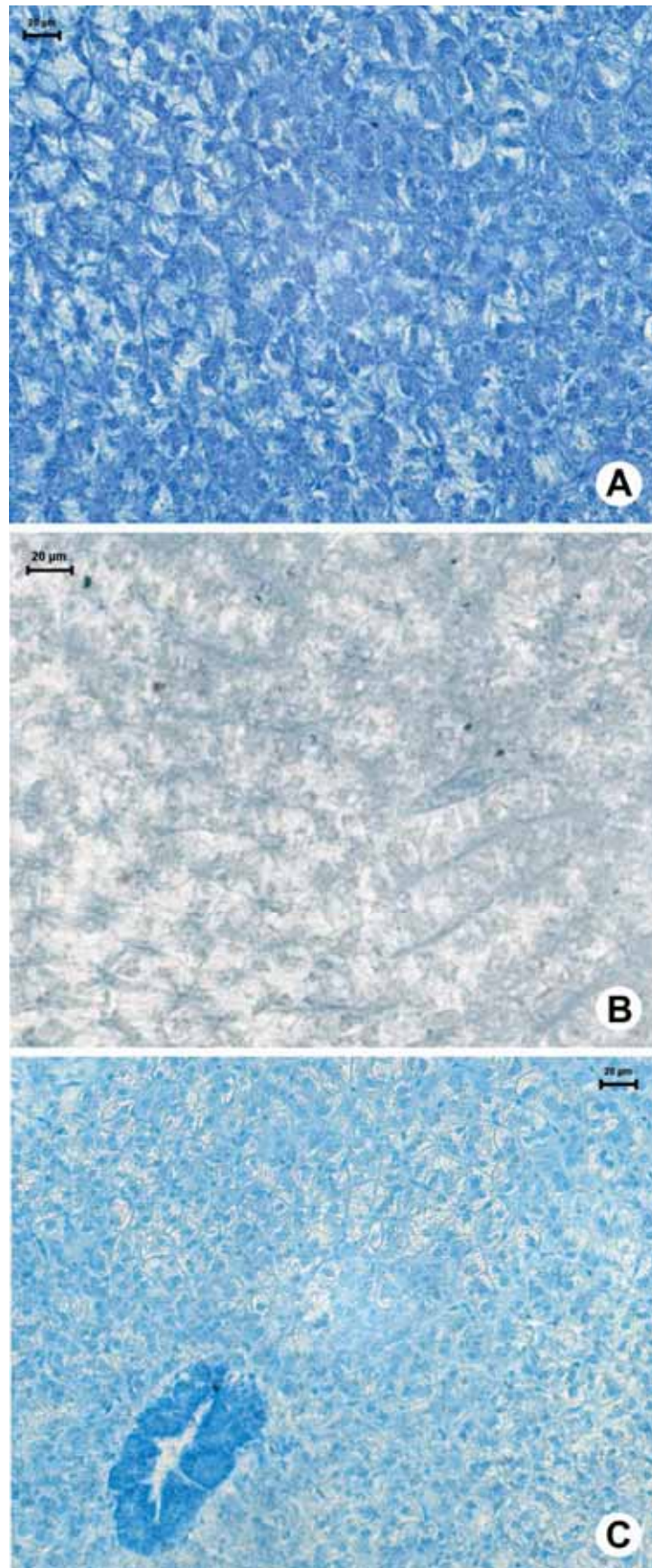
Dados apresentados como média ± desvio padrão.

\*: Valor significativo para  $p < 0,05$  pelo teste Mann-Whitney

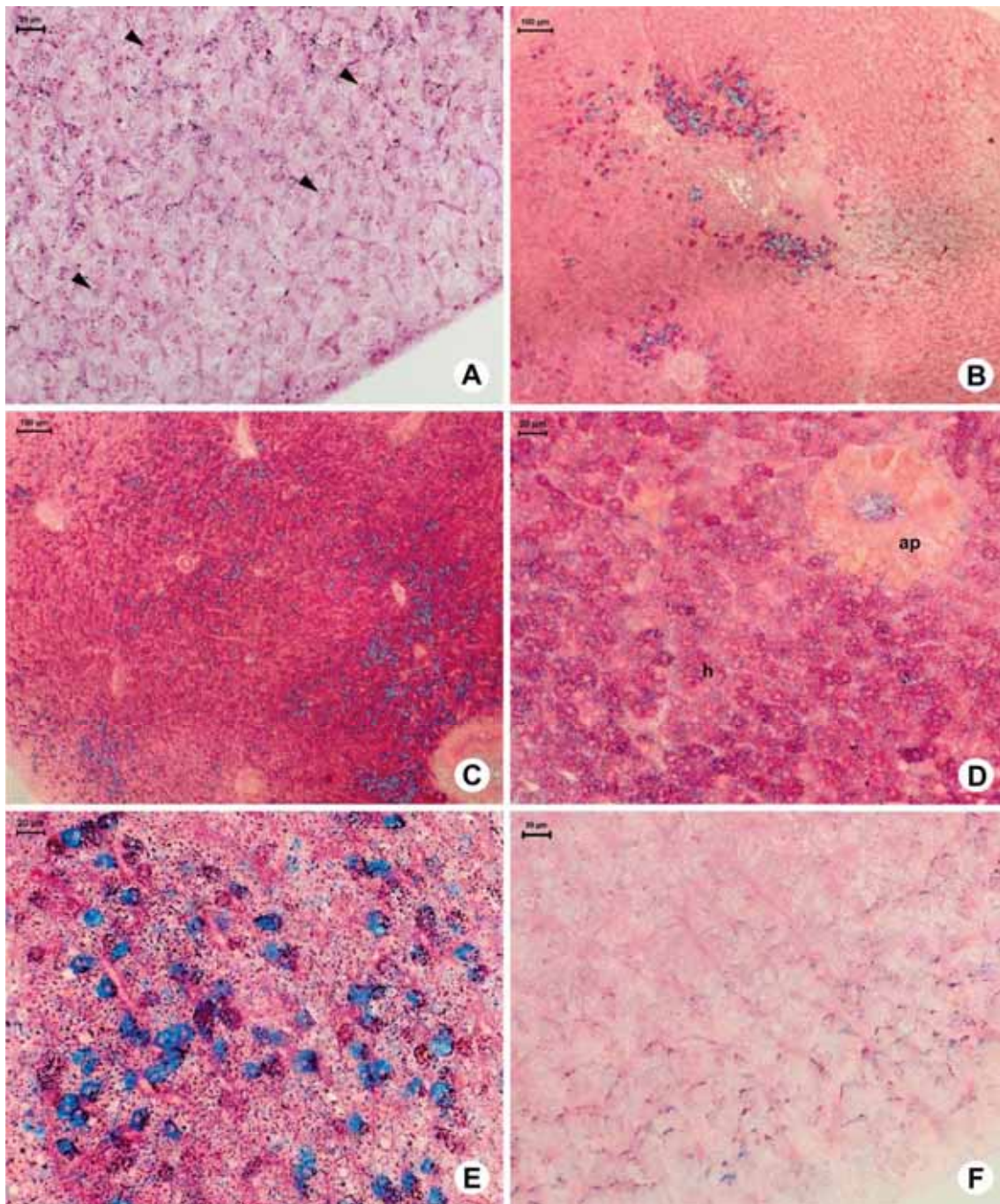
\*\*: Valor significativo para  $p < 0,01$  pelo teste Mann-Whitney



**Figura 1:** Secções histológicas de fígados de *O. niloticus* submetidos ao teste hematoxilina-eosina. **Grupo Controle (A, B)** e **Grupo Tratamento (C, D, E, F)**. **Ap:** ácidos pancreáticos; **dh:** degeneração hidrópica; **h:** hepatócitos; **n:** núcleo; **np:** núcleo picnótico; **v:** vacúolo; **vs:** vaso sanguíneo; **seta:** perda da integridade citoplasmática; **asterisco:** perda do limite celular.



**Figura 2:** Secções histológicas de fígados de *O. niloticus* submetidos ao teste azul de bromofenol (A), sudan black B (B) e azul do Nilo (C). **Grupo Controle (A, B, C).**



**Figura 3:** Secções histológicas de fígados de *O. niloticus* submetidos aos testes PAS (A) e PAS + azul de Alcian (B, C, D, E, F). **Grupo Controle (A, B)** e **Grupo Tratamento (C, D, E, F)**. **Cabeça de seta:** acúmulo de polissacarídeos.

## 6 CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos através da análise histopatológica de fígado de peixes da espécie *O. niloticus*, expostos a diferentes concentrações de vinhaça, pode-se concluir que:

- As concentrações de 5% e 10% foram letais aos peixes no primeiro bioensaio, sendo que a concentração de 10% também foi letal para a maior parte dos peixes expostos no segundo bioensaio. Tais mortalidades provavelmente são resultado da alta DBO, DQO e alta quantidade de matéria orgânica presente na vinhaça de ambas as safras.
- Foram encontradas diversas alterações histopatológicas estatisticamente significativas na análise histológica, sendo elas: degeneração hidrópica, núcleo picnótico, citoplasma claro/lavado, perda de limite celular e desorganização do tecido.
- O tratamento com vinhaça não alterou a presença de proteínas totais presentes no fígado de peixes expostos.
- Os grupos tratamentos apresentaram maior acúmulo de polissacarídeos no tecido hepático, de maneira a serem acumulados em grande quantidade no tratamento com menor quantidade de vinhaça, sendo este acúmulo gradativamente menor nas maiores diluições. Este fato pode ser devido ao alto teor de matéria orgânica presente na vinhaça, à alta concentração de cromo no efluente e mesmo como uma resposta direta à toxicidade.
- O tratamento com vinhaça aparentemente não alterou o padrão lipídico no fígado de peixes expostos.
- A vinhaça nas concentrações 1%, 2,5%, 5% e 10% possui potencial tóxico e citotóxico dose-dependente em corpos d'água.
- A análise morfológica qualitativa constitui uma importante metodologia para observação de alterações hepáticas em estudos de toxicologia, sendo suas interpretações corroboradas pelas avaliações semiquantitativas.
- *Oreochromis niloticus* se mostrou um eficiente organismo teste para a avaliação da toxicidade de recursos hídricos contaminados pela vinhaça.

**REFERÊNCIAS**

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

AKIYOSHI, H.; INOUE, A. Comparative histological study of teleost livers in relation to phylogeny. **Zoolog Sci.**, v.21, n.8, p.841-850. 2004.

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

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

ALVARENGA, R.P.; QUEIROZ, T.R. Produção mais limpa e aspectos ambientais na indústria sucroalcooleira. 2nd International Workshop – Advances in Cleaner Production, Brazil, São Paulo, p.1-9, 2009.

ALVES-COSTA, J.R.M. **Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por contaminação ao chumbo (III): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus***. 123p, Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

ARELLANO, J.M., STORCH, V., SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.44, p.62–72, 1999.

ARELLANO, J.M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Ultrastructural and histochemical study on gills and skin of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. **J. Appl. Ichthyol.**, v.20, p.452–460.2004.

ASHISH K. MISHRA; BANALATA MOHANTY. 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.

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.
- 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 (Oxford)**, v.40, p.839-844, 2009.
- BORSOI, Z.M.F.; TORRES, S.D.A. A política de recursos hídricos no Brasil. **Revista do BNDES**, v.4, n.8, p.143-166, 1997.
- BRUSLÉ, J.; GONZÁLEZ I ANADON, G. The structure and function of fish liver. In: MUNSHI J.S.D.; DUTTA H.M (Eds.). **Fish Morphology**. Science Publishers Inc, p.77-94. 1996.
- CAMARGO, J.A.; PEREIRA, N.; CABELLO, P.R.; TERAN, F.J.C. Viabilidade da aplicação do método respirométrico de Bartha para a análise da atividade microbiana de solos sob a aplicação de vinhaça. **Engenharia Ambiental**, v.6, n.2, p.264-271, 2009.
- CANAOSTE – Associação dos Plantadores de Cana do Oeste do Estado de São Paulo, 2012. **Moagem de cana atinge 492,70 milhões de toneladas e demanda por etanol permanece estável no início de janeiro**. Disponível em: <http://www.canaoeste.com.br/conteudo/moagem-de-cana-atinge49270-milhoes-de-toneladas-e-demanda-por-etanol-permanece-estavel-no-inicio-de-janeiro> Acesso em: 02 de fevereiro de 2012.
- CHRISTOFOLETTI C.A.; DAVID, J.A.O; FONTANETTI C.S. Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): A methodological comparison. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, n.1, p.155-158, 2009.
- COSTA-PIERCE, B.A. Rapid evolution of an established feral tilapia (*Oreochromis* spp.): the need to incorporate invasion science into regulatory structures. **Biological Invasions**, v.5, p.71-84 2003.
- COUTINHO, C.; GOKHALE, K.S. Selected oxidative enzymes and histopathological changes in the gills of *Cyprinus carpio* and *Oreochromis mossambicus* cultured in secondary sewage effluent. **Wat. Res.**, v.34, n.11, p.2997-3004. 2000.
- DUTTA, H.M. A composite approach for evaluation of the effects of pesticides on fish. In: (eds) MUNSHI, J.S.D.; DUTTA, H.M. **Fish morphology**. Science Publishers Inc. 1996.

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

FIGUEIREDO-FERNANDES, A., FONTAÍNHAS-FERNANDES A., MONTEIRO R., REIS-HENRIQUES M.A., ROCHA, E. Effects of the Fungicide Mancozeb on Liver Structure of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*: Assessment and Quantification of Induced Cytological Changes Using Qualitative Histopathology and the Stereological Point-Sampled Intercept Method. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.76, p.249–255. 2006.

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. **Pesqui. Vet. Bras.**, v.27, n.3, p.103–109, 2007a.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A.M., FONTAINHAS-FERNANDES, A.A., MONTEIRO, R.A.F., REIS-HENRIQUES M.A., ROCHA, E. Spatial relationships of the intrahepatic vascular–biliary tracts and associated pancreatic acini of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae): A serial section study by light microscopy. **Annals of Anatomy**, v.189, p.17-30. 2007b.

FONTANETTI, C.S.; CHRISTOFOLETTI, C.A.; PINHEIRO, T.G.; SOUZA, T.S.; PEDRO-ESCHER, J. Microscopy as a tool in toxicological evaluations. In: Méndez-Vilas, A.; Díaz, J. (Eds). **Microscopy: Science, Technology, Applications and Education**. Badajoz: Formatex, p.1002-1007. 2010.

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 case studies in Brazil. Vol. 3. Jaraguão/RS: Fundação Universidade Federal do Pampa, UNIKASSEL, p. 975-1006. 2012.

FRANÇA, J.K. **Toxicidade aguda e crônica do permanganato de potássio em *Oreochromis niloticus*, *Ceriodaphnia dubia* e *Pseudokirchneriella subcapitata***. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 2009.

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

- GIANCHINI, C.F.; FERRAZ, M.V. Benefícios da Utilização de vinhaça em Terras de Plantio de Cana-de-açúcar - Revisão de Literatura. São Paulo: **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**. Ano VII, n.15. 2009.
- HAMPTON, J.A.; LANTZ, R.C.; GOLDBLATT, P.J.; LAURÉN, D.J.; HINTON, D.E. Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) liver. The biliary systems. **Anat. Record.**, n.2, p.619-634, 1988.
- HANDY, R. D., T. RUNNALLS AND P. M. RUSSELL. Histopathologic biomarkers in three spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, from several rivers in Southern England that meet the Freshwater Fisheries Directive. **Ecotoxicology**, v.11, p.467-479. 2002.
- HATANAKA, J., DOKE, N., HARADA, T., AIKAWA, T., ENOMOTO, M. 1982. Usefulness and rapidity of screening for the toxicity and carcinogenicity of chemicals in medaka, *Oryzias latipes*. **Jpn. J. Exp. Med.**, v.52, p.243-253. 1982.
- HEALTH, A.G. **Water Pollution and Fish Physiology**. 2<sup>a</sup> ed. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, FL. p.125-140. 1995.
- HIBIYA, T. **An atlas of fish histology, normal and pathological features**. New York: Gustav Fischer Verlag, 1982.
- HILDEBRAND, M. **Análise da estrutura dos vertebrados**. Oliveira, A.M.S. et al. (Trads.) Atheneu. 1995.
- HINTON, D.E., BAUMANN, P.C., GARDNER, G.C., HAWKINS, W.E., HENDRICKS, J.D., MURCHELANO, R.A., OKIHIRO, M.S. Histopathologic Biomarkers. 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, p.155-210. 1992.
- HINTON, D.E.; LAURÉN, D.J. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potencial biomarkers of exposure. In: J.F. MCCARTHY AND L.R. SHUGGART (Eds.). **Biom. Of Environ. Contamin.** Lewis Publisher, Boca Raton, Florida, p.17-57, 1990.
- HOOVER, K. L. **Use of small fish species in carcinogenicity testing**. Proceedings of Symposium. National Cancer Institution Monographs No. 65, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, p.409. 1984.
- HUGGETT, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE, P.M.; BERGMAN, H.L. **Biomarkers, biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, 347p, 1992.

JIRAUNGKOOSKUL, W. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Sci. Ásia.**, v. 28, n. 2, p. 121-127, 2002.

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

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

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.

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

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

MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E; SHIBATTA, O.A; PIMENTA, J.A. (Eds.) **A Bacia do Rio Tibagi**. Londrina, Edição dos Editores. v.29, p. 551-577, 2002.

MINISSI, S.; LOMBI, E. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. **Mutation Research**, v.393, p.17-21. 1997.

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.

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.

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

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; PEDINI, M. Situação atual da Aquicultura brasileira e Mundial.. In: VALENTI, C.V.; POLI, C,R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.B. **Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPQ /Ministério da Ciência e Tecnologia, p.354-381. 2000.

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

PEDROSA, E.M.R.; ROLIM, M.M.; ALBUQUERQUE, P.H.S.; CUNHA, A.C. Supressividade de nematóides em cana-de-açúcar por adição de vinhaça ao solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.9, p.197-201, 2005.

PEREIRA, B.F. Histologia comparada de brânquias, fígado e sangue em peixes da espécie *Prochilodus lineatus*, expostos a águas contaminadas. 2009. 71 p. Disponível em: <[http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/tcc/brc/3142/2009/pereira\\_bf\\_tcc\\_rcla.pdf](http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/tcc/brc/3142/2009/pereira_bf_tcc_rcla.pdf)>. Acesso em: 25 de julho de 2011.

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

RAPPAPORT, A.M.; BOROWY, Z.J.; LOUGHEED, W.M.; LOTTO, W.N. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. **Anat Rec.**, n.119, p.11-33, 1954.

RIBEIRO, B.T.; LIMA, J.M.; JULIÃO, L.G.F. Influência da vinhaça na adsorção e dessorção de Cd e Pb em um cambissolo. **XXXI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**, 2007.

RODRIGUES, A. C. F. **Estudo de variações bioquímicas e morfológicas induzidas por pesticidas organofosforado e carbamato em tilápia (*Oreochromis niloticus*) e cascudo (*Pterygoplichthys anisitsi*), como biomarcadores de contaminação ambiental**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto. 2009.

RODRIGUES, E.L. **Alterações morfológicas em hepatócitos de Brachydanio rerio (Hamilton- Buchanan, 1822, 1823) exposto à ação do organofosforado Dimetoato 500 em dose subletal**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná. 1994.

ROTTA, M.A. **Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura**. 1<sup>a</sup> Ed. Embrapa Pantanal, 48p. 2003.

SILVA, M.A.S.; GRIEBELER, M.P.; BORGES, L.C. Uso da vinhaça e impacto nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.11, n.1, p.108-114, 2007.

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

SRIVASTAVA, N.; SAHAI, R. Effects of distillery waste on the performance of *Cicer arietinum* L. **Environmental Pollution**, v. 43, p. 91-102, 1987.

STARLING, F. L. R. M. **Development of biomanipulation strategies for the remediation of eutrofication problems in an urban reservoir, Lago Paranoá, Brazil**. PhD Thesis. University of Starling, Scotland. 1998.

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

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

TANAKA, P.R. **O papel das tilápias (*Oreochromis niloticus*) no ciclo do fósforo no Lago Azul (Rio Claro-SP)**. 40f. Monografia. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.206-221, 2000.

UNICA – União da Indústria da cana-de-açúcar do estado de São Paulo. **Produção de álcool do Brasil**. UNICA, 2007. Disponível em: <<http://www.portalunica.com.br/portalunica/index.php?Secao=referência&SubSecao=estatísticas&SubSacao=produção20Brasil&id=%20and%id=9>>. Acesso em: 10/12/12.

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.

VAN DICK, J.C.; PIETERSE, G.M.; VAN VUREN, J.H.J. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.66, p.432-440. 2007.

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

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

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**. v. 77, p. 591-625, 1997.

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

YLDIRIM, M.Z.; BENLI, A.Ç.K.; SELVI, M.; ÖZKUL, A.; ERKOÇ, F.; KOÇAK, O. Acute Toxicity, Behavioral Changes, and Histopathological Effects of Deltamethrin on Tissues (Gills, Liver, Brain, Spleen, Kidney, Muscle, Skin) of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Fingerlings. **Environmental Toxicology**, v.21, p.614-620, 2006.

ZIMMERLI, S.; BERNET, D.; BURKHARDT-HOLM, P.; SCHIMDT-POSTHAUS, H.; VONLANTHEN, P.; WAHLI, T.; SEGNER, H. Assessment of fish health status in four Swiss rivers showing a decline of brown trout catches. **Aquatic Sciences**, v.69, p.11–25. 2007.