
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DOS IMPACTOS GERADOS PELA VINHAÇA BRUTA E
APÓS AJUSTE DE pH, EM REPRESENTANTES DA FAUNA EDÁFICA**

CRISTINA MOREIRA DE SOUSA

Novembro - 2018

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DOS IMPACTOS GERADOS PELA VINHAÇA BRUTA E
APÓS AJUSTE DE pH, EM REPRESENTANTES DA FAUNA EDÁFICA**

CRISTINA MOREIRA DE SOUSA

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

**Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Câmpus de Rio
Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do
título de doutor em Ciências
Biológicas (Biologia Celular e
Molecular).**

**Rio Claro
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro - 2018**

M838a Moreira-de-Sousa, Cristina
Avaliação dos impactos gerados pela vinhaça bruta e após
ajuste de pH, em representantes da fauna edáfica / Cristina
Moreira-de-Sousa. -- Rio Claro, 2018
176 p. : tabs., fotos

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

1. Bioindicadores de solo. 2. Testes ecotoxicológicos. 3.
Ultraestrutura. 4. Imunohistoquímica. 5. Morte celular. I.
Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS IMPACTOS GERADOS PELA VINHAÇA BRUTA E APÓS AJUSTE DE PH, EM REPRESENTANTES DA FAUNA EDÁFICA

AUTORA: CRISTINA MOREIRA DE SOUSA

ORIENTADORA: CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

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



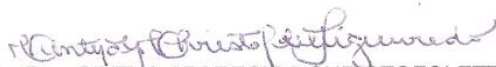
Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI
Departamento de Biologia / IB Rio Claro



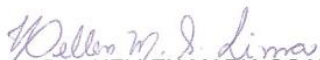
Prof. Dr. RAFAEL NEODINI REMEDIO
Departamento de Ciências da Saúde / UFLA - Universidade Federal de Lavras



Profa. Dra. ANA MARIA COSTA LEONARDO
Departamento de Biologia / IB Rio Claro



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



Profa. Dra. HELLEN MARIA SOARES LIMA
x / UFSCar, Campus Sorocaba

Rio Claro, 28 de setembro de 2018

Título alterado para: "Avaliação dos impactos gerados pela vinhaça bruta e após ajuste de pH, em representantes da fauna edáfica"

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus que me concedeu a oportunidade de estudo, aprendizado e amadurecimento, pessoal e profissional; que me amparou em todos os obstáculos que encontrei e colocou na minha vida as melhores pessoas que eu poderia encontrar.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Rio Claro, ao Instituto de Biociências, ao Departamento de Biologia, aos Laboratórios de Histologia, Microscopia Eletrônica e ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) pelo acolhimento e auxílio em minhas pesquisas e por fornecerem a estrutura necessária para a realização deste trabalho.

Agradeço à CAPES, pois o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; ao PDSE pela bolsa de estudo e oportunidade de realização de parte da pesquisa deste trabalho no exterior. À Universidade de Coimbra e ao Laboratório de Ecologia e Ecotoxicologia de Solos por me acolherem, me ensinarem com paciência e tornarem possível a realização dos experimentos.

À professora Dra. Carmem S. Fontanetti Christofolletti, que me recebeu nesta Universidade há 11 anos. Minha gratidão é imensa, e esta vida não será suficiente para expressá-la, pois os ensinamentos foram muito além do acadêmico. Muito obrigada pela paciência, por todas as conversas, risadas, orientação, aventuras, pela grande amizade e por ter me concedido o privilégio de trabalhar durante estes anos ao seu lado.

Ao Prof. Dr. José Paulo Sousa e ao Dr. Tiago Natal-da-Luz por tornarem possível a realização dos experimentos na Universidade de Coimbra.

Aos meus pais, Abigail e Francisco (*in memoriam*) pelo apoio e encorajamento. Ao meu irmão Fernando por cuidar de mim e sempre me animar.

Aos meus grandes e maravilhosos amigos do grupo de pesquisa da Profa Dra Carmem, o melhor grupo do mundo! Aos que já seguiram seus caminhos por outras Universidades e trabalhos, e aos que ainda permanecem: Cintya Aparecida Christofolletti, Annelise Francisco, Júlia Fernanda Urbano Marinho, Tamaris Gimenez Pinheiro, Raphael Baston de Souza, Vinícius Daguanu Gastaldi, Yadira Ansoar Rodríguez, Camila Garcia, Louise Idalgo Vasques, Luiza Sardinha, Maria Paula Coelho Mancini, Mônica Santos, Ana Cláudia de Castro Marcato, Cleiton Pereira de Souza, Jorge Evangelista Correia, Thays Guedes.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, à secretária Cristiane Miléo, aos técnicos dos laboratórios Gerson Mello Souza, que sempre tornou os trabalhos mais alegres,

Mônika Iamonte, Antonio Yabuki e Priscila Cintra Socolowski pelo grande auxílio nos experimentos.

Aos presentes que Deus me deu em forma de melhores amigos: Keyla Carolina Boralli Benoti, Luciana Nunes Silva, Cintya Christofolletti, Dalton Fazanaro e sua família maravilhosa, Junior Gonçalves, Vanessa Ribeiro e Hellen Soares Lima, muito obrigada a todos vocês pela amizade singular e por serem luz quando eu precisei.

Abençoemos aqueles que se preocupam conosco, que nos amam, que nos atendem as necessidades. Valorizemos o amigo que nos socorre, que se interessa por nós, que nos escreve, que nos telefona para saber como estamos. A amizade é uma dádiva de Deus. Mais tarde, haveremos de sentir falta daqueles que não nos deixaram experimentar solidão.

O rio e o oceano

Diz-se que, mesmo antes de um rio cair no oceano ele treme de medo.

*Olha para trás, para toda a jornada, os cumes, as montanhas,
o longo caminho sinuoso através das florestas, através dos povoados,
e vê à sua frente um oceano tão vasto que entrar nele nada mais é*

do que desaparecer para sempre.

Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar. Ninguém pode voltar.

Voltar é impossível na existência. Você pode apenas ir em frente.

O rio precisa se arriscar e entrar no oceano. E somente quando ele entra no oceano

é que o medo desaparece.

Porque, apenas então, o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano.

Mas tornar-se oceano, Por um lado é desaparecimento e por outro lado é renascimento.

*Assim somos nós. Só podemos ir em frente e arriscar. Coragem!! Avance firme e
torne-se Oceano!!*

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas mundialmente difundida e a alta produtividade resulta na geração de inúmeros resíduos. A vinhaça, resíduo da produção do etanol tem chamado a atenção devido suas características e propriedades, quando empregada na fertirrigação das culturas de cana-de-açúcar. Diversos benefícios foram descritos, ganhos na fertilização e enriquecimento do solo, bem como aumentos na produtividade. Entretanto, a vinhaça também apresenta substâncias que podem ser nocivas, afetando negativamente a fauna existente nos locais de aplicação do resíduo. Frente a essa problemática, diversos estudos foram desenvolvidos com o intuito de melhor compreender os impactos da vinhaça no meio ambiente e, mesmo diante dos benefícios que a fertirrigação com a vinhaça implica economicamente ainda há a necessidade de maiores cuidados com a utilização do resíduo no campo. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi propor um tratamento para a vinhaça, ajustando seu pH em 7,0 (neutro) utilizando cal (CaO), com a intenção de amenizar sua toxicidade para posterior uso no solo, visto que, um dos grandes problemas apresentados pela vinhaça é o pH ácido. O uso de cal foi escolhido por ser este produto utilizado em campo para correção do solo. Foi associado o uso de diversos biomarcadores à bioindicadores de solo, além de testes ecotoxicológicos para avaliar o efeito da vinhaça bruta em comparação à vinhaça tratada. Diplópodos da espécie *Rhinocricus padbergi* foram expostos à vinhaça em sua forma bruta e tratada com CaO, na concentração estabelecida pela Norma da CETESB, e ao dobro desta mesma concentração, simulando uma situação de super dosagem. A análise do intestino médio destes animais por meio das ferramentas ultraestruturais, imunohistoquímica e marcação de morte celular revelou que a vinhaça bruta pode ocasionar danos nos tecidos dos animais expostos e que o tratamento desta vinhaça surtiu efeito na diminuição desses danos. Testes ecotoxicológicos de fuga e reprodução, padronizados mundialmente pela Organização Internacional de Normalização (ISO), foram realizados com as espécies *Eisenia andrei*, *Enchytraeus crypticus* e *Folsomia candida*; de um modo geral, observou-se que as espécies *E. crypticus* e *F. candida* não tiveram seus comportamentos influenciados pela vinhaça bruta e nem pela vinhaça tratada, mas a espécie *E. andrei* apresentou-se mais sensível a presença da vinhaça no solo demonstrando comportamento de fuga em concentrações mais elevadas de vinhaça bruta e tratada, e, no teste de reprodução, respondeu a exposição à vinhaça tratada, com aumento no número de juvenis em relação a vinhaça bruta. Logo, o emprego da vinhaça na fertirrigação ainda requer cuidados, uma vez que seus efeitos nocivos são notórios, e nesse sentido, a alternativa de neutralizar seu pH pode representar uma medida de emprego desse resíduo com menos impacto.

Palavras-chave: bioindicadores de solo; testes ecotoxicológicos; ultraestrutura; imunohistoquímica; morte celular.

ABSTRACT

Sugarcane is one of the main crops worldwide and the high productivity results in the generation of many wastes. Vinasse, the residue of ethanol production, has attracted attention because of its characteristics and properties, when used in the fertirrigation of sugarcane crops. Several benefits have been described, gains in fertilization and soil enrichment, as well as increases in productivity. However, the vinasse also presents substances that can be harmful, negatively affecting the fauna existing in the places of application of the residue. Faced with this problem, several studies were developed with the purpose of better understanding the impacts of vinasse in the environment and, even in view of the benefits that fertirrigation with vinasse implies economically, there is still a need for greater care with the use of the residue in the field. In this context, the objective of this work was to propose a treatment for vinasse, adjusting its pH to 7.0 (neutral) using lime (CaO), with the intention of mitigating its toxicity for later use in the soil, since one of the great problems presented by vinasse is acid pH. The use of lime was chosen because this product is used in field for soil correction. It was associated the use of several biomarkers to soil bioindicators, as well as ecotoxicological tests to evaluate the effect of raw vinasse in comparison to the treated vinasse. Diplopods of the species *Rhinocricus padbergi* were exposed to vinasse in their raw form and treated with CaO, at the concentration established by the CETESB Standard, and at twice the same concentration, simulating a super dosage situation. The analysis of the midgut of these animals using ultrastructural tools, immunohistochemistry and cell death marking revealed that raw vinasse can cause damage to the tissues of the exposed animals and that the treatment of this vinasse had an effect in reducing these damages. Ecotoxicological tests of the avoidance and reproduction tests, standardized worldwide by the International Organization for Standardization (ISO), were carried out with the species *Eisenia andrei*, *Enchytraeus crypticus* and *Folsomia candida*; in general, *E. crypticus* and *F. candida* were not influenced by raw vinasse or treated vinasse, but the *E. andrei* species was more sensitive to the presence of vinasse in the soil, demonstrating in the higher concentrations of raw and treated vinasse, and in the reproduction test, the exposure to treated vinasse responded, with an increase in the number of juveniles in relation to raw vinasse. Therefore, the use of vinasse in fertigation still requires care, since its harmful effects are notorious, and in this sense, the alternative of neutralizing its pH can represent a measure of the use of this residue with less impact.

Keywords: soil bioindicators; ecotoxicological tests; ultrastructure; immunohistochemistry; cell death.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2.REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	12
2.1.1 RESPOSTAS DE DIFERENTES ORGANISMOS BIOINDICADORES EXPOSTOS À VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	15
2.2 ORGANISMOS BIOINDICADORES.....	17
2.2.1 DIPLÓPODOS.....	18
2.2.2 MINHOCAS.....	19
2.2.3 ENQUITRÉIDEOS.....	21
2.2.4 COLÊMBOLOS.....	23
2.3 ECOTOXICOLOGIA E SUAS FERRAMENTAS DE ANÁLISES.....	24
2.3.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	25
2.3.2 HSP70 (HEAT SHOCK PROTEIN 70).....	26
2.3.3 MÉTODO DE TUNEL (TERMINAL DEOXYNUCLEOTIDYL TRANSFERASE-MEDIATED DUTP NICK END LABELING).....	41
2.3.4 TESTES DE FUGA E REPRODUÇÃO.....	42
3. OBJETIVOS	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	43
4.2 SOLO PARA MONTAGEM DOS BIOENSAIOS COM DIPLÓPODOS.....	44
4.3 SOLO PARA OS TESTES DE FUGA E REPRODUÇÃO	44
4.4 VINHAÇA BRUTA.....	46
4.5 VINHAÇA TRATADA.....	45
4.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA VINHAÇA BRUTA E DO SOLO.....	48
4.7 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SOLO PARA BIOENSAIOS COM <i>R. PADBERGI</i>	48
4.8 TESTE DE TOXICIDADE EM <i>R. PADBERGI</i>	49
4.8.1 ULTRAESTRUTURA.....	49
4.8.2 IMUNOMARCAÇÃO DA PROTEÍNA HSP70 (IMUNO-HISTOQUÍMICA).....	50
4.8.3 MÉTODO DE TUNEL (TERMINAL DEOXYNUCLEOTIDYL TRANSFERASE-MEDIATED DUTP NICK END LABELING).....	50
4.9 TESTES DE FUGA COM <i>E. ANDREI</i> E <i>F. CANDIDA</i>	52
4.10 TESTES DE REPRODUÇÃO COM <i>E. ANDREI</i> , <i>E. CRYPTICUS</i> E <i>F. CANDIDA</i>	56
5. RESULTADOS	62
5.1 ARTIGO 1.....	63
5.2 ARTIGO 2.....	95
5.3 ARTIGO 3.....	126
6.CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	157
7. REFERÊNCIAS	159

1. INTRODUÇÃO

O gerenciamento dos resíduos agroindustriais representa, desde há muito tempo, um grande desafio diante da preocupação com o meio ambiente. As consequências do despejo inadequado e indiscriminado de muito efluentes acarretam sérios problemas de poluição, visto que cada efluente industrial apresenta propriedades, bem como impactos específicos na biota (SRIVASTAVA; SAHAI, 1987).

O Brasil é um dos maiores produtores de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) do mundo, segundo a UNICA (União da Indústria da Cana-de-Açúcar). O país possui atualmente 430 usinas operantes, as quais adotaram novas tecnologias desde o plantio até a produção de açúcar, etanol e bioeletricidade, fortalecendo cada vez mais o setor e ganhando reconhecimento mundial. Os noticiários relacionados à safra 2017/18 apontam que o volume fabricado de etanol totalizou 25,27 bilhões de litros (UNICA, 2018); isso demonstra que essa grande produção certamente gera grandes quantidades de resíduos e coloca o país em uma situação preocupante diante da destinação dos resíduos dessa produção.

A produção do etanol gera como resíduo a vinhaça e para cada litro de etanol são produzidos de dez a dezoito litros deste resíduo, quantidade que depende da tecnologia utilizada nas usinas ou destilarias (SILVA et al. 2007; BARROS et al., 2010); a composição química é bastante variável, dependendo principalmente da composição do mosto; é caracterizado como um efluente de destilarias com alto poder poluente e alto valor fertilizante; sua força poluente é cerca de cem vezes a do esgoto doméstico, decorrente da sua riqueza em matéria orgânica (SILVA et al. 2007; CABELLO et al., 2009).

Diante do grande volume de vinhaça gerado no decorrer da história da indústria sucroalcooleira foi necessária a criação de alternativas de utilização da mesma, uma vez que, quantidades consideráveis eram lançadas anteriormente em corpos d'água, e ocasionaram graves problemas de poluição (DEMATTE et al., 2004). Desde 1978, há no Brasil uma Portaria do Ministério do Estado do Interior (n. 323, de 1978) que proibiu, a partir da safra de 1979/1980, o lançamento direto de vinhaça em qualquer corpo hídrico pelas destilarias de álcool instaladas no país. Tal portaria exigiu que as usinas apresentassem projetos para implantação de sistemas adequados de tratamento e/ou utilização da vinhaça, visando o controle da poluição hídrica e um melhor destino para o resíduo.

Deste modo foram estudadas as possibilidades de reciclar a vinhaça em processos de fermentação, práticas como fertirrigação, concentração por evaporação, aproveitamento da mesma na produção de leveduras, uso na produção de energia, além das propostas de tratamento da vinhaça com cal hidratada ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) e bicarbonato de sódio (NaHCO_3), com as finalidades de neutralizar a acidez, bem como a utilização como matéria-prima para ração animal (ROBERTIELLO, 1982; DÖLL; FORESTI, 2010). Dentre todas as alternativas de utilização da vinhaça a que ganhou maior destaque foi a fertirrigação, prática amplamente difundida nas regiões canavieiras, com resultados satisfatórios em relação ao aumento na produtividade.

Os relatos da literatura apontam que a utilização da vinhaça em culturas exhibe duas vertentes importantes a serem consideradas: a primeira, que defende o uso da vinhaça, alegando que este resíduo apresenta valor fertilizante quando aplicado ao solo, promovendo melhorias e enriquecimento do mesmo, bem como aumento na produtividade; a segunda apresenta os aspectos negativos da utilização da vinhaça devido ao seu alto poder poluente e os inúmeros malefícios que pode gerar quando em contato com a flora, fauna e macrofauna (FEIGIN et al., 1991; FREIRE; CORTÊZ, 2000; MEDEIROS et al., 2003; BEBÉ et al., 2009; ESPAÑA-GAMBOA, 2011).

A prática da fertirrigação, mesmo sendo bem sucedida do ponto de vista agrônomo e econômico, requer alguns cuidados, pois as quantidades de vinhaça depositadas no solo não devem ultrapassar a capacidade de retenção de íons que este possui; as dosagens devem ser mensuradas de acordo com as características de cada solo. Por essa razão foi elaborada a Norma Técnica P4.231 (CETESB-Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2015), que estabelece os critérios e os procedimentos para uma aplicação segura da vinhaça ao solo.

Contudo, o alerta de inúmeros estudos em relação ao uso da vinhaça na fertirrigação ainda reflete discordância entre os benefícios os impactos provocados por este uso, o que inviabiliza a aplicação do resíduo ao solo como uma prática plenamente segura, devido às desvantagens que apresenta. Os testes que já foram realizados, bem como os que continuam sendo realizados, com diferentes tipos de bioindicadores, ainda demonstram consequências consideráveis que o contato com a vinhaça pode provocar (CHRISTOFOLETTI et al., 2013a; 2013b; 2016; MARINHO et al., 2014; PEDRO-ESCHER et al., 2014; 2016; CORREIA et al., 2017a; b; GARCIA et al., 2017; COELHO et al., 2017).

A utilização de organismos bioindicadores é um recurso muito bem vindo ao monitoramento ambiental, pois esta categoria de animais responde às alterações no ambiente por meio de reações comportamentais ou metabólicas, deste modo, refletem as mudanças na qualidade do ambiente em que vivem (MANGIÉRI JUNIOR, 2002). Devido a um estreito contato com solo, alguns grupos taxonômicos de invertebrados pertencentes à meso e macro-fauna, tais como, Isopoda, Collembola, Oligochaeta e Diplopoda, têm sido bem estabelecidos como organismos bioindicadores (FONTANETTI et al., 2011). Utilizar-se de diferentes espécies de animais pode fornecer para as análises uma visão ampla e ao mesmo tempo precisa, do quanto um agente estressor pode afetar os organismos nas diferentes camadas do solo, bem como de formas distintas em diferentes espécies de animais.

A associação de diferentes organismos bioindicadores com o emprego de diferentes ferramentas de análise torna-se bastante relevante, visto que irão refletir em resultados com maior complexidade. A microscopia eletrônica de transmissão, como instrumento de análise, demonstra como a ação estressora provocada, por resíduos lançados ao solo, pode influenciar na fisiologia de órgãos e tecidos, resultando em variações visíveis ao se analisar células e organelas (FONTANETTI et al., 2012).

O uso de biomarcadores moleculares no monitoramento do ambiente também apresenta excelentes resultados, pois é uma ferramenta significativa para a avaliação da contaminação em diferentes organismos, fornecendo bons indícios qualitativos dos danos causados por determinados poluentes (FONTANETTI et al., 2011); a utilização das proteínas de choque térmico, as HSPs (“Heat Shock Protein”), especificamente a HSP70, têm sido empregada para estas avaliações com sucesso, demonstrando interferências mais específicas, que o contato com poluentes pode provocar na fisiologia celular (KÖHLER et al., 1996; ZANGER et al., 1996; NADEAU et al., 2001; PIANO et al., 2004; SILVA-ZACARIN et al., 2006).

O teste de TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP nick end labeling) é uma técnica frequentemente utilizada para detecção e quantificação de morte celular programada (apoptose ou autofagia), que confirma a fragmentação do DNA e verifica o tipo de morte celular, sendo aplicada em diversos trabalhos com intuito de investigar quais fatores desencadearam a morte celular programada, além de representar uma ferramenta excelente na investigação de alterações celulares provocadas pelo contato com agentes poluentes (LABAT-MOLEUR et al., 1998;

JACOBSON et al., 1997; SÁNCHEZ-TORRES; VARGAS, 2003; WILLINGHAM, 1999; SCUDELER; SANTOS, 2013).

Testes de fuga e os testes de reprodução representam importantes ferramentas de varredura em estudos de análise de risco ecológico em ambientes tropicais, embora ainda sejam pouco utilizados no Brasil, estes estudos são excelentes formas para avaliar os efeitos da alteração que resíduos orgânicos podem promover no solo, pois estes são testes biológicos sensíveis aos poluentes em baixas concentrações e interações, os quais muitas vezes não são detectados por análises químicas de rotina (MOREIRA et al., 2008; SANTANA et al., 2009; SOUZA et al., 2013), e além disso apresentam padronização internacional dos testes para diversos organismos bioindicadores (ISO 17512-1; ISO 17512-2; ISO 11267; ISO 11268-2), assegurando a viabilidade e confiabilidade dos resultados (SCHAEFER, 2003; NATAL-DA-LUZ et al., 2004; HÖSS et al., 2012).

Face ao exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os impactos causados pela vinhaça bruta e compará-los com os obtidos com vinhaça após ajuste de pH, em diferentes organismos bioindicadores, submetidos a diferentes técnicas de análise, propondo uma alternativa viável e com menos impactos para utilização da vinhaça na fertirrigação. O processo de calagem na cana-de-açúcar é a primeira prática adotada na implantação e manutenção da lavoura devido a diversos efeitos benéficos que proporciona na cultura (FERRAZ et al., 2015), por esta razão a cal foi utilizada para neutralizar o pH da vinhaça.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Vinhaça de cana-de-açúcar

Líquido residual gerado a partir da calda de destilação do licor de fermentação do álcool de cana-de-açúcar, a vinhaça é também conhecida, em várias regiões do Brasil, por restilo, vinhoto, mosto, dunder ou garapão (CHRISTOFOLETTI et al., 2016).

Este subproduto gerado, principalmente, da indústria sucroalcooleira, apresenta-se geralmente ácido, com pH em torno de 3,5 a 5; de coloração parda clara, que escurece e torna-se castanho-escuro em razão da oxidação resultante do processo de fermentação; odor forte e altos índices de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) (SILVA et al., 2014; PEDRO-ESCHER et al., 2016; CORREIA et al., 2017a). O efluente é composto de 93% de água e 7% de sólidos,

desses sólidos, cerca de 75% são matéria orgânica, a qual é formada de ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares, polissacarídeos, proteínas e, íons, sendo as maiores concentrações de potássio, cálcio e magnésio, seguido por sais de sulfato, cloreto, fosfato (fósforo) e nitrato, e, em menor concentração, metais traço; sua graduação alcoólica não é superior a 0,03°GL e a condutividade elétrica é elevada (ARAUJO; OLIVEIRA, 2016; OBONO et al., 2016; ALFARO-SOTO et al., 2017).

A composição quantitativa da vinhaça pode variar em função do tempo, índice de maturação, tipo de solo e da matéria prima utilizada para produção de etanol, além de fatores como a natureza da composição dos vinhos, o sistema de fermentação, o tipo de levedura utilizada, o tipo de tratamento das leveduras, os aditivos utilizados na fermentação, os aparelhos utilizados na destilação, a qualidade da água usada, bem como, os componentes utilizados para desinfecção (ARAUJO; OLIVEIRA, 2016).

Com efeito, as características da vinhaça bruta viabilizam que sua aplicação na fertirrigação de culturas possa alterar as características do solo, por meio de modificações em suas propriedades físicas, químicas e hidráulicas.

Fisicamente, as alterações do solo são dependentes do tipo de solo, logo a presença da vinhaça pode atuar como dispersante ou floculante de partículas, efetuando mudanças na estrutura e apresentando variações de diversos parâmetros, como por exemplo, a distribuição granulométrica, permeabilidade do solo, plasticidade, densidade, entre outros. Quimicamente as alterações provocadas pela vinhaça no solo podem ser verificadas em características como: pH do solo; potencial redox (Eh) da solução intersticial; teores de sais; concentração de matéria orgânica (DBO e DQO); capacidade de troca catiônica (CTC); concentração de metais tóxicos como cádmio, chumbo, cobre, cromo e níquel; concentração de amônia; entre outros (ALFARO SOTO et al., 2017).

Sabe-se que a condutividade hidráulica nos solos é dependente de fatores como a textura, a estruturação e composição da solução do solo, do complexo de troca catiônica, das atividades microbianas, bem como da presença de ar, entre outros. Diante das características químicas e físicas que a vinhaça apresenta, sua presença no solo pode trazer consequências no processo de movimentação da solução água/vinhaça no meio poroso por meio da variação de alguns desses parâmetros. Dados na literatura sobre a condutividade hidráulica em solos que receberam vinhaça são escassos, no entanto alguns autores afirmam que em solos com textura média a aplicação da vinhaça pode

resultar no aumento da condutividade hidráulica, enquanto que em solos de textura fina pode ocorrer o efeito contrário (ALFARO SOTO et al., 2017).

Os mesmos autores apontam que as consequências ao meio ambiente geradas pelo desequilíbrio nas propriedades do solo, envolvem problemas de contaminação do próprio solo e de águas subterrâneas e superficiais, além da salinização do solo e da água, como também interfere na dinâmica da água, em processos de escoamento superficial, evapotranspiração e infiltração, comprometendo suas propriedades mecânicas, como resistência e deformação de solos saturados ou não saturados.

Mesmo que o solo apresente uma capacidade de atenuação natural dos poluentes, essa característica pode se tornar comprometida pela complexidade das interações entre a composição e a frequência de aplicação do resíduo com as interações físicas, químicas e biológicas do solo (LYRA, 2008).

Em virtude disso, pesquisadores lançam um alerta não só para aplicação de altas doses de vinhaça no solo, como também os riscos que a aplicação da mesma por longo período de tempo pode ocasionar. Quantidades desproporcionais de cálcio, magnésio e potássio desencadeiam desequilíbrios nutricionais à cultura; o excesso de potássio da solução do solo acentua um efeito inibitivo de absorção de cálcio e magnésio, como resultado desse desequilíbrio catiônico ocorre aumento da condutividade elétrica e da pressão osmótica da solução do solo (PRADO, 2008). Esta situação agrava-se na medida em que a cana-de-açúcar apresenta naturalmente uma baixa capacidade de troca de cátions nas raízes, característica da família Poaceae, e isso acarreta uma maior absorção de cátions monovalentes (FIGUEIREDO, 2010).

Somado aos efeitos negativos do longo tempo da aplicação de vinhaça no solo, o aumento da condutividade elétrica e excesso de potássio em solução, exhibe um quadro comprometedor para a produtividade e qualidade da matéria-prima canavieira. Isto porque, em virtude da redução do potencial hídrico da solução do solo, motivada pelo aumento da concentração iônica em solução, a planta passa a desprender mais energia para absorção de água e nutrientes.

Logo, esse gasto energético adicional pode afetar negativamente seu crescimento e desenvolvimento, além de, promover maior sensibilidade da cultura ao déficit hídrico em períodos de estiagem. As consequências se estendem ainda na diminuição nos teores de lignina e com isso aumento da incidência de acamamento nas áreas canavieiras, redução nos teores de sacarose no caldo e elevação dos teores de cinzas que interferem na qualidade do açúcar produzido (MORAES et al., 2015).

Já a contaminação de águas subterrâneas pela vinhaça está estritamente relacionada ao tipo e condição do solo local, à profundidade do lençol freático, à proximidade de nascentes, além da capacidade de absorção do solo (KIANG et al., 2017). Uma vez contaminados, as possibilidades de reversão dos lençóis freáticos são pequenas, além do que a vinhaça apresenta nocividade elevada para grandes animais aquáticos, afugenta a fauna marítima da costa brasileira para o processo de desova e destrói a microflora, microfauna, plantas aquáticas submersas e flutuantes (ARAUJO; OLIVEIRA, 2016).

O descarte da vinhaça no solo, mesmo diante de todas as contrariedades, ainda tem sido considerada a alternativa menos poluente, ao passo que estudos relacionados à lixiviação e contaminação de águas subterrâneas a partir da fertirrigação com a vinhaça demonstram que não há impactos danosos, desde que, as aplicações sejam inferiores a $300\text{m}^3/\text{ha}$ (MORINI et al., 2017). Quando aplicada adequadamente, cerca de $150\text{m}^3\text{ha}^{-1}$ de vinhaça equivale a uma adubação de 61kg ha^{-1} de nitrogênio, 343kg ha^{-1} de potássio e 108kg ha^{-1} de cálcio (MEDEIROS et al., 2003), e isso representa satisfatoriedade em face do ponto de vista econômico e agrônômico.

Para tanto, a fertirrigação por vinhaça no estado de São Paulo é regulamentada pela norma técnica P4.231/2015 (Vinhaça-Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola) da CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo), agência ambiental vinculada à Secretaria Estadual do Meio Ambiente. A norma define regras de aplicação da vinhaça em vários aspectos, ou seja, impedindo a aplicação da mesma em áreas de risco; estabelecendo dosagens permitidas; exigindo que sejam mantidas as concentrações de potássio pré-estipuladas em função do tipo de solo e variedade de cana-de-açúcar e estabelecendo que os tanques de armazenamento e drenos devam ser impermeáveis, impedindo contaminação dos solos e águas.

Ao que parece, o domínio desta técnica permanece em busca de aperfeiçoamento e requer maiores estudos, visto que de fato a vinhaça ainda apresenta riscos ambientais (OBONO et al., 2016).

2.1.1 Respostas de diferentes organismos bioindicadores expostos à vinhaça de cana-de-açúcar

Trabalhos utilizando-se tanto de animais bioindicadores, quanto de vegetais bioindicadores foram realizados com o intuito de se compreender melhor o impacto que

a vinhaça poderia provocar em contato com os mesmos. Abaixo segue alguns dos dados obtidos a partir da exposição a esse resíduo.

Christofoletti et al. (2013a) avaliaram o potencial tóxico de dois resíduos, dentre eles a vinhaça proveniente da indústria sucroalcooleira; foram utilizados como organismos biondicadores o vegetal *Allium cepa* e o milípede *Rhinocricus padbergi*. Os autores observaram que a vinhaça apresentou efeitos genotóxicos e mutagênicos em *A. cepa*, enquanto que os milípedes demonstraram um bioprocessamento dos metais provenientes do resíduo aplicado ao solo. Resultados genotóxicos semelhantes também foram observados por Pedro-Escher et al. (2016) em sementes de *A. cepa* após exposição em diferentes concentrações de vinhaça, calculadas a partir das diretrizes estabelecidas pela Norma P4. 231 (CETESB).

Foi demonstrado potencial mutagênico da vinhaça diluída no vegetal biondicador *Tradescantia pallida*; os autores sugeriram cautela na aplicação da vinhaça, mesmo sendo uma prática economicamente viável (PEDRO-ESCHER et al., 2014).

Marinho et al. (2014) expuseram tilápias à diferentes diluições de vinhaça com o intuito de avaliar a toxicidade da mesma em corpos hídricos. Os resultados demonstraram alterações significativas no fígado dos animais expostos ao resíduo. Diante dessas respostas os autores concluíram que a vinhaça apresenta um potencial tóxico e citotóxico dose-dependente, uma vez que o fígado é fortemente afetado quando exposto a esse contaminante.

Diplópodos expostos à vinhaça apresentaram comportamento de evitamento do solo, numa exposição de trinta dias, enquanto que nas exposições de sessenta e noventa dias os animais não sobreviveram. A análise de seus tecidos demonstrou danos morfológicos consideráveis (CHRISTOFOLETTI et al., 2016).

Correia et al. (2017a) realizaram análises histopatológicas nas brânquias de tilápias expostas à vinhaça, as quais demonstraram efeitos morfológicos severos provocados pelo resíduo.

Coelho et al. (2017) verificaram a marcação das proteínas de choque térmico HSP70 (responsáveis por reparos de danos celulares), no intestino médio de diplópodos expostos à vinhaça; como resultado os autores observaram que os animais apresentaram forte marcação da proteínas em regiões responsáveis pela proteção e desintoxicação do órgão.

2.2 Organismos bioindicadores

A utilização de organismos bioindicadores em testes ecotoxicológicos tem sido empregada com sucesso. O grupo de animais que se insere nessa categoria reflete a condição da fauna e flora, os aspectos físico-químicos do meio ambiente, bem como os impactos provocados sobre um habitat, comunidade ou ecossistema. As perturbações no ambiente podem ser observadas por meio de alterações nestes organismos, as quais podem ser de ordem genética, bioquímica, fisiológica, morfológica, ecológica ou comportamental; indicam diversos tipos de modificações antes que se agravem, além de determinar qual tipo de poluição pode afetar determinado ecossistema (RIBEIRO et al., 2003; BAGLIANO, 2012; VIEIRA et al., 2014).

Os bioindicadores podem ser classificados de acordo com as respostas que fornecem, sendo os seguintes: sentinelas: indicam níveis de degradação e preveem ameaças ao ecossistema; detectores: espécies locais que respondem a mudanças ambientais de forma mensurável; exploradores: reagem positivamente a perturbações ambientais; acumuladores: permitem a verificação de bioacumulação de substâncias/compostos; sensíveis: modificam acentuadamente o comportamento frente a qualquer agente contaminante/estressor (BAGLIANO, 2012; TOUROULT; LE GALL, 2013).

O uso de bioindicadores representa um método simples, rápido e de baixo custo; fornecem sinais rápidos sobre problemas ambientais; permitem que se identifiquem as causas e efeitos entre os agentes estressores e as respostas biológicas; oferecem um panorama da resposta integrada dos organismos e modificações ambientais; permite avaliar a efetividade de ações mitigadoras tomadas para contornar os problemas criados pelas ações antropogênicas (RIBEIRO et al., 2003).

Todos os grupos de seres vivos apresentam potencial bioindicador, entretanto os melhores organismos para o monitoramento biológico são os invertebrados, mais especificamente os macroinvertebrados, visto que são mais simples para se amostrar, são de extrema eficácia e possuem tolerância e sensibilidade variadas (BARBOSA, 2013).

A determinação das concentrações de poluentes em organismos como bioindicadores-sentinelas, por exemplo, é uma ferramenta útil, uma vez que fornece informações sobre a biodisponibilidade dos poluentes e o padrão de contaminação (NICHOLSON; LAM, 2005). O potencial bioindicativo de organismos pertencentes aos níveis tróficos mais baixos tem sido crescentemente estudado em avaliações dos

possíveis riscos ambientais associados com a transferência e biomagnificação dos poluentes ao longo das diferentes teias alimentares (VASSEUR; COSSU-LEGUILLE, 2006).

2.2.1 Diplópodos

Considerados importantes macroartrópodes do solo os diplópodos apresentam distribuição cosmopolita e podem ser encontrados em todas as regiões zoogeográficas, com exceção da Antártida (KIME; GOLOVATCH, 2000; HOFFMAN et al., 2002); de hábito noturno estes animais vivem em ambientes úmidos, sob folhas e troncos em decomposição (BRUSCA; BRUSCA, 2007). A maioria dos Diplopoda ocupa o nível trófico de decompositores e colonizam diferentes camadas do solo, o papel detritívoro dos milípedes torna-os animais essenciais e importantes intervenientes na ciclagem de nutrientes (FARFAN, 2010; CHRISTOFOLETTI et al., 2016).

A participação na ciclagem e disposição de nutrientes presentes na matéria orgânica em decomposição auxilia na humificação do substrato e formação da parte orgânica do solo, mantendo o solo saudável e produtivo (HOPKIN; READ, 1992; FRANCISCO; FONTANETTI, 2015). O conteúdo fecal destes animais promove a mineralização do solo, uma vez que secretam amônia e ácido úrico que, quando degradados, enriquecem o solo com nitratos (GODOY; FONTANETTI, 2010). O efeito da alimentação dos milípedes para os microrganismos do solo viabiliza a dinâmica de nutrientes presentes no mesmo possibilitando a biodisponibilidade de moléculas complexas para outros organismos (NIIJIMA, 1984; FARFAN, 2010).

Em alguns locais de ambientes tropicais, onde as minhocas são muitas vezes raras, os milípedes podem ser os principais formadores do solo (BRUSCA; BRUSCA, 2007). Deste modo, os diplópodos representam um dos principais componentes da fauna do solo envolvidos com a formação do solo, efetuando a desagregação de detritos, dentro do ciclo de decomposição (BUENO-VILLEGAS et al., 2004).

Nesse sentido, estudos foram realizados com o intuito de obter repostas no organismo dos diplópodos frente a agentes contaminantes/estressores e diante do conhecimento biológico da espécie *R. padbergi* somado as características que o grupo que esta classe de animais apresenta, os animais desta espécie tornaram-se uma grande aliada para análises da qualidade de solo.

Os diplópodos foram utilizados com sucesso como indicadores da presença de metais como cádmio, chumbo e zinco no solo (READ; MARTIN, 1990; KÖHLER;

ALBERTI, 1992; ZANGER et al., 1996), na avaliação de solos contendo biossólido, lodo de esgoto, vinhaça, herbicida trifluralina, solo industrial contaminado com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (SOUZA et al., 2011; MERLINI et al., 2012; CHRISTOFOLETTI et al., 2012; 2013a; b; 2016; COELHO et al., 2017) e, em virtude disso foram considerados organismos-teste fundamentais para realizar a avaliação das diferentes camadas do solo (SOUZA et al., 2013).

2.2.2 Minhocas

Minhocas representam cerca de 92% da biomassa de invertebrados presentes no solo; são organismos que participam ativamente do processo de formação do solo, da decomposição de resíduos de plantas, da ciclagem de nutrientes da matéria orgânica; melhoram a estrutura, fertilidade, porosidade, bem como a capacidade de infiltração, drenagem e retenção de água e de ar e, além disso, atuam no transporte de microrganismos e nutrientes por meio dos canais formados por suas escavações e deslocamentos no solo (HINTON, 2002; INGHAM, 2018). O consumo de matéria orgânica em diferentes estágios de decomposição possibilita as minhocas alterarem de forma significativa a dinâmica de decomposição e mineralização do solo (FRAGOSO et al. 1999; BROWN, DOMÍNGUEZ, 2010).

A ingestão de solo possibilita que no trato digestório das minhocas o processo digestivo resulte na adição de muco ao solo, agregando as partículas e modificando a matéria orgânica do solo tanto química, quanto fisicamente; a deposição do conteúdo fecal, contendo grandes concentrações de nutrientes, permite a formação de húmus, estabilizando os agregados do solo e aumentando sua fertilidade (SHIPITALO; LE BAYON 2004) e por estas razões são consideradas "engenheiras do ecossistema", representando um tipo de indicador-chave para a saúde do mesmo (NAHMANI et al., 2007).

Com efeito, o nicho ecológico e a importante posição trófica das minhocas nos níveis mais baixos das teias alimentares as caracterizam como organismos de fundamental importância no solo, na medida em que servem de alimento para vários animais representando um importante elo na cadeia trófica terrestre, pois constitui uma fonte de recurso para uma grande variedade de organismos, incluindo aves, mamíferos, répteis, anfíbios e insetos, bem como na cadeia aquática, podendo ser alimento para peixes e outros organismos (HINTON, 2002) e, conseqüentemente, representa uma rota de transferência e biomagnificação de contaminantes ao longo dessas teias (MARION et

al., 2012). Somado ao conhecimento sobre seus hábitos alimentares e habitats, esses animais são considerados excelentes bioindicadores de ecotoxicidade de substâncias no solo indicando a potencial bioacumulação ao longo das teias.

As minhocas se expõem e absorvem os contaminantes da solução do solo por meio de contato direto e passagem pela cutícula e a partir desse contato podem intoxicar-se, morrer ou sobreviver, incorporar ou até bioacumular esses poluentes em seus tecidos (BURGER, 2006; ANDRÉA, 2010).

São várias razões pelas quais as minhocas podem ser utilizadas para avaliação de contaminação de solos, pois além das características já mencionadas como a ingestão de solos, acumulação de poluentes presentes no solo, participação na reciclagem de nutrientes, estes animais são simples de serem estudados e mantidos em condições laboratoriais, viabilizando a realização de testes ecotoxicológicos (HINTON, 2002).

Nesse sentido, os testes de toxicidade utilizando-se de minhocas podem fornecer medidas diretas da biodisponibilidade dos poluentes ou agentes tóxicos e estabelecem ligações entre a contaminação local e os efeitos ecológicos adversos. São importantes nas avaliações de exposições agudas, sub-crônicas e crônicas, além de mensurar os efeitos biológicos resultantes dessas exposições, tais como, mortalidade, reprodução, crescimento e alterações comportamentais (LINFHURST et al., 1995).

As espécies *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei* foram criteriosamente estabelecidas para diversos testes de toxicidade para fins de registro de agrotóxicos junto aos órgãos regulamentadores mundiais (OECD-Organização Européia de Cooperação e Desenvolvimento Econômico; EPA -Agência Americana de Proteção do Ambiente; ISO-Organização Internacional para Padronização) e, inclusive no Brasil.

Testes de fuga, baseados na resposta comportamental das minhocas, têm sido propostos como uma alternativa para a rápida avaliação de solos contaminados, inclusive em baixas concentrações do produto (BROWN, DOMÍNGUEZ, 2010). Testes de reprodução apresentam os fatores de influência no comportamento das minhocas diante de um contaminante, o qual pode ocasionar mortalidade, redução do crescimento dos animais, diminuição na fertilidade, redução na produção de casulos e na viabilidade dos casulos. Ambos os testes são úteis na avaliação dos efeitos e possíveis riscos da contaminação de solos, entretanto, normalmente utilizam-se de solo artificial e condições que não refletem adequadamente a realidade dos contaminantes no meio ambiente (BROWN, DOMÍNGUEZ, 2010; ARBOIT et al., 2016).

Diversas pesquisas defendem que os testes ecotoxicológicos realizados no Brasil devem ser adaptados e atender à realidade brasileira, como em questões de temperatura, substratos, espécies, para que revelem respostas mais realistas sobre os processos de contaminação. Os ensaios ecotoxicológicos ainda são pouco explorados no Brasil, sendo assim, para a realização de estudos que avaliem a contaminação de amostras de solos os métodos internacionais reconhecidos ainda são os mais utilizados (RAMOS et al., 2018).

Os ensaios de ecotoxicidade, utilizando-se das minhocas, podem ser realizados em diferentes modalidades e também podem apresentar prós e contras e é importante que tanto sua eficiência, quanto suas deficiências sejam identificadas.

Estes testes podem ser realizados da seguinte forma: ensaio de ecotoxicidade aguda, o qual avalia o efeito do solo contaminado sobre a mortalidade após duas semanas e tem sido utilizado com minhocas para determinar a toxicidade de agrotóxicos no solo para fins de registro. No entanto, muitas vezes, os contaminantes presentes no solo podem não matar, mas causar alterações no desenvolvimento, crescimento e reprodução dos organismos que nele vivem, e ainda serem acumulados e transferidos para outros organismos que se alimentam deles. Por essa razão, se desenvolveram outros ensaios; ensaio de ecotoxicidade crônica/teste de reprodução: o qual avalia o efeito de concentrações subletais de contaminantes sobre a reprodução das minhocas e nesse caso, o número de juvenis gerados ao final de um período mais prolongado de exposição (4 a 8 semanas) é comparado entre solo contaminado e não contaminado; teste de fuga com minhocas estima rapidamente a capacidade das minhocas de “escolher” entre um solo contaminado ou não contaminado, e tem demonstrado significativa sensibilidade no diagnóstico da qualidade do solo; ensaio de bioacumulação: calcula a capacidade do animal em acumular um determinado contaminante ao longo do tempo, é um ensaio especialmente importante para avaliar se o contaminante poderá afetar a cadeia alimentar do ecossistema (SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA, 2016).

2.2.3 Enquitreídeos

Os enquitreídeos, conhecidos como microminhocas, são pequenos oligoquetos da família Enchytraeidae, representantes da mesofauna terrestre que ocorrem em quase todos os tipos de solos e habitam principalmente os primeiros 5 centímetros de solo, onde a umidade e a temperatura são importantes atributos para sua distribuição; animais

saprófagos, microbívoros desempenham funções de decompositores da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e proporcionam a bioturbação do solo, conjunto de processos realizados por organismos que movimentam os componentes do solo (BOT; BENITES, 2005; NIVA et al., 2010; CASTRO-FERREIRA et al., 2012).

O fato de habitarem as camadas mais superficiais do solo permite que contribuam com microporosidade do mesmo, devido ao hábito de produzir galerias para seu deslocamento e sua atividade trófica contribui para o controle populacional de microrganismos (HEDLUND; AUGUSTSSON, 1995; VANVLIET et al., 2004). São animais com grande sensibilidade a variações de pH e teores de matéria orgânica e por esta razão manejos empregados ao solo podem influenciar a ocorrência dos enquitreídeos (JÄNSH et al., 2005).

Diante de suas características os enquitreídeos tornaram-se uma espécie modelo na ecotoxicologia de solo. O bom desempenho da espécie *Enchytraeus crypticus* em testes de toxicidade a designa como espécie modelo adequada em testes de reprodução, revelando respostas confiáveis e rápidas, além de atender aos critérios de validade para os testes (CASTRO-FERREIRA et al., 2012).

A Organização Internacional para Padronização estabelecida para efeitos de contaminantes em Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) – Determinação de efeitos na reprodução (ISO-16387, 2013) recomenda testes tanto com *E. crypticus* quanto com *E. albidus*, ambas espécies estão aptas e são adequadas para as avaliações de solo.

Os enquitreídeos (especialmente *E. albidus*) são usados em testes laboratoriais ecotoxicológicos há mais de 30 anos e o primeiro teste com *E. albidus* em água teve como objetivo avaliar os efeitos dos medicamentos veterinários no final dos anos 60. No início dos anos 90, vários grupos de pesquisa começaram a desenvolver diferentes abordagens de teste para os enquitreídeos usando-se vários substratos, como água, ágar ou solo (RÖMBKE; MOSER, 2002).

Diversos fatores de estresse, como chuva ácida, metais, produtos químicos ambientais, produtos farmacêuticos, pesticidas, fertilizantes, gradiente de poluição foram testados em investigações laboratoriais utilizando-se de enquitreídeos e os resultados destes testes forneceram uma boa indicação dos efeitos que poderiam ser esperados em condições de campo (DIDDEN; RÖMBKE, 2001; TOSZA et al., 2010; CHELINHO et al., 2014; ALVES et al., 2015; MACCARI et al., 2015). Estes animais também fornecem respostas importantes em avaliação da biodisponibilidade de

produtos químicos ou do teste do solo qualidade após a biorremediação (RÖMBKE; MOSER, 2002).

Nesse sentido, o emprego destes animais em testes ecotoxicológicos revelou-se ser de grande importância para comunidade científica, pois a fácil manipulação e cultivo dos enquitreídeos em laboratório, bem como a reprodutibilidade do método de teste dentro e entre laboratórios, somado ao bom desempenho dos testes, validou a utilização dos enquitreídeos como eficiente ferramenta de análise ambiental.

2.2.4 Colêmbolos

Os colêmbolos são um grupo de microartrópodes pertencentes à mesofauna; cosmopolitas, são habitantes do solo, mas podem ser encontrados em diversos habitats, principalmente ambientes úmidos, folhas, serrapilheira, matéria em decomposição, superfície de águas paradas, sobre a neve ou gelo e em ambientes subterrâneos; atuam como dispersores de fungos; auxiliam na decomposição da matéria orgânica por meio de escavações e transporte do material mineral e orgânico, juntamente com outros invertebrados; alimentam-se também de bactérias, fezes de artrópodos, pólen, algas, entre outros tipos de matéria orgânica (ZEPPELINI FILHO; BELLINI, 2004; UHLIG, 2005; BARETTA et al., 2008; OLIVEIRA-FILHO; BARETTA, 2016).

No ambiente subterrâneo, representam importância fundamental, uma vez que aumentam a superfície orgânica disponível para os microrganismos mineralizadores, facilitando o processo de decomposição. Posicionam-se na base da rede trófica, aumentando o aporte dos nutrientes para produtores e consequentemente contribuindo para a manutenção dos ecossistemas terrestres. Por estas razões os colêmbolos podem ser empregados como bioindicadores ecológicos, uma vez que são suscetíveis a qualquer alteração antrópica ou desequilíbrio ecológico (TRAJANO; BICHUETTE, 2006).

Os colêmbolos, como parte integrante dos ecossistemas do solo, são vulneráveis aos efeitos de contaminação do solo e a abundância e diversidade dos colêmbolos faz com que estes organismos sejam amplamente utilizados na avaliação de impactos ambientais de uma série de poluentes em solos (VAN STRAALLEN, 2002).

A sensibilidade que estes microartrópodes apresentam em relação à modificação das suas condições ambientais torna sua utilização uma importante ferramenta para o estudo da influência de fatores físico-químicos e microbiológicos sobre a fauna do solo (BARETTA et al., 2008).

A análise das famílias de colêmbolos pode ser importante para avaliar e monitorar as áreas perturbadas por atividade antrópicas, assim como desenvolver estratégias de uso e conservação do solo (RIBEIRO-TROIAN et al., 2009). Por estas razões esses invertebrados do solo são comumente empregados na avaliação ecotoxicológica de solos contaminados, pois são bastante sensíveis a algumas classes de contaminantes, possuem a capacidade de evitar solos contaminados, são resistentes e de baixo custo para a realização dos testes (SANTANA et al., 2009; SOUZA et al., 2013; NATAL-DA-LUZ et al., 2004).

Na Europa, desde 1999, uma linha de pesquisa desenvolveu-se com a utilização do colêmbolo da espécie *Folsomia candida*, na padronização de testes de riscos ambientais, monitorando poluentes no solo (CROUAU et al., 2002) regulamentado pela Organização Internacional para Padronização estabelecida para qualidade do solo com o teste de evitação para determinar a qualidade dos solos e efeitos de produtos químicos no comportamento (ISO-17512-2, 2011) e o teste para inibição da reprodução de colêmbolos por poluentes do solo (ISO-11267, 1999).

Os testes de reprodução tornam-se importantes para estudos ecotoxicológicos devido a sua influência na dinâmica populacional (DENNEMAN; VAN STRAALLEN, 1991), enquanto que os testes de fuga/evitação é uma alternativa rápida de avaliação, devido ao seu curto período de exposição e sua alta sensibilidade (HUND-RINKE et al., 2003).

Após ser bem estabelecida a espécie *F. candida* foi utilizada com sucesso em ensaios ecotoxicológicos para avaliar o efeito de diversos compostos como, por exemplo: dejetos suínos, com e sem antibióticos, lodo de esgoto, herbicidas, fungicidas, inseticidas, fertilizantes (DOMENE et al., 2007; NATAL-DA-LUZ et al., 2008; 2011; 2012; ALVES et al., 2014; 2015; CHELINHO et al., 2014; ZORTÉA et al., 2015; MACCARI et al., 2016).

2.3 Ecotoxicologia e suas ferramentas de análises

A ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos das substâncias químicas/contaminantes sobre os organismos vivos. As respostas, agudas ou crônicas, observadas nos organismos-teste utilizados apresenta-se como uma ferramenta auxiliar nas análises de impactos ambientais causados por tais elementos, estimando sua toxicidade em relação ao organismo-teste. As avaliações vão desde poluentes no ar,

água, solos e sedimentos, percorrendo a cadeia alimentar com transformações químicas e biotransformação (WALKER, 2012; SILVA et al., 2015).

É uma prática que presume a realização de testes de toxicidade que determinam o grau ou o efeito biológico de uma substância desconhecida ou de uma substância-teste (como drogas, hormônio, químicos, etc), feito por meio de comparação experimental do efeito da substância testada com efeitos causados por uma substância conhecida (USEPA, 1995; CHAPMAN, 2006).

Logo, o objetivo das análises ecotoxicológicas consiste em conhecer os efeitos dos contaminantes na fauna/macrofauna/microfauna do solo, bem como promover o restabelecimento dos ecossistemas, além de prevenir, em detrimento de remediar/corrigir, os problemas provocados por estas substâncias, protegendo a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas (CARVALHO; PIVOTO, 2011).

Deste modo, somente os sistemas biológicos podem detectar os efeitos tóxicos das substâncias, demonstrando a importância destas análises na detecção de riscos à biota encontrada no local de enfoque da pesquisa (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

São vários os meios para que avaliações ecotoxicológicas possam ser realizadas. A utilização de ferramentas como a microscopia eletrônica de transmissão em associação com alterações morfológicas podem ser utilizadas como biomarcadores (FONTANETTI et al., 2012); as proteínas de choque térmico, HSPs podem ser utilizadas como marcadoras moleculares na avaliação de toxicidade de diferentes compostos, especificamente a HSP70, pois são amplamente utilizadas para monitorar ecossistemas (FONTANETTI et al., 2011); marcadores enzimáticos de morte celular (método de TUNEL) também têm sido utilizados com sucesso em avaliações ecotoxicológicas (BOARU et al., 2006; LEE et al., 2014; RODE; EISEL, 2008) e testes de risco ecológico estabelecidos por organizações competentes (OECD; EPA; ISO) também são propostas de ferramentas sensíveis e potenciais para o alerta precoce de possíveis contaminações e estresses ambientais (VAN GESTEL, 2012).

A ecotoxicologia no Brasil é regulamentada pelo CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), o qual estabelece os padrões de controle da poluição ambiental, é a principal ferramenta legal que define os testes para determinar o efeito deletério de agentes físicos ou químicos em organismos-teste, juntamente com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) elaboram as normas para os testes,

padronizando o tipo de procedimento que deve ser realizado, visando adaptar esses testes às necessidades do país.

2.3.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão demonstrou ser uma ferramenta eficiente para analisar o potencial tóxico de certos compostos, visto que permite uma melhor compreensão dos efeitos dos contaminantes sobre os organismos em estudo, revelando os riscos que eles representam. Devido à alta resolução é possível visualizar qual o nível de integridade e preservação das organelas do material analisado e avaliar as principais respostas biológicas dos organismos vivos à ação de poluentes de maneira precisa (FONTANETTI et al., 2012).

A análise ultraestrutural de órgãos-alvo de várias espécies de invertebrados terrestres revelou que as organelas de uma célula apresentam diferentes suscetibilidades aos poluentes e demonstram diferentes graus de reação frente a um agente estressor. Em outras palavras, as observações ultraestruturais podem variar em diferentes níveis de modo a fornecer evidências qualitativas de uma adaptação funcional ao ambiente externo, indicando os estágios iniciais de toxicidade no organismo exposto (KÖHLER; TRIEBSKORN, 1998).

Os organismos mais apropriados para avaliação dos efeitos de substâncias nocivas têm sido invertebrados pertencentes às classes Nematoda, Oligochaeta, Gastropoda, Isopoda, Diplopoda e Collembola, pois suas características e seus habitats somados ao contato direto com os contaminantes permitem sinalizar as respostas do meio ambiente diante de agentes estressores (SPADOTO et al., 2004; CHRISTOFOLETTI et al., 2016).

A utilização de organismos bioindicadores juntamente com o emprego desta ferramenta tem sido apresentada com sucesso em diversos trabalhos na área de ecotoxicologia. Fontanetti et al. (2012) realizaram uma revisão sobre inúmeros trabalhos que utilizaram da microscopia eletrônica de transmissão, demonstrando sua eficiência numa diversidade de contaminações ambientais, em diferentes animais bioindicadores, bem como as reações celulares encontradas sob diferentes substâncias expostas.

Independentemente de quais testes adicionais são utilizados, a microscopia eletrônica de transmissão continua sendo o padrão-ouro das análises; embora seja mais demorada, cara e exija fixação especial, os resultados são inequívocos (ELMORE et al., 2016).

2.3.2 HSP70 (Heat Shock Protein 70)

A revisão realizada para este item foi compilada em um artigo, publicado no periódico *Water, Air and Soil Pollution*, o qual se encontra a seguir.

Resumo

HSP70 são as proteínas mais estudadas e entre todas as HSPs são destacadas devido à sua alta sensibilidade e abundância, além de serem ubiquamente expressas e associadas a todos os compartimentos subcelulares. Por esta razão, este trabalho aborda especificamente a HSP70, uma vez que suas múltiplas responsabilidades participam ativamente da homeostase de todos os organismos vivos e sua rápida resposta a qualquer agente estressor é eficiente na avaliação dos processos de poluição/contaminação ambiental. As HSP70, proteínas de choque térmico classificadas deste modo de acordo com seu peso molecular de 70 kDa, são proteínas que mantiveram suas estruturas conservadas desde os organismos mais primitivos até os mais complexos; pertencem à família das chaperonas, as quais apresentam diferentes organizações estruturais, porém, com funções similares; em geral participam do processo de dobramento correto de proteínas, no entanto, foi descrito que também participam de inúmeros processos complexos do metabolismo; sua síntese, geralmente, pode ser aumentada, ou diminuída, em condições estressantes. A ativação clássica desta proteína é decorrente da elevação da temperatura ambiental, mas vários fatores podem desencadear o processo de expressão de gene desta proteína, não só como o aumento ou diminuição do calor ou do frio, mas também a exposição a substâncias de natureza química, física ou biológica (metais, inibidores de metabolismo, agentes quimioterápicos, processos inflamatórios e infecciosos, processos que levam a morte celular, o próprio ciclo de divisão celular e fatores de crescimento, mecanismos celulares considerados normais). Diante da ampla repercussão que estas proteínas apresentam nos organismos, estejam eles expostos a qualquer substância, ou simplesmente estejam passando por períodos comumente esperados em sua fisiologia ou até mesmo do meio ambiente, inúmeros estudos foram desenvolvidos com o intuito de avaliar a relação entre o nível de expressão do gene que aumenta, ou diminui, e a produção destas proteínas pelos organismos vivos em condições adversas, verificando desde modo, não só as alterações climáticas e de temperatura, que afetam a fisiologia dos mesmos, mas também níveis de poluição e contaminação ambiental. Nesse sentido,

esse trabalho tem por objetivo realizar uma revisão bibliográfica, compilando diversos estudos sobre as HSP70, bem como apresentar suas funções, as diferentes aplicações e os resultados da utilização dessas proteínas como biomarcadora na avaliação de ambientes com possíveis contaminações, apresentando suas diferentes variações nos diferentes grupos animais expostos a inúmeras situações ambientais.

Palavras-chaves: biomarcadora molecular; estresse celular; estresse ambiental; bioindicadores; proteínas de choque térmico.



HSP70 as a Biomarker: an Excellent Tool in Environmental Contamination Analysis—a Review

Cristina Moreira-de-Sousa · Raphael Bastão de Souza · Carmem Silvia Fontanetti

Received: 19 March 2018 / Accepted: 19 July 2018
 © Springer Nature Switzerland AG 2018

Abstract HSP70 are the most studied proteins and among all HSPs are highlighted due to their high sensitivity and abundance, as well as being ubiquitously expressed and associated with all subcellular compartments. For this reason, this work specifically approaches HSP70, since its multiple responsibilities actively participate in the homeostasis of all living organisms and its rapid response to any agent stressor is efficient in assessing environmental pollution/contamination processes. HSP70, heat shock proteins thus classified according to their molecular weight of 70 kDa, are proteins that have maintained their structures conserved from the most primitive to the most complex organisms. They belong to the chaperone family, which comprises proteins with different structures that share a common function. In general, they participate in the process of correct folding of proteins; however, it has been described that they also participate in numerous complex processes of metabolism; its synthesis can usually be increased or decreased under stressful conditions. The classical activation of this protein is due to the increase in environmental temperature, but several factors can trigger the gene expression process of this protein, not only as the increase or decrease of heat or cold, but also the exposure to substances of a chemical nature, physical or biological (metals, metabolism inhibitors,

chemotherapeutic agents, inflammatory and infectious processes, processes leading to cell death, the cycle of cell division itself and growth factors, cellular mechanisms considered normal). Given the broad repercussion of these proteins in metabolic processes and in organism physiology, numerous studies have evaluated the HSP70 production under adverse conditions, highlighting their connection to pollution and environmental contamination. Hence, this work aimed to literature review the vast array of HSP70 metabolic functions and its possible applications as biomarkers in the evaluation of contaminated environments by compiling the different physiological responses observed in various animal groups exposed to different conditions.

Keywords Molecular biomarker · Cellular stress · Environmental stress · Bioindicators · Heat shock proteins

1 Introduction

The physiological response of an organism to exposure to a stressor of any nature triggers a process of synthesis of specific proteins to repair possible damage caused by this exposure. This synthesis of proteins involved with the “quality control” of cells is well established among all living organisms, in addition to being a process that has maintained a high degree of conservation from the prokaryotes to the eukaryotes (Hamer et al. 2004; Mayer and Bukau 2005).

C. Moreira-de-Sousa (✉) · R. B. de Souza · C. S. Fontanetti
 Department of Biology, Biosciences Institute, UNESP (São Paulo State University), Av. 24-A, 1515, Rio Claro, São Paulo
 13506-900, Brazil
 e-mail: cris.sousa.bio@hotmail.com

At first, the synthesis of these proteins was associated only with exposure to high temperatures, that is, thermal shock, since their discovery was due to the observation in *Drosophila melanogaster* cells during exposure to high temperatures. Exposure to heat was responsible for producing a new pattern in the thickening of the chromosomes, providing the creation of specific transcription sites for the synthesis of new proteins. This showed the stress generated by the heat induced the expression of certain genes and, consequently, the activation of a new class of proteins, the heat shock proteins (HSPs) (Morimoto and Fodor 1984; Meyer and Silva 1999).

After numerous studies, these proteins were named molecular chaperones, coming from the French term *chaperon* that means “lady-in-waiting.” These proteins perform the function that defines them, since they assist the processes related to the correct protein folding, preventing incorrect folding and improper aggregation. Thus, the function usually attributed to chaperones is that of assisting the newly formed proteins to assume the proper configuration in order to perform their tasks in the cell cycle. This is undoubtedly a task of extreme importance, since if protein folding errors occur, there may be the formation of protein aggregates and consequently impairment of protein functions. One example of these errors is the development of Alzheimer’s and Parkinson’s disease, the most well-known conformational diseases (Alves Filho 2008; Castro et al. 2013).

After their initial discovery, HSPs have been shown to cover a broad list of tasks beyond their involvement with heat shock responses, also assisting in response to ischemia: presence of trace metals (Somero 1995); presence of several chemical, physical, and biological inducers, including the cycle of cell division itself, growth factors, cell proliferation, and cellular processes considered normal (Feder et al. 1992); acting on cell protection against the deleterious effects of endotoxins (Chi and Mestrlil 1996); on exposure to ultraviolet radiation (Simon et al. 1995); in cases of tumorigenicity (Jäättelä 1995); apoptosis (Wyatt et al. 1996; Jäättelä et al. 1998; Jäättelä 1999; Böttger et al. 2008); in pathologies, such as viral, bacterial, and parasitic infections; autoimmune diseases; metabolic poisons, which in some way compromise protein function (Welch 1992; Cellura et al. 2006); homeostatic changes such as changes in salinity; hypoxia; and oxidative stress, among others (Feder et al. 1995; Feder and Hofmann 1999; Yenari et al. 1999; Golli-Bennour and Bacha 2011).

HSPs, classified according to their molecular mass, comprise the families of small HSPs: from 15 to 30 kDa, with HSP27 being the most prominent, since it is one of the main inducible HSPs (Didelot et al. 2007; Ciocca and Calderwood 2005). Families of large HSPs with up to 100 kDa are the HSP100, HSP90, HSP70, and HSP60 (Feder et al. 1995; Patruno et al. 2001; Yenari et al. 1999). Among these, HSP70 stands out because it presents a rapid and significant synthesis in face of several stressors. It is also involved in numerous cellular events and, for this reason, has been widely used as a biomarker for various analyzes (Jonsson et al. 2006; Liu et al. 2015; Souza et al. 2017).

Most HSPs are not only located in cellular compartments, such as mitochondria, reticulum, and cytosol, but can also be detected in the extracellular environment. While intracellular HSPs mainly play the cytoprotective role, others in the extracellular environment and plasma membrane, they have immunogenic properties and may induce a pro or anti-inflammatory response. They may elicit an immune modulated response both by the adaptive immune system and by the innate (Didelot et al. 2007). Schmitt et al. (2007) describes that HSP27, HSP70, HSP90, and GRP78 proteins are found in the extracellular medium with immunogenic function.

In the face of these characteristics that the HSPs have and in particular the HSP70, numerous works have been carried out using this protein as a biomarker, being able to signal possible environmental changes expressed in the organisms exposed to the diversity of the environment where they are, through the expression of their gene and consequent activation of the protein, being able to be increased or decreased according to the situation of the organism (Köhler et al. 1992; Zanger et al. 1996; Nadeau et al. 2001; Mello et al. 2012; Silva-Zacarin et al. 2012; Taylor et al. 2013; Ansoar-Rodríguez et al. 2016; Coelho et al. 2017).

In this context, this review aimed to compile data on the role of the HSP70 heat shock protein and its applicability as a biomarker in several organisms. The characteristics that the HSP70 present become these proteins as the most studied (Moyes and Schulte 2010), are activated in all cellular reactions (Sabirzhanov et al. 2012) and reside in all subcellular compartments (Sharma and Masison 2009; Evans et al. 2010), are abundant and highly sensitive, expressed ubiquitously, and are extremely important for cellular repair machinery (Mishra and Palai 2014); thus, participation in the homeostasis of all living organisms is its crucial function (Sable et al. 2018); these points

justify the choice of these proteins for the present study and in particular in studies in which HSP70 stands out in situations of environmental contamination. This group of proteins shows a rapid response when a particular organism is exposed to stress, so it has been widely used in environmental analysis. A summary of the results obtained from HSP70 analyses in some animals exposed to stressor agents listed in this text is seen in Table 1.

2 HSP70: functioning

As mentioned above, HSP70 proteins are central components of a cellular network of molecular chaperones and catalysts of protein folding processes. They have a cell cleaning function integrated in folding and signal transduction pathways which allow them to revise the structures of newly synthesized proteins and repair unsuccessful protein conformations. These processes are handled by specialized HSP70 chaperones, which result from the amplification and diversification of Hsp70 genes during evolution. For this to occur, co-chaperones are often required. They are recruited by HSP70 chaperones to fulfill specific cellular functions, and as a result of their cooperation, they broaden their spectrum of activity, creating complex repair machinery (Mayer and Bukau 2005).

The role on non-native protein folding may be divided in three related activities: prevention and aggregation, folding into the native state and solubilization, and refolding of aggregated proteins (Ben-Zvi and Goloubinoff 2001; Mayer and Bukau 2005). These processes are of fundamental importance for stable cellular operation.

Several studies point out that HSP70 heat shock proteins present other functions as important as their stress specific roles. Their presence was observed during early development of *Drosophila*, during rat embryogenesis, and in embryonic carcinoma cells (Velasquez et al. 1980; Bensaude and Morange 1983; Morimoto and Fodor 1984; Arya et al. 2007).

Given these observations, researchers have endeavored to better understand the other possible functions of HSP70. Morimoto and Fodor (1984) suggested that one way of understanding if these proteins act in cells in a normal state would be to survey HSP70 expression under unaltered conditions, in the absence of heat shock.

The heat shock response (HSR) is characterized by the rapid transcription and translation of a series of

proteins from the HSPs family (Feder et al. 1995). Thus, following the path of these proteins in their different destinations revealed the other functions attributed to HSP70.

From a molecular point of view, the mechanisms of action of HSP70 generally are based on an N-terminal ATPase domain of 45 kDa, a C-terminal binding domain of 25 kDa, which is subdivided into a β -sandwich subdomain and a C-terminal α -helical subdomain. The sequence alignment of the HSP70 proteins reveals differences that may translate into functional differences. A shift in the ATPase cycle can be observed, changing between the ATP state with low affinity and a rapid energetic cost to the substrate or the ADP state with high affinity and low energy cost for the substrate (Harrison et al. 1997; Mayer and Bukau 2005).

A more detailed description of how the molecular structure of HSP70 is established within cells predicts that the substrate binding domain (SBD), which occurs in the C-terminal region, controls the access to the substrate via the C-terminal structure. This structure functions as a cap/lid and exposes the binding site to the peptides. A hydrophobic flexible bond binds the SBD domain to the N-terminal domain with ATPase activity (NBD). The nucleotide (which can be found in ATP or ADP state) binds to the NBD domain by association with the binding affinity of the SBD domain. Therefore, the allosteric regulation of this site, as well as the interaction with auxiliary proteins (co-chaperones) and nucleotide exchange factors (NEF), depends on the conformation of the SBD site. The evaluation of NBD structure of several members of the HSP70 family has demonstrated that this domain is highly conserved and has little contribution in protein specificity. The SBD site and accessory proteins define the specificity role (Jiang et al. 2007; Vos et al. 2008; Kampinga and Craig 2010; Wisniewska et al. 2010).

Highly conserved, HSP70 presents great structural similarity when compared between species. For example, HSP70 presents 73% similarity with *Drosophila* and 50% with *Escherichia coli* (Feder et al. 1995).

The common characteristic of genes HSPs is the induction of transcription by heat shock elements (HSF) and homotrimeric DNA binding transcription factor, heat shock factor (HSF). The stressor agents may be of different origins as environmental, chemical or pathophysiological stresses, but activation of the response will always be homotrimerization of DNA binding. The stressor agents may be of different origins

Table 1 Summary of the results obtained from HSP70 analyses in animals exposed to stressor agents listed in the text

Organisms	HSP70 level	Stressor agents	References
Insects			
<i>Apis mellifera</i>	Increase	Acaricide	Silva-Zacarin et al. (2006)
<i>Drosophila melanogaster</i>	Increase	Mixture of pesticides	Doganlar and Doganlar (2015)
<i>Ochesella bifasciata</i> ; <i>Tomocerus flavescens</i>	Variations in different situations	Metals	Köhler et al. (1999)
<i>Chorthippus brunneus</i>	Variations	Metals	Augustyniak et al. (2009)
<i>Drosophila melanogaster</i>	Increase	Metals	Doganlar et al. (2014)
<i>Aedes albopictus</i>	Increase	Metals	Braeckman et al. (1997)
<i>Spodoptera exigua</i>	Increase	Metals	Kafel et al. (2012)
<i>Tetrix tenuicornis</i>	–	Metals	Warchalowska-Sliwa et al. (2005)
<i>Musca domestica</i>	–	Metals	Borowska and Pyza (2011)
<i>Sarcophaga crassipalpis</i>	Increase	Diapause	Yocum (2001)
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Decrease	Diapause	Yocum (2001)
<i>Omphisca fuscidentalis</i>	Decrease	Diapause	Tungjitwitayakul et al. (2008)
Diplopods			
<i>Glomeris marginata</i> , <i>Cylindroiulus punctatus</i> , and <i>Tachypodoiulus niger</i>	–	Metals	Köhler et al. (1992)
<i>Julus scandinavicus</i>	Increase	Metals	Zanger et al. (1996)
<i>Rhinocricus padbergi</i>	Increase	Vinasse and biosolid	Coelho et al. (2017)
Crustaceans			
<i>Calanus finmarchicus</i>	Variations	Diapause	Aruda et al. (2011)
Annelids			
<i>Lumbricus terrestris</i>	Decrease	Metals	Nadeau et al. (2001)
Mollusks			
<i>Sphincterochila</i> sp	Variations	Natural annual cycle of activities	Mizrahi et al. (2012)
<i>Saccostrea glomerata</i>	Decrease	High temperature and metals	Taylor et al. (2013)
<i>Crassostrea gigas</i>	Increase	Toxins	Mello et al. (2012)
<i>Crassostrea gigas</i>	Increase	Toxins	Mello et al. (2013)
<i>Lymnaea stagnalis</i>	Increase	Pharmaceutical mixtures	Gust et al. (2013)
<i>Pinctada fucata</i>	Increase	Bacterial infection	WANG et al. (2009)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Increase	Seasonal changes	Li et al. (2009)
<i>Deroceras reticulatum</i>	Increase	Metals	Köhler et al. (1996)
<i>Mytilus</i> sp.	Increase	Organic contaminants	Jonsson et al. (2006)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Increase	Environmental pollution correlated to seasonal variations, pH, and salinity	Mi'covi' et al. (2009)
<i>Chamelea gallina</i>	Increase	Variation in oxygen level, temperature, salinity, and B[a]P (Benzo[a]pyrene) concentration	Monari et al. (2011)
Fishes			
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Variations	Stress caused by animal agglomeration	Dini et al. (2006)
<i>Oreochromis niloticus</i>	Increase	Insecticide imidacloprid	Ansoar-Rodríguez et al. (2016)
<i>Squalis torgalensis</i> and <i>Squalis carolitertii</i>	Variations	Seasonal changes	Jesus et al. (2013)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Increase	Metals	Söyüt et al. (2012)
<i>Mugil cephalus</i>	Increase	Xenobiotics	Ekambaram and Narayanan (2017)

– no change was observed in the synthesis of HSP70 in individuals

as environmental, chemical, or pathophysiological stresses, but activation of the response will always be homotrimerization of DNA binding which may be from HSF or its isoforms (HSF1 in mammals, for example). Activation of HSF proteins in response to stress is a process involving a few steps, i.e., the conversion of an inactive monomer to homotrimer, nuclear accumulation, DNA binding, and activation of the target gene. However, little is known about the precise mechanisms by which the stress signal is transmitted and interpreted by stress-responsive HSF proteins in order to activate transcription to the homotrimeric DNA binding form (Ahn and Thiele 2003).

The study of physiological stress through the analysis of HSP70 represents a useful tool to quantify and predict levels of stress in organisms. Thus, it leads to an understanding of environmental changes that limit the distribution of these organisms and how much variation they could withstand in a stress situation (Tomanek 2008, 2010).

Del Razo et al. (2001) reviewed the ability of arsenic compounds to modulate and/or accumulate stress proteins. In this work, the authors observed the physiological consequences of arsenic-induced stress and monitored the effects resulting from exposure to arsenic in humans and other organisms. In most cases, the induction of stress proteins depends on the ability of arsenic to reach its valence, the type of exposure, with arsenite being the largest inducer of HSP in various organs and systems. HSP70 induction to arsenic is rapid and has a dose-dependent response.

HSP70, in addition to its most common function, also acts efficiently in situations of cytotoxicity, as it plays a cryoprotective role against deleterious effects on cells. This is true regardless of the process and for conditions generated by internal and external factors (Chi and Mestril 1996; Ansoar-Rodríguez et al. 2016; Coelho et al. 2017).

3 HSP70 Gene Expression Changes in Organisms Exposed to Toxins

3.1 Insects

In insects, HSP30, HSP70, and HSP90 are the three best known groups of stress proteins (Denlinger et al. 2001). It is known that they have important functions in insects, differing from species to species and even within the same species according to the physiological and environmental conditions where they occur (King and

MacRae 2015). HSP70 is the most studied group and present the best results in stress responses in this class (Denlinger et al. 2001).

Several species of insects can be used as bioindicators of environmental pollution. HSP70 marking in particular has been widely used in environmental stress and/or contamination situations.

Silva-Zacarin et al. (2006) presented an analysis of HSP70 heat shock proteins in *Apis mellifera* bees, a species which are constantly exposed to pesticides. According to the authors, these stress conditions in the field might induce morphological and physiological alterations. Therefore, immunodetection of HSP70 is an important additional tool to the results obtained for side effects of acaricides (rotenone) and oxalic acid exposure. It was demonstrated that HSP70s were synthesized in the cytoplasm and/or the nucleus of secretory gland cells.

It is known that pesticides are one of the main contaminants of groundwater and drinking water, being usually introduced into the environment through anthropic practices and agricultural neglect. Since water is the final destination of pesticides, these substances usually appear as complex mixtures and are hardly found as individual compounds (Silins and Högberg 2011).

In this sense, Doganlar and Doganlar (2015) demonstrated that *Drosophila melanogaster* exposed to a mixture of pesticides (molinate, thiobencarb, linuron, phorate, primiphos-methyl, fenvalerate, and lambda-cyhalothrin) that are commonly found in water at concentrations of 0.1, 0.5, and 1 part per billion (ppb) showed increased HSP gene expression at all concentrations, among other changes. The production of HSP70s, unlike the other HSPs evaluated, increased after exposure of the animals to concentrations of 0.5 and 1 ppb. This work suggested that, considering the changes in HSP levels, the permissible limits of pesticide concentrations for drinking water described in the regulations of several countries are potentially cytotoxic. The observations presented by the authors serve as a basis for the re-evaluation of these limits.

Köhler et al. (1999) induced the synthesis of HSP70 as a marker for cell stress in two species of collembolans (*Orchesella bifasciata* and *Tomocerus flavescens*) exposed to a metal concentration gradient near a bronze factory. The population of severely polluted areas, fed with seaweed containing high concentrations of metals, presented low values of HSP70. According to the

authors, levels below the detection limit of HSP70 in samples exposed to contaminated seaweed are probably due to pathological cell damage. This allowed the authors to conclude that the differences in tolerance between individuals and the heterogeneous distribution of metals in the litter may explain the large intra-specific variability found in HSP70 levels.

Augustyniak et al. (2009) evaluated the level of HSP70 in the 1st instar of *Chorthippus brunneus* grasshoppers located in different cities in Poland. Among the cities, there were both unpolluted (Pilica, place of reference) and polluted habitats (Olkusz, Szopienice). The grasshoppers were additionally exposed to several doses of zinc (one of the most abundant pollutant in the studied sites) and also studied during the diapause process of these animals. Great variation was observed in the expression level of HSP70 gene when comparing the sites included in the study and the adverse situations in which the animals were. The level of HSP70 in the body of the offspring depended on the place of origin, with the highest expression of HSP70 found in the bodies of larvae that hatched from eggs laid by young females from Pilica. In contrast, a low level of HSP70 was found in larvae from polluted sites, especially in the progeny of young females. The application of zinc during diapause influenced the level of HSP70 in locust larvae; however, the type of change depended on the place of origin of the insects. In larvae from the reference site and, to a lesser extent, in Olkusz, the increase in the level of HSP70 after zinc treatment was more pronounced. The grasshoppers from Szopienice showed no change in the expression of HSP70 after exposure to low zinc dosage, but a higher dosage caused a reduction of protein expression. According to the authors, all these observations may be a result of maternal heritability, but it cannot be ruled out that a possible adaptation of the animals may have occurred. Thus, it can be observed that the synthesis of the HSP70 protein can signal different responses in different situations.

Trace metals found in water can cause a number of human health damages, as well as compromise the mental and physical development of children (Benham and Ling 2011). Because of the toxic effects of trace metals, governments and different agencies linked to public health have set limits on the amount of metals that are allowed in water destined for consumption. Therefore, Doğanlar et al. (2014) exposed adult individuals of *D. melanogaster* to a mixture of four trace metals (Fe, Cu, Cd, and Pb) in three different concentrations.

The higher dose and the lower dose were stipulated according to the limits allowed in drinking water in order to evaluate whether these limits would in fact cause changes in bioindicator animals.

The observations were that the expression of the Hsps genes was altered as a result of the increased exposure time and that the HSP70 obtained a higher level of expression when compared to the other HSPs (HSP60, HSP26, HSP83) also expressed in the organism. In view of these responses, along with the other analyses obtained, the authors concluded that the mixture of the four metals caused a genotoxic effect in the organism (Doğanlar et al. 2014).

Braeckman et al. (1997) and Kafel et al. (2012) observed an increase in the production of HSP70 in *Aedes albopictus* and *Spodoptera exigua* that were exposed to the metal cadmium. However, some studies suggest that metal-induced expression of HSP70 varies from species to species.

In a study conducted by Warchalowska-Sliwa et al. (2005), individuals of the Orthoptera species *Tetrix tenuicornis* were collected from a polluted area with concentrations of copper, zinc, lead, and cadmium that were up to 41 times higher than the control group. The results showed that there was no significant increase in the induction of HSP70. Similar result was found by Borowska and Pyza (2011) when *Musca domestica* (Diptera) was exposed to the same metals in laboratory conditions. No change in HSP70 synthesis was observed in treated subjects, regardless of whether the concentration was low or high.

3.2 Diplopoda

According to Knigge et al. (2014), little is known about the stress proteins in soil invertebrates. Even less is known about the Diplopoda class, particularly on HSPs, despite its significant contribution to the detritivorous fauna of the soil.

The first study carried out with the purpose of analyzing the HSPs in the group was developed by Köhler et al. (1992). The diplopod species (*Glomeris marginata*, *Cylindroiulus punctatus*, and *Tachypodoiulus niger*) were used to perform the experiments in the laboratory, where they were contaminated with lead for 41 days. The results showed that both the contaminated group and the control group had the same pattern of HSPs. The authors explained the induction of proteins in the control group by stress caused by captivity.

Subsequently, Zanger et al. (1996) induced HSP70 expression in adult individuals of *Julus scandinavius* exposing them to litter contaminated with different concentrations of Cd^{2+} . The increased concentration of Cd^{2+} in the food resulted in high levels of HSP70, which according to the authors was indicative of a proteotoxic condition.

Coelho et al. (2017) exposed *Rhinocricus padbergi* to two residues widely used as fertilizers: biosolids and sugarcane vinasse. The animals showed increased immunostaining for HSP70 when exposed to such residues, revealing the cytoprotective function of HSP70s.

3.3 Crustaceans

As in insects, stress proteins are also found in the diapause process in crustaceans. Aruda et al. (2011) verified the synthesis of these proteins in the marine copepod *Calanus finmarchius* during the diapause process and when exposed to stress. Eight heat shock proteins were identified: HSP21, HSP22, HSP26, HSP90, and four forms of HSP70 (HSP70 A, B, C and D), which were characterized according to the stress response to the manipulation process and in association with diapause.

HSP21, HSP22, and HSP70A (cytosolic subfamily) were induced by stress from the manipulation of the animals. HSP22 had a high production in animals with deep diapauses, protecting proteins from degradation during this process and playing its role in short-term stress. In addition to the role in stress response, the synthesis of HSP70 and HSP90 varied during the crustacean molting cycle and thus aided in regulating the developmental delay associated with diapause in *C. finmarchius*.

3.4 Annelids

Nadeau et al. (2001) carried out an evaluation for HSP70 as a biomarker of several soil pollutants using the earthworm *Lumbricus terrestris*. One of the objectives of the study was to evaluate whether a dose-response relationship could be established and whether the response to the stress observed was specific. They were exposed to chloroacetamides, pentachlorophenol, and metals (Pb^{++} , Cd^{++} , Cu^{++} , Hg^{++}), which induced the expression of the HSP70 gene in the animal's midgut. It was detected a decrease in HSP70 synthesis in the

muscle tissues near the middle of the body that were exposed to metals.

HSP analysis in *L. terrestris* tissues, particularly in the midgut, has been shown to be an adequate and sensitive test for adverse effects on earthworms and has shown a good level of reproducibility despite some individual variations. For the authors, the induction of HSP70 in worms represents not only a good biomarker with a broad spectrum of exposure but also a biomarker of effect, since known toxic agents alter the expression of the gene in the tissues of these animals, and not just a simple accumulation of HSPs. Thus, the detection of HSP70 in earthworms may be an early warning marker for the presence of potentially harmful agents in soils.

3.5 Mollusks

The phylum Mollusca is one of the largest groups and is of great importance in the animal kingdom. Most of these animals live in fresh or salt water and must face intense environmental disturbances to maintain homeostasis, a situation generally described as a cause of stress. The production of acute-phase proteins, such as HSPs, is considered a classic response against stress factors. For this reason, HSP70s from mollusks are of particular interest, and also because on their diversity, sequence characters, and expression profiles in hemocytes under several types of stresses (Wang et al. 2013).

Most information on the synthesis of HSP70 in mollusks was obtained from tissue analysis, including gills, digestive glands, muscle, mantle, and hemocytes. Like most hemolymph, hemocytes comprise the major component of nonspecific defense mechanisms, so they are closely involved in a series of cellular immune responses (Mello et al. 2012; Wang et al. 2013).

Synthesis of HSP proteins can occur without an external stressor. Mizrahi et al. (2012) have suggested in their studies that in terrestrial snails of the *Sphincterochila* species, HSP70 is involved in the natural annual cycle of activities. Estivation, survival strategies during desiccation and heat stress, and adaptation of land snails to different habitat are some examples of activities that generate the development of different strategies for expression of HSP70 in response to stress.

HSP70 synthesis in mollusk hemocytes was extensively investigated as a response to several environmental stressors, such as high temperature, metals (Taylor et al. 2013), toxins (Mello et al. 2012; Mello et al. 2013), pharmaceuticals (Gust et al. 2013), bacterial infections

(Wang et al. 2009), and seasonal changes (Li et al. 2009). The expression profiles are generally divided into three types: upregulated, invariable, and downregulated. The upregulation of HSP70 proteins in mollusks hemocytes generally exhibits a pattern that is clearly dose-dependent and time-dependent (Mello et al. 2012).

Köhler et al. (1996) exposed adult specimens of the slug species *Deroceras reticulatum* to sublethal concentrations of lead, cadmium, and zinc. After 3 weeks of exposure, the tests showed accumulation of all these metals in the animals, accompanied by an increase in HSP70 protein. They showed that the applied technique serves as a versatile tool to evaluate the stress reactions in invertebrates in response to relevant environmental toxins.

Jonsson et al. (2006) investigated the possible use of cytoskeletal components as biomarkers of organic pollution in mussels. The authors also evaluated the expression of HSP70 protein in mussels exposed to isolated crude oil and to mixtures with alkyl phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), brominated flame retardants (BDE-47), bisphenol A, and diallyl phthalate. Protein expression was strongly induced in all exposure groups.

Miçović et al. (2009) estimated the concentration of heavy metals in four sites in the industrial zone of Kvarner Bay, in the northern Adriatic Sea, by studying the mussel *Mytilus galloprovincialis*. In this work, the alterations were correlated with seasonal variations in environmental temperature, pH, and salinity, as well as the expression of metallothioneins (MTs) and heat shock proteins (HSP70) in the digestive tract of mussels. The results demonstrated that the induction of MTs and HSP70 were highly affected by the contamination by Pb, Hg, and Cd present in the sea sediments. This implies that these stress proteins can be biomarkers of the power of marine pollution.

Monari et al. (2011) evaluated the heat shock protein HSP70 expression in response to physical and chemical stress in *Chamelea gallina*, a bivalve mollusk from the coast of Italy. Mollusks were exposed to different experimental conditions: variation in oxygen levels (48 h of anoxia followed by 24 h of normoxic recovery), variation in temperature (20, 25, 30 °C for 7 days), variation in salinity (28, 34, 40‰ for 7 days), and B[a]P exposure at 0.5 mg/L concentrations for 24 h over a period of 7 and 12 days. In all exposure situations, HSP70 demonstrated significant upregulation under anoxic conditions at elevated temperatures, low salinity,

and presence of B[a]P. The authors considered the induction of HSP70 as an adaptation mechanism associated with changes in environmental parameters, as well as the presence of xenobiotics. Overproduction of HSP70 can also be induced by protein damage due to stress factors. The involvement of the protein as a physiological response was useful as an early warning of environmental stress caused by pollution.

3.6 Fish

Dini et al. (2006) monitored HSP70 gene expression in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during confinement and during stress caused by animal agglomeration. After the tests, it can be concluded that in reality, the increase or decrease of HSP70 expression in the stressed fish was modified in the organ and the duration-dependent stress exhibits minimal subjective fluctuations. Evaluating the experiment as a whole, the authors suggest that the expression of HSP70 could be an indicator of stress state in fish when measured in organs with significant responses.

Söyüt et al. (2012) evaluated the gene expression of HSP70 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to some metals. Expression of the Hsp70 gene was increased in the presence of the metal ions such as cobalt, copper, zinc, and silver. At the end of 48 h exposure, the expression level was high for all metals.

Jesus et al. (2013) carried out studies with two species of freshwater fish of the genus *Squalis* (*Squalis torgalensis* and *Squalis carolitertii*). The authors observed that these animals are subject to intense seasonal variations daily and changes occur in the expression of HSP70 genes. The authors observed that the *S. torgalensis* species increased HSP70 expression at 35 °C while *S. carolitertii* showed no increase in gene expression, but some deaths were recorded. The two species have different ways of dealing with changes in temperature.

Ansoar-Rodríguez et al. (2016) analyzed the liver of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) exposed to the insecticide imidacloprid, widely used in sugarcane crops. Analysis of the HSP70 of the exposed animals demonstrated a considerable increase in the immunostaining protein, suggesting that the insecticide caused a cytotoxic reaction in the liver cells of the Nile tilapias.

Ekambaram and Narayanan (2017) evaluated the cytoprotective effect of HSP70 on fish brain on the stress effect on xenobiotic pollutants. Significant

elevation in the HSP70 level observed by the authors is indicative that the upregulation of HSP70 has a cytoprotective role during stress induced by xenobiotics in the fish brain.

4 Conclusion

Considering the various responses from numerous studies compiled here, we concluded that the monitoring of both the increase and decrease in gene expression and consequent activation and synthesis of HSP70 proteins has great potential to warn about environmental disturbance caused by numerous substances. These substances may interfere negatively in the physiology of both invertebrates and vertebrates. The analysis of different techniques used to identify the presence of the HSP70 protein as molecular biomarker has proven to be an excellent tool in investigations of this nature.

Funding Information The authors thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), and Cnpq (Conselho Nacional de Pesquisas) for financial support.

References

- Alves Filho, M. (2008). Chaperonas, as 'damas de companhia' das proteínas. *Jornal da Unicamp*, 413, 9.
- Ahn, S. G., & Thiele, D. J. (2003). Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes & Development*, 17, 516–528.
- Ansoar-Rodríguez, Y., Christofolletti, C. A., Correia, J. E., Souza, R. B., Moreira-de-Sousa, C., Marcato, A. C. C., BUENO, O. C., Malaspina, O., Silva-Zacarin, E. C. M., & Fontanetti, C. S. (2016). Liver alterations in *Oreochromis niloticus* (Pisces) induced by insecticide imidacloprid: Histopathology and heat shock protein in situ localization. *Journal of Environmental Science and Health. Part B. Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 51, 881–887.
- Aruda, A. M., Baumgartner, M. F., Reitzel, A. M., & Tarrant, A. M. (2011). Heat shock protein expression during stress and diapause in the marine copepod *Calanus finmarchicus*. *Journal of Insect Physiology*, 57, 665–675.
- Arya, R., Mallik, M., & Lakhotia, S. C. (2007). Heat shock genes—integrating cell survival and death. *Journal of Biosciences*, 32(3), 595–610.
- Augustyniak, M., Tarnawska, M., Babczyn'ska, A., & Augustyniak, M. (2009). Hsp70 level in progeny of aging grasshoppers from variously polluted habitats and additionally exposed to zinc during diapause. *Journal of Insect Physiology*, 55, 735–741.
- Benham, B., & Ling, E. J. (2011). Virginia household water quality program: shock chlorination: disinfecting private household water supply systems. http://www.wellwater.bse.vt.edu/files/Well_Informed_Newsletter-Mar2011.pdf. Accessed 10 November 2017.
- Bensaude, O., & Morange, M. (1983). Spontaneous high expression of heat shock proteins in mouse embryonal carcinoma cells and ectoderm from day 8 mouse embryo. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J*, 2, 173–177.
- Ben-Zvi, A. P., & Goloubinoff, P. (2001). Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *Journal of Structural Biology*, 135, 84–93.
- Borowska, J., & Pyza, E. (2011). Effects of heavy metals on insect immunocompetent cells. *Journal of Insect Physiology*, 57(6), 760–770.
- Böttger, S., Jerszyk, E., Low, B., & Walker, C. (2008). Genotoxic stress-induced expression of p53 and apoptosis in leukemic clam hemocytes with cytoplasmically sequestered p53. *Cancer Research*, 68, 777–782.
- Braeckman, B., Raes, H., & Van Hove, D. (1997). Heavy-metal toxicity in an insect cell line. Effects of cadmium chloride, mercuric chloride and methylmercuric chloride on cell viability and proliferation in *Aedes albopictus* cells. *Cell Biology and Toxicology*, 13(6), 389–397.
- Castro, S. V., Lobo, C. H., Figueiredo, J. R., & Rodrigues, A. P. R. (2013). Proteínas de choque térmico hsp70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. *Acta Veterinaria Brasilica*, 7(4), 261–271.
- Cellura, C., Toubiana, M., Parrinello, N., & Roch, p. (2006). HSP70 gene expression. In *Mytilus galloprovincialis* hemocytes is triggered by moderate heat shock and *Vibrio anguillarum*, but not by *V. splendidus* or *Micrococcus lysodeikticus*. *Development & Comparative Immunology*, 30(11), 984–997.
- Ciocca, D. R., & Calderwood, S. K. (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress & Chaperones*, 10(2), 86–103.
- Chi, S., & Mestril, R. (1996). Stable expression. Of a human HSP70 gene in a rat myogenic cell line confers protection against endotoxin. *American Physiological Society*, C1017–C1021.
- Coelho, M. P. M., Moreira-de-Sousa, C., Souza, R. B., Ansoar-Rodríguez, Y., Silva-Zacarin, E. C. M., & Fontanetti, C. S. (2017). Toxicity evaluation of vinasse and biosolid sample in diplopod midgut: heat shock protein in situ localization. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9754-2>.
- Del Razo, L. M., Quintanilla-Vega, B., Brambila-Colombres, E., Calderón-Aranda, E., Manno, M., & Albores, A. (2001). Stress proteins induced by arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 177, 132–148.
- Denlinger, D. L., Rinehart, J. P., Yocum, G. D. (2001). Stress proteins: A role in insect diapause? In: D.L. Denlinger, D.L., J.M. Giebelowicz, J.M., Saunders, D.S. (Org.). *Insect timing: circadian rhythmicity to seasonality* (pp. 155–171). Elsevier.
- Didelot, C., Lanneau, D., Brunet, M., Joly, A. L., Thonel, A. D., Chiosis, G., & Garrido, C. (2007). Anti-cancer therapeutic approaches based on intracellular and extracellular heat

- shock proteins. *Current Medicinal Chemistry*, 14, 2839–2847.
- Dini, L., Lanubile, R., Tarantino, P., Mandich, A., & Cataldi, E. (2006). Expression of stress proteins 70 in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during confinement and crowding stress. *Italian Journal of Zoology*, 73(2), 117–124.
- Doğanlar, Z. B., Doğanlar, O., & Tabakçioğlu, K. (2014). Genotoxic effects of heavy metal mixture in *Drosophila melanogaster*: expressions of heat shock proteins, RAPD profiles and mitochondrial DNA sequence. *Water, Air, and Soil Pollution*, 225, 1–14.
- Doganlar, O., & Doganlar, Z. B. (2015). Responses of antioxidant enzymes and heat shock proteins in drosophila to treatment with a pesticide mixture. *Arch Biol Sci*, 67, 869–876.
- Evans, C. G., Chang, L., & Gestwicki, J. E. (2010). Heat shock protein 70 (Hsp70) as an emerging drug target. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(12), 4585–4602.
- Ekambaram, P., & Narayanan, M. (2017). Upregulation of HSP70 extends Cytoprotection to fish brain under xenobiotic stress. *Journal of Fisheries Sciences.com*, 11(1), 11–20.
- Feder, J. H., Rossi, J. M., Solomon, J., Solomon, N., & Lindquist, S. (1992). The consequences of expressing hsp70 in *Drosophila* cell at normal temperatures. *Genes & Development*, 6, 1402–1413.
- Feder, E. M., Parsell, A. D., Lindquist, S. (1995). The stress response and stress proteins. In: J. J. Lemasters & C. Oliver (Ed), *Cell biology of trauma* (pp. 177–191). CRC Press Boca Raton.
- Feder, M. E., & Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and ecological physiological. *Annual Review of Physiology*, 61, 243–282.
- Golli-Bennour, E. E., & Bacha, H. (2011). Hsp70 expression as biomarkers of oxidative stress: Mycotoxins' exploration. *Toxicology*, 287, 1–7.
- Gust, M., Fortier, M., Garric, J., Fournier, M., & Gagné, F. (2013). Effects of short-term exposure to environmentally relevant concentrations of different pharmaceutical mixtures on the immune response of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Science of the Total Environment*, 445–446, 210–218.
- Hamer, B., Hamer, D. P., Müller, W. E. G., Batel, R. (2004). Stress-70 proteins in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of environmental pollution: a field study. *Environment International* 30 (7):873–882
- Harrison, C. J., Hayer-Hartl, M., Di Liberto, M., Hartl, F. U., & Kuriyan, J. (1997). Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science*, 276, 431–435.
- Jäättelä, M. (1995). Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *International of Journal of Cancer*, 60, 689–693.
- Jäättelä, M., Wissing, D., Kokholm, K., Kallunki, T., & Egeblad, M. (1998). Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *The EMBO Journal*, 17(21), 6124–6134.
- Jäättelä, M. (1999). Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Experimental Cell Research*, 248, 30–43.
- Jesus, T. F., Inácio, A., & Coelho, M. M. (2013). Different levels of hsp70 and hsc70 mRNA expression in Iberian fish exposed to distinct river conditions. *Genetics and Molecular Biology*, 36(1), 61–69.
- Jiang, J., Maes, E. G., Taylor, A. B., Wang, L., Hinck, A. P., Lafer, A. M., & Sousa, R. (2007). Structural basis of J cochaperone binding and regulation of Hsp70. *Molecular Cellular Biology*, 28(3), 422–433.
- Jonsson, H., Schiedek, D., & Goksoyr, A. (2006). Expression of cytoskeletal proteins, cross-reacting with anti-CYP1A, in *Mytilus* sp. exposed to organic contaminants. *Aquatic Toxicology*, 78S, S42–S48.
- Kafel, A., Nowak, A., Bembenek, J., Szczygieł, J., Nakonieczny, M., & Świergosz-Kowalewska, R. (2012). The localization of HSP70 and oxidative stress indices in heads of *Spodoptera exigua* larvae in a cadmium-exposed population. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, 22–27.
- Kampinga, H. H., & Craig, E. A. (2010). The Hsp70 chaperone machinery: J-proteins as drivers of functional specificity. *Nature reviews—Molecular cell biology*, 11(8), 579–592.
- King, A. M., & MacRae, T. H. (2015). Insect heat shock proteins during stress and diapause. *Annual Review of Entomology*, 60, 59–75.
- Knigge, T., Bachmann, L., & Köhler, H. R. (2014). An intron-containing, heat-inducible stress-70 gene in the millipede *Tachypodoiulus niger* (Julidae, Diplopoda). *Cell Stress and Chaperones*, 19, 741–747.
- Köhler, H. R., Eckwert, H., Triebkorn, R., & Bengtsson, G. (1999). Interaction between tolerance and 70 kDa stress protein (hsp70) induction in collembolan populations exposed to long-term metal pollution. *Applied Soil Ecology*, 11, 43–52.
- Köhler, H. R., Triebkorn, R., Stöcker, W., Kloetzel, P. M., & Alberti, G. (1992). The 70 kD heat shock protein (hsp70) in soil invertebrates: a possible tool for monitoring environmental toxicants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 22(3), 334–338.
- Köhler, H. R., Rahman, B., Gräff, S., Berkus, M., & Triebkorn, R. (1996). Expression of the stress-70 protein family (hsp70) due to heavy metal contamination in the slug, *Deroceras reticulatum*: an approach to monitor sublethal stress conditions. *Chemosphere*, 33(7), 1327–1340.
- Li, H., Toubiana, M., Monfort, P., & Roch, P. (2009). Influence of temperature, salinity and *E. coli* tissue content on immune gene expression in mussel: Results from a 2005–2008 survey. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(9), 974–979.
- Liu, T., Pan, L., Cai, Y., & Miao, J. (2015). Molecular cloning and sequence analysis of heat shock proteins 70 (HSP70) and 90 (HSP90) and their expression analysis when exposed to benzo(a)pyrene in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Gene*, 555, 108–118.
- Mayer, M. P., & Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 670–684.
- Mello, D. F., Oliveira, E. S., Vieira, R. C., Simões, E., Trevisan, R., Dafre, A. L., & Barraco, M. A. (2012). Cellular and transcriptional responses of *Crassostrea gigas* Hemocytes exposed in vitro to brevetoxin (PbTx-2). *Marine Drugs*, 10, 583–597.
- Mello, D. F., da Silva, P. M., Barraco, M. A., Soudant, P., & Hégaret, H. (2013). Effects of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* and its toxin (saxitoxin) on the functional activity and gene expression of *Crassostrea gigas* hemocytes. *Harmful Algae*, 26, 45–51.

- Meyer, T. N., & Silva, A. L. (1999). Resposta celular ao estresse. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 45(2), 181–188.
- Miçović, V., Bulog, A., Kućić, N., Jakovac, H., & Radošević-Stašić, B. (2009). Metallothioneins and heat shock proteins 70 in marine mussels as sensors of environmental pollution in Northern Adriatic Sea. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28, 439–447.
- Mishra, S. R., & Palai, T. K. (2014). Importance of heat shock protein 70 in livestock—at cellular level. *Journal of Molecular Pathophysiology*, 3(2), 30–32.
- Mizrahi, T., Heller, J., Goldenberg, S., & Arad, Z. (2012). Heat shock proteins and survival strategies in congeneric land snails (*Sphincterochila*) from different habitats. *Cell Stress and Chaperones*, 17, 523–527.
- Monari, M., Foschi, J., Rosmini, M. G., & Serrazanetti, G. P. (2011). Heat shock protein 70 response to physical and chemical stress in *Chamelea gallina*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 397, 71–78.
- Morimoto, R., & Fodor, E. (1984). Cell-specific expression of heat shock proteins in chicken reticulocytes and lymphocytes. *The Journal of Cell Biology*, 99, 1316–1323.
- Moyes, C. D., & Schulte, P. M. (2010). *Princípios de fisiologia animal*, pp. 938. Editora: Artmed Editora S. A.
- Nadeau, D., Plante, I., Morrow, G., & Tanguay, R. M. (2001). Evaluation for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Cell Stress Chaperon*, 6, 153–163.
- Patrino, M., Thorndyke, M. C., Carnevali, M. D. C., Bonasoro, F., & Beesley, P. W. (2001). Growth factor, heat-shock proteins and regeneration in echinoderms. *Journal of Experimental Biology*, 204, 843–848.
- Sabirzhanov, B., Stoica, B. A., Hanscom, M., Piao, C. S., & Faden, A. L. (2012). Over-expression of HSP70 attenuates caspase-dependent and caspase independent pathways and inhibits neuronal apoptosis. *Journal of Neurochemistry*, 123(4), 542–554.
- Sable, A., Rai, K. M., Choudhary, A., Yadav, V. K., Agarwal, S. K., & Sawant, S. V. (2018). Inhibition of heat shock proteins HSP90 and HSP70 induce oxidative stress, suppressing cotton fiber development. *Scientific Reports*, 8, 1–17.
- Schmitt, E., Gehrmann, M., Brunet, M., Multhoff, G., & Garrido, C. (2007). Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *Journal of Leukocyte Biology*, 81, 15–27.
- Sharma, D., & Masison, D. C. (2009). Hsp70 structure, function, regulation and influence on yeast Prions. *Protein & Peptide Letters*, 16(6), 571–581.
- Silins, I., & Högberg, J. (2011). Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8, 629–647.
- Silva-Zacarin, E. C. M., Chauzat, M. P., Zeggane, S., Drajnudel, P., Schurr, F., Faucon, J. P., Malaspina, O., & Engler, J. A. (2012). Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. *Current microscopy contributions to advances in science and technology*, 1, 696–703.
- Silva-Zacarin, E. C. M., Gregorc, A., Silva de Moraes, R. L. M. (2006). In situ localization of heat-shock protein and cell death labelling in the salivary gland of acaricide-treated honey bee larvae. *Apidologie*, 37, 507–516.
- Simon, M. M., Reikerstorfer, A., Schwarz, A., Krone, C., Luger, T. A., Jäättelä, M., & Schwarz, T. (1995). Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts: Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *The Journal of Clinical Investigation*, 95, 926–933.
- Somero, G. N. (1995). Protein and temperature. *Annual Review of Physiology*, 57, 43–68.
- Söyüt, H., Beydemir, S., Ceyhan, S. B., Erdogan, O., & Kaya, E. D. (2012). Changes in carbonic anhydrase activity and gene expression of Hsp70 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle after exposure to some metals. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 36(5), 499–508.
- Souza, R. B., Moreira-de-Sousa, C., Christofolletti, C. A., Souza, C. P., Fontanetti, C. S. (2017). Impactos de resíduos (vinhaça e biossólido) lançados no cultivo de cana-de-açúcar em representantes da fauna edáfica. In: Fontanetti, C.S. & Bueno, O.C. (Org.). Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica (pp. 197–214). Bauru, SP: Canal 6.
- Taylor, D. A., Thompson, E. L., Nair, S. V., & Raftos, D. A. (2013). Differential effects of metal contamination on the transcript expression of immune- and stress-response genes in the Sydney Rock oyster, *Saccostrea glomerata*. *Environmental Pollution*, 178, 65–71.
- Tomanek, L. (2008). The importance of physiological limits in determining biogeographical range shifts due to global climate change: the heat shock response. *Physiological and Biochemical Zoology*, 81, 709–717.
- Tomanek, L. (2010). Variation in the heat shock response and its implication for predicting the effect of global climate change on species' biogeographical distribution ranges and metabolic costs. *Journal of Experimental Biology*, 213, 971–979.
- Tungjitwitayakul, J., Tatum, N., Singtripop, T., & Sakurai, S. (2008). Characteristic expression of three heat shock-responsive genes during larval diapause in the bamboo borer *Omphisa fuscidentalis*. *Zoological Science*, 25(3), 321–333.
- Velazquez, J. M., DiDomenico, B. J., & Lindquist, S. (1980). Intracellular localization of heat shock proteins in *Drosophila*. *Cell*, 20(3), 679–689.
- Vos, M. J., Hageman, J., Carra, S., & Kampinga, H. H. (2008). Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families. *Biochemistry*, 47(27), 7001–7011.
- Wang, L., Yang, C., & Song, L. (2013). The molluscan HSP70s and their expression in hemocytes. *International Scientific Journal*, 10, 77–83.
- Wang, Z., Wu, Z., Jian, J., & Lu, Y. (2009). Cloning and expression of heat shock protein 70 gene in the hemocytes of pearl oyster (*Pinctada fucata*, Gould 1850) responding to bacterial challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(4), 639–664.
- Warchalowska-Sliwa, E., Niklinska, M., Görlich, A., Michailova, P., & Pyza, E. (2005). Heavy metal accumulation, heat shock protein expression and cytogenetic changes in *Tetrix tenuicornis* (L.) (Tetrigidae, Orthoptera) from polluted areas. *Environmental Pollution*, 133, 373–381.
- Welch, W. (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiological Reviews*, 72, 1063–1081.

- Wisniewska, M., Karlberg, T., Lehtiö, L., Johansson, I., Kotenyova, T., Moche, M., & Schüler, H. (2010). Crystal structures of the ATPase domains of four human Hsp70 isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B', and HSPA5/BiP/GRP78. *PLoS One*, 5(1), 8625.
- Wyatt, S., Mailhos, C., & Latchman, D. S. (1996). Trigeminal ganglion neurons are protected by the heat shock proteins hsp70 and hsp90 from thermal stress but not from programmed cell death following nerve growth factor withdrawal. *Brain Research Molecular Brain Research*, 39, 52–56.
- Yenari, M. A., Giffard, G. R. G., Sapolsky, R. M., & Steinberg, G. K. (1999). The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Molecular Medicine Today*, 5, 525–531.
- Yocum, G. D. (2001). Differential expression of two HSP70 transcripts in response to cold shock, thermoperiod, and adult diapause in the Colorado potato beetle. *Journal of Insect Physiology*, 47(10), 1139–1145.
- Zanger, M., Alberti, G., Kuhn, M., & Köhler, H. R. (1996). The stress-70 protein family in diplopods: induction and characterization. *Journal of Comparative Physiology B*, 165, 622–627.

2.3.3 Método de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling)

TUNEL (TdT-mediated X dUTP nick labeling) é uma técnica que detecta a apoptose, ou seja, a morte celular programada, identificando o processo de clivagem do DNA nuclear, o qual pode ocorrer não só por fatores genéticos, mas também por fatores externos, como por exemplo, processos imunológicos, infecciosos e contanto com substâncias tóxicas (GAVRIELI et al., 1992; ZHANG et al., 2001).

Os mecanismos de apoptose são altamente complexos e sofisticados, envolvendo uma cascata de eventos moleculares dependentes de energia. A via intrínseca é caracterizada pelo aumento da permeabilidade da mitocôndria, liberação do citocromo c, formação de um complexo multiprotéico denominado “apoptosoma” e início da cascata de caspases através da caspase 9, enquanto que a via extrínseca envolve ligantes pró-apoptóticos (FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, etc.), ligação com receptores de morte transmembrana, transdução de sinais intracelulares, ligação de proteínas adaptadoras, formação de complexo de sinalização indutor de morte (DISC) e, em seguida, início da cascata de caspases através da caspase 8 (ELMORE et al., 2016).

Os fatores que determinam qual via apoptótica é ativada incluem o estágio do ciclo celular, o tipo e a magnitude dos estímulos e, para as células imunes, o estágio da ativação celular. Diferentes vias apoptóticas podem ocorrer concomitantemente e ao contrário da necrose, a apoptose pode ser, sob certas circunstâncias, reversível (ELMORE et al., 2016).

A degradação extensiva do DNA é um evento característico que ocorre nos últimos estágios da apoptose. A clivagem do DNA pode produzir fragmentos de DNA LMW (Low Molecular Weight) de fita dupla (mono- e oligonucleossomos), bem como quebras de fita simples (“nicks”) em DNA HMW (High Molecular Weight). Essas quebras da fita de DNA podem ser detectadas pela marcação enzimática da extremidade livre 3'-OH de terminais com nucleotídeos modificados (X-dUTP, X = biotina, DIG ou fluoresceína). Enzimas adequadas para essa marcação incluem DNA polimerase (nick translation) e desoxinucleotidil terminal transferase (RODE; EISEL, 2008).

O método de marcação final TUNEL (marcação de extremidade nick-dUTP mediada por TdT) permite a detecção altamente sensível de apoptose em tecidos e células individuais, pois identifica, mais especificamente, as células na fase tardia da apoptose (ELMORE et al., 2016). A desoxinucleotidil transferase terminal (TdT) é

capaz de marcar extremidades de quebra de DNA de cadeia dupla, independentemente de um molde (RODE; EISEL, 2008).

Um método sensível e rápido, a reação de TUNEL é mais específica para a apoptose e o uso combinado das técnicas de tradução por quebra *in situ* (situ nick-translation-ISNT) e de um terminal transferase (TUNEL) podem ser útil para diferenciar apoptose celular e necrose (BEN-SASSON et al., 1995; WILLINGHAM, 1999).

2.3.4 Testes de fuga e reprodução

Os sistemas de testes ecotoxicológicos são aplicados para obter informações sobre os efeitos de contaminantes no solo e são propostos para complementar a análise química convencional. Para tanto, a ISO (International Organization for Standardization - Organização Internacional de Normalização) encarrega-se de listar a caracterização de sistemas de teste recomendados e padronizados, além de orientar sobre a escolha e avaliação dos bioensaios adequados aos tipos de análises (ISO, 2011).

Nesse sentido, os testes de ecotoxicidade aguda, ou seja, o teste de evitação/fuga fornecem respostas rápidas, expressando o efeito letal nos indivíduos submetidos a agentes estressores, enquanto que testes de ecotoxicidade crônica, como o teste de reprodução, tem por objetivo de avaliar efeitos subletais aos organismos, verificando se o número de indivíduos gerados na primeira geração foi alterado em contato com a substância testada (MACCARI et al., 2015).

Diante disso a ISO-11267 (1999) estabelece os critérios para o teste de reprodução padronizando os colêmbolos da espécie *F. candida* como indicadores de poluentes de solo; a ISO-17512-1 (2008) descreve um método controle qualidade do solo o teste de evitação para determinar a qualidade dos solos e efeitos de produtos químicos no comportamento de minhocas das espécies *E. fetida* e *E. andrei*; a ISO-11268-2 (2011) descreve um método de teste de reprodução baseado na determinação de efeitos subletais de solos contaminados em minhocas adultas das espécies *E. fetida* e *E. andrei*, consideradas representantes padronizadas da fauna do solo; a ISO-17512-2 (2011) descreve um método de teste de fuga para determinar a qualidade dos solos e efeitos de produtos químicos no comportamento de colêmbolos da espécie *F. candida*; a ISO-16387 (2013) descreve um método de teste de qualidade do solo avaliando efeitos de contaminantes em Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.), determinando os efeitos na reprodução destes animais, as espécies mais empregadas neste teste são *E. albidus* e *E. crypticus*.

Os testes de fuga/evitação demonstraram que os colêmbolos apresentam uma sensibilidade distinta em relação a vários contaminantes quando comparado com minhocas, complementando as informações obtidas nos testes de evitação com minhocas e viabilizando-os como ferramenta para avaliação do potencial tóxico de solos (NATAL-DA-LUZ et al., 2004; ISO-17512-2, 2011).

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar os efeitos da aspersão da vinhaça bruta no solo, bem como da vinhaça tratada (com CaO para ajuste de pH), simulando o que comumente ocorre no cultivo da cana-de-açúcar, poderia interferir negativamente em representantes típicos da fauna edáfica, como diplópodos, minhocas, enquitreídeos e colêmbolos, visto que estes animais são considerados excelentes bioindicadores da qualidade do solo; e deste modo, colaborar para um maior conhecimento dos efeitos da vinhaça no solo, comparando os efeitos observados nos bioindicadores expostos à vinhaça bruta e à vinhaça após ajuste de pH, afim de verificar se a neutralização do pH do resíduo é uma alternativa para minimizar os efeitos deste resíduo.

Os objetivos específicos consistiram em:

1. Expor de espécimes do diplópodo *R. padbergi*, ao solo contendo vinhaça bruta e ao solo contendo vinhaça tratada (ambas em concentrações de campo, estabelecida pela CETESB, e o dobro desta concentração), por um período de 30 dias, a fim de analisar os efeitos causados no intestino médio destes animais, órgão de interesse para análises toxicológicas. A investigação foi realizada por análises ultramorfológicas do órgão e por aplicação de técnicas de imunomarcagem de HSP70, para verificar o estresse celular, e pelo método de TUNEL para detecção de morte celular com quebra de DNA.
2. Avaliar o potencial tóxico da vinhaça bruta e da vinhaça tratada, por meio de testes de fuga e testes de reprodução utilizando as espécies *F. candida* (Collembola), *E. andrei* (Annelida) e *E. crypticus* (Annelida).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material biológico

Para realização dos bioensaios foram utilizados os seguintes organismos-teste:

- Espécimes adultos de ambos os sexos do diplópodo *R. padbergi*, os quais foram coletados no Campus da UNESP, Rio Claro; os animais foram previamente aclimatados em laboratório por 15 dias em terrário contendo como substrato com terra oriunda do

local de coleta, temperatura de $\pm 23^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo controlado 12 horas claro/12 horas escuro.

- Espécimes do colêmbolo *F. candida* com 10 a 12 dias de vida, mantidos em laboratório a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e com fotoperíodo 12 horas claro/12 horas escuro.
- Espécimes do anelídeo *E. andrei*, adultos e clitelados, mantidos em laboratório a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e com fotoperíodo 12 horas claro/12 horas escuro.
- Espécimes do anelídeo *E. crypticus*, adultos com clitelo, mantidos laboratório a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e com fotoperíodo 12 horas claro/12 horas escuro.

4.2 Solo para montagem dos bioensaios com diplópodos

O solo utilizado para a realização dos bioensaios com os diplópodos foi coletado no Campus da UNESP-Rio Claro, solo este classificado como latossolo, o agrupamento mais representativo do estado de São Paulo (OLIVEIRA, 1999).

4.3 Solo para os testes de fuga e reprodução

O solo utilizado nos testes de fuga e reprodução foi o solo artificial 10% (SAT), preparado em laboratório de acordo com protocolo proposto para tais testes. A mistura foi composta de 10% de fibra de coco, 20% de caulino em pó e 70% de areia fina. Em seguida, realizou-se a medição e correção do pH e avaliação da capacidade de retenção de máxima de água (WHC) do solo, valores fundamentais para realização dos cálculos de disponibilização dos resíduos no solo e exposição dos animais.

Para medição do pH foram dispostos 5g de SAT em frascos de plástico e adicionados 25mL de KCl 1M. Foram realizadas cinco réplicas deste procedimento, para descartar a possibilidade de valores discrepantes, e após 2 horas o pH foi medido. O valor do pH ficou definido em 4,89.

A correção do pH do SAT foi feita com CaCO_3 e devido ao fato do pH encontrado estar próximo do valor definido como “ótimo”, de acordo com a curva de pH estabelecida nos protocolos utilizados para estes experimentos, foi adotada a correção de 0,05% do pH do SAT. Os cálculos foram feitos da seguinte forma: 0,05% do valor total do solo do experimento = valor de CaCO_3 (g) a ser adicionado no SAT para a correção.

A capacidade de retenção máxima de água do solo (WHC) foi realizada com o auxílio de um kit composto por três frascos de vidro (cadinho filtrante com placa porosa) específicos para medição da WHC, os quais tinham areia solidificada na base.

Os frascos foram pesados antes de colocar o solo para obtenção da tara do frasco (tara seca), em seguida foi umedecida a areia da base dos frascos e estes foram pesados para obtenção da tara úmida. Foi colocado solo nos frascos até que atingisse que completasse a capacidade máxima dos mesmos, por conseguinte, estes frascos foram colocados num recipiente contendo água, a qual entrou por capilaridade nos frascos umedecendo o solo; uma vez que os solos estavam completamente úmidos o recipiente foi completamente cheio com água até cobrir os frascos. Após 1:30h os frascos foram retirados do recipiente com água e transferido para um recipiente seco a fim de que o excesso de água fosse escoado dos frascos, estes foram pesados para obtenção do peso fresco, em seguida os frascos foram levados para estufa a 105°C por 12 horas e pesados para obtenção do peso seco.

Os valores obtidos encontram-se na tabela a seguir:

Tabela 1. Método para determinação da WHC.

Frasco	Tara seca - T_{DW} (g)	Tara úmida - T_{FW} (g)	Tara seca + solo úmido - FW (g)	Tara úmida + solo seco – DW (g)	WHC (%)
1	49,8	50,9	111,07	85,0	70,9
2	49,5	51,0	113,66	86,2	70,7
3	49,8	51,2	110,67	84,6	70,9

Aplicando os valores na fórmula obtém-se o valor da WHC:

$$\text{WHC-F1} = \frac{[(FW - T_{FW}) - (DW - T_{DW})] \times 100}{(DW - T_{DW})} = \frac{[(111,07 - 50,9) - (85 - 49,8)] \times 100}{(85 - 49,8)}$$

$$\text{WHC-F1} = 70,9\%$$

$$\text{WHC-F2} = \frac{[(113,66 - 51,0) - (86,2 - 49,5)] \times 100}{(86,2 - 49,5)}$$

$$\text{WHC-F2} = 70,7\%$$

$$\text{WHC-F3} = \frac{[(110,67 - 51,2) - (84,6 - 49,8)] \times 100}{(84,6 - 49,8)}$$

$$\text{WHC-F3} = 70,9\%$$

A média dos três valores obtidos é o valor definido da WHC do SAT 10% utilizado nos experimentos:

$$\text{WHC SAT 10\%} = \frac{70,9 + 70,7 + 70,9}{3} = 70,8\%$$

4.4 Vinhaça bruta

A vinhaça foi coletada em usina localizada no interior do estado de São Paulo, Brasil. O efluente foi coletado próximo da montagem dos experimentos e mantido em câmara fria (4°C), até o início dos mesmos. Foi testada a dose a ser aplicada após análise do solo. Para o cálculo do uso da vinhaça foram necessárias as análises físico-químicas desta e do potencial agronômico do solo.

Porcentagem (%) de vinhaça de cana-de-açúcar: quantidade definida após análises agronômicas e físico-químicas do solo e da vinhaça. Para simular a fertirrigação da cultura de cana-de-açúcar com a vinhaça seguiu a norma P4231 da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), agência do governo responsável pelo controle e fiscalização de atividades geradoras de poluição.

- Cálculos para a aplicação de vinhaça, segundo a norma P4.231, da CETESB

A dosagem máxima de vinhaça a ser aplicada é determinada pela seguinte equação, na qual são inseridos os dados obtidos pelas análises químicas do solo e vinhaça:

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

Sendo:

0,05 = 5% da CTC do solo.

CTC = Capacidade de Troca Catiônica, expressa em cmol_c/dm³.

ks = concentração de potássio no solo, expresso em cmol_c/dm³, à profundidade de 0 a 0,80m.

3744 = constante para transformar os resultados da análise de fertilidade, expressos em cmol_c/dm³ ou meq/100 cm³, para kg de potássio em um volume de 1 (um) hectare por 0,80m de profundidade.

185 = massa, em kg, de K₂O extraído pela cultura por hectare, por corte.

kvi = concentração de potássio na vinhaça, expressa em kg de K₂O /m³.

Foram testadas as seguintes concentrações de vinhaça: o recomendado para uso em cultura de cana de acordo com a norma estabelecida pela CETESB e o dobro simulando o uso abusivo e sem controle da vinhaça em campo.

Aplicando os valores obtidos a partir das análises físico-químicas do solo e da vinhaça na fórmula tem-se:

$$m^3 \text{ de vinhaça/ha} = \frac{[(0,05 \times 5,34 - 0,14) \times 3744 + 185]}{0,283}$$

$$m^3 \text{ de vinhaça/ha} = \frac{[(0,127) \times 3744 + 185]}{0,283} = \frac{475,488 + 185}{0,283}$$

$$m^3 \text{ de vinhaça/ha} = \frac{660,488}{0,283}$$

$$m^3 \text{ de vinhaça/ha} = 2333,87 \text{ m}^3/\text{ha}$$

Para aplicação da vinhaça em 1 dm³:

$$1m^3 = 1000dm^3 = 1L$$

$$1m^3 \text{ ————— } 1000dm^3$$

$$2333,87 \text{ m}^3 \text{ ————— } x$$

$$x = 2333870 \text{ dm}^3/\text{ha}$$

$$2,33L \text{ ————— } 1ha \text{ ————— } 8 \times 10^6$$

$$y \text{ ————— } dm^3$$

$$y = 0,29163 \text{ dm}^3$$

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

$$1dm^3 \text{ ————— } 0,29163 \text{ dm}^3$$

$$5,0625 \text{ dm}^3 \text{ ————— } z$$

$$z = 1,476 \text{ dm}^3 \text{ ou } 147\text{mL} \div 2 = 73,5\text{mL de vinhaça/terrário para uma coluna de 5cm de solo.}$$

4.5 Vinhaça tratada

A vinhaça tratada foi obtida por meio da adição de CaO. A partir das dosagens estabelecidas para vinhaça bruta na concentração de campo e no dobro desta concentração os mesmo valores foram atribuídos para vinhaça tratada. Foram somadas as dosagens para concentração de campo e multiplicada pelas três réplicas e o mesmo para as dosagens no dobro da concentração de campo. No volume total foi adicionada a cal até que o pH do resíduo apresentasse o valor 7,0 e deste volume final foram retiradas as quantidades calculadas que caberiam a cada terrário. A seguir encontram-se os respectivos cálculos:

Volume total de vinhaça na concentração de campo: $73,5 \text{ mL} \times 3$ (número de réplicas) = **220,5 mL**

Volume total de vinhaça no dobro da concentração de campo: $147 \text{ mL} \times 3$ (número de réplicas) = **441 mL**

Volume total de vinhaça: **661,5 mL + 0,516 g de CaO**

4.6 Análises físico-químicas da vinhaça bruta e do solo

As análises do potencial agronômico do solo e físico-químicas do solo e das vinhaças, bem como a quantificação dos metais (Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn) foram realizadas por laboratório especializado (Análises Ambientais ASL®).

4.7 Preparação das amostras de solo para bioensaios com *R. padbergi*

Para a montagem dos experimentos, a vinhaça bruta e a vinhaça tratada para ajuste de pH em 7,0 foram distribuídas sobre o solo controle em aquários de vidro de dimensões 20 cm de largura, 25 cm de altura e 45 cm de comprimento. Os bioensaios foram montados em triplicata e a disposição foi da seguinte forma:

1. Controle: **5 Kg** de solo + **10** diplópodos
2. Vinhaça bruta na concentração de campo: **5 Kg** de solo + **73,5mL** vinhaça bruta + **10** diplópodos.
3. Vinhaça tratada na concentração de campo: **5 Kg** de solo + **73,5mL** vinhaça tratada + **10** diplópodos.
4. Vinhaça bruta no dobro da concentração de campo: **5 Kg** de solo + **147mL** vinhaça bruta + **10** diplópodos.
5. Vinhaça tratada no dobro da concentração de campo: **5 Kg** de solo + **147mL** vinhaça tratada + **10** diplópodos.

4.8 Teste de toxicidade em *R. padbergi*

Após o término do período de 30 dias exposição foram coletados três indivíduos de cada bioensaio, os animais foram anestesiados com éter sulfúrico e dissecados em placas de petri contendo solução fisiológica para a retirada do intestino médio. Em seguida, amostras do material foram colocadas em fixadores de acordo com a técnica a ser aplicada.

4.8.1 Ultraestrutura

Foram realizadas análises ultraestruturais para verificação dos efeitos do resíduo, bruto e tratado, nas células que compõem o intestino médio dos animais.

As amostras do material foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0.1M a 4°C por 24 horas, após a fixação o material foi transferido para o tampão fostato de sódio - PBS (pH 7,4) e armazenado a 4°C para posterior processamento.

Para a análise ultraestrutural as amostras fixadas foram lavadas em tampão cacodilato e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas. O material foi novamente lavado no mesmo tampão, colocado em álcool 10% por 15 minutos e contrastado com acetato de uranila 2% em álcool 10% por 4 horas. Em seguida, foi feita uma desidratação em série crescente de acetona e submetido à solução resina: acetona (1:1) por 12 horas; o material foi embebido em resina Epon-araldite com catalisador por 24 horas e levado para estufa a 70°C por 24 horas para a polimerização da resina, em seguida foi seccionado em ultramicrotomo e as grades obtidas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 100 para posterior documentação. As alterações morfológicas observadas no intestino médio dos animais foram analisadas semi-quantitativamente da seguinte forma: a partir da junção do protocolo de Christofolletti et al. (2016) e de Köhler e Triebkorn (1998) foi elaborado um protocolo de análise para as alterações ultraestruturais encontradas no intestino médio dos diplópodos; os danos celulares foram classificados de acordo com um fator de importância e escores de 0 a 6 foram estabelecidos para classificar as alterações ultraestruturais conforme o nível ou extensão da alteração observada; os resultados da avaliação ultraestrutural semiquantitativa foram obtidos comparando as alterações nos tecidos do intestino médio de indivíduos expostos aos solos contaminados com as diferentes concentrações de vinhaça aos indivíduos expostos ao solo controle; a distribuição dos dados quanto à normalidade e a

homogeneidade de variâncias foram avaliadas pelos testes de Shapiro Wilk e Levene e foi realizado Teste de Análise de Variâncias (ANOVA) seguido pelo Teste de Dunnett para comparações múltiplas dos efeitos entre os diferentes grupos.

4.8.2 Imunomarcção da proteína de choque térmico HSP70 (Imuno-histoquímica)

Amostras do material fixado em paraformaldeído 4% por 24 horas, foram desidratadas em série crescente de álcool gelado preparado com tampão fosfato de sódio-PBS pH 7,4 (15, 30, 50, 70, 85, 90, e 95%) durante 20 minutos cada banho. Em seguida, o material foi colocado em xilol + álcool por 20 minutos e em seguida xilol também por 20 minutos. Após este procedimento, foi feita a embebição do material em parafina líquida (Paraplast), sendo três trocas de 8 horas cada e inclusão em parafina ultra-pura (Paraplast). Posteriormente, o material foi seccionado em secções de 6µm com auxílio do micrótomo; as secções foram então hidratadas e recolhidas em lâminas apropriadas para imuno-histoquímica (Immunoslide, Ref. EP-51-30185).

Para a realização da imuno-histoquímica, foi seguido um protocolo adaptado proposto por Coelho et al. (2017). Para marcação da HSP70 foi utilizado o anticorpo primário (monoclonal anti heat shock protein 70 - HSP70 produzido em mouse, Sigma) e, em seguida, o anticorpo secundário (anti mouse IgG molécula inteira) conjugado com fosfatase alcalina. Para a revelação da imunomarcção foi utilizado o Kit Dako EnVision™ G|2 System/AP Rabbit/Mouse (Permanent Red).

O material foi fotografado e analisado no programa Image J e a partir destas análises os testes estatísticos foram realizados pelo programa Sigma Plot 13.

4.8.3 Método de TUNEL - Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling ((Imuno-histoquímica)

As amostras do material foram colocadas em fixador (paraformaldeído 4%) por 24 horas e posteriormente em tampão fosfato de sódio-PBS pH 7,4; os materiais foram incluído em agarose e posteriormente seccionado num vibrátomo.

Para aplicação da técnica de TUNEL foi seguido o protocolo do Kit AP “In Situ Cell Death Detection” (Roche). Os cortes adquiridos em lâminas foram recobertos com solução de proteinase K (20 µg/mL em 100mL Tris-HCl, pH 7,5), por 15 minutos, a temperatura ambiente e câmara úmida (caixa específica que protege as lâminas da luz e contém algodão com água destilada, o que impede os cortes de secarem). Em seguida, lavados em quatro banhos de PBS para retirar o excesso do reagente anterior, de 2

minutos cada. Posteriormente foram colocados 50 µL da solução de Tunel, de acordo com o protocolo do kit, sobre as secções histológicas tratadas, enquanto que a secção controle recebeu 50 µL da solução 1, que contem no kit, sem a enzima. As secções foram mantidas em câmara úmida por 60 minutos a 37°C e posteriormente lavadas 3 vezes em PBS, 2 minutos cada troca; em seguida as lâminas foram então montadas com Prolong® Diamond Antifade (Molecular Probes).

Para a realização desta técnica foram feitos controles positivos e negativos. Nos controles positivos foi adicionada a DNase, que tem a função de realizar a quebra “forçada” do DNA, para que ocorra marcação, mesmo que não haja morte celular neste tecido. Neste controle, a DNase é adicionada e o protocolo normal do Tunel é seguido com as aplicações dos anticorpos. Já no controle negativo é adicionado apenas o anticorpo sem a enzima, pois dessa forma testaríamos o Kit para verificar sua viabilidade e funcionalidade.

A marcação foi visualizada no Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP de Rio Claro-SP por meio de um microscópio confocal de varredura a laser (Leica TCS-SP5 II); para a aquisição das imagens foi utilizado o software Leica Application Suite-AF. As lâminas foram fotografadas com os mesmos parâmetros, sendo eles: Smart Gain: 1141.0 V; Smart Offset: 0,2%; Pinholi: 67.97; Line: 8; Frame: 2; Resolução: 1024x1024; Velocidade: 40Hz; Lazer 14% Standby; Número de steps: 5 e Z-volume = 25µm. As marcações nos tecidos foram analisadas estatisticamente pelo programa Sigma Plot 13.

Foi realizada como técnica auxiliar a marcação da actina-F e do núcleo com intuito de melhor estabelecimento da arquitetura tecidual no microscópio confocal de varredura a laser, uma vez que, forneceu o delineamento do intestino médio, facilitando a posterior análise pelo método de TUNEL. Para realização desta técnica as amostras do material foram colocadas em fixador paraformoldeído 4% por 4 horas e posteriormente em tampão fosfato de sódio-PBS pH 7,4; os materiais foram incluído em agarose e posteriormente seccionado num vibrátomo. Os cortes foram permeabilizados com 0,2% de Triton X-100 (Sigma) e posteriormente lavados em PBS. Os cortes foram, então, incubados por 30 minutos com faloidina conjugada com Alexa 488 (Molecular Probes), soro normal de cabra (Vector) e PBS. Os núcleos foram marcados com DAPI (4',6'-diamino-2-fenilindol, Molecular Probes) e as lâminas foram montadas utilizando o Prolong® Diamond Antifade (Molecular Probes).

As lâminas foram analisadas e fotografadas seguindo os mesmos parâmetros: (laser Argônio=10%, λ =488 nm, Gain=957.0 V, Offset=-1.9%, Pinhole=53.64 μ m), DAPI (laser diodo=10%, λ =405 nm, Gain=730.0 V, Offset=-1.0%, Pinhole=67.90 μ m). Como as marcações da actina-F e do núcleo foram realizadas para simples conferência da estruturação do intestino médio e facilitar a localização das marcações encontradas no teste de TUNEL as imagens obtidas não foram analisadas estatisticamente.

4.9 Teste de fuga com *E. andrei* e *F. candida*

Ambos os testes foram realizados no Laboratório de Ecologia e Ecotoxicologia de Solo do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra. Os testes de fuga com *E. andrei* foram realizados de acordo com o protocolo da ISO-17512-1 (2008); cinco réplicas por combinação dos tratamentos (sete para vinhaça bruta e sete para vinhaça tratada) e controle duplo, foram realizadas em recipientes plásticos de dimensões 20 cm de comprimento, 12 cm de largura e 5 cm de altura; os recipientes foram divididos em duas partes utilizando uma divisória de plástico introduzida verticalmente. Em um dos lados foi adicionado solo com vinhaça e no outro lado o mesmo peso de solo controle. A divisória foi removida e 10 espécimes adultos de *E. andrei* foram colocadas sobre a linha de separação dos dois compartimentos. Os recipientes foram fechados com tampas perfuradas para permitir a circulação de ar; os animais não foram alimentados durante o teste e, após 48h, o número de indivíduos presentes em cada compartimento foi registrado para posterior análise estatística.

A porcentagem de concentração de vinhaça para cada uma das sete combinações foram obtidas a partir do valor da capacidade máxima de retenção de água do solo (WHC) utilizado no experimento. O solo artificial aqui empregado apresentou uma WHC de 70,8%. De acordo com a ISO deve-se utilizar valores entre 40 e 60% da WHC; neste trabalho foi utilizado 60%, logo os cálculos são baseados em 60% de 70,8 resultando em 42,48% de retenção máxima de água no solo, esse valor foi aplicado tanto nos testes de fuga, quanto para os testes de reprodução.

Os testes foram montados da seguinte forma (Tabela 2):

Tabela 2. Distribuição das amostras de vinhaça bruta/tratada, solo e água no teste de fuga com *E. andrei*.

Combinações		Réplicas	Porcentagem de Vinhaça bruta/tratada	Volume de Vinhaça bruta/tratada (mL)	Água – diluição (g)	Solo total (g)	Solo/compartimento (g)
C0	C0	8	0%	0	1062,0	2500	356,2
C0	C1	5	1 %	9,2	543,0	1300	356,2
C0	C2	5	5 %	46,0	506,2	1300	356,2
C0	C3	5	10 %	92,0	460,2	1300	356,2
C0	C4	5	20 %	184,1	368,2	1300	356,2
C0	C5	5	30 %	276,1	276,1	1300	356,2
C0	C6	5	40 %	368,2	184,1	1300	356,2
C0	C7	5	60 %	552,2	0	1300	356,2

C0 - Solo controle; **C1** - Solo com 1% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C2** – Solo com 5% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C3** - Solo com 10% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C4** - Solo com 20% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C5** - Solo com 30% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C6** - Solo com 40% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C7**- Solo com 60% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada.

Os testes de fuga com a espécie *F. candida* foram realizados seguindo os procedimentos descritos no protocolo ISO: 17512-2 (2011); seguiu-se o mesmo princípio dos testes de fuga com minhocas, porém os recipientes possuíam dimensões 7cm de diâmetro e 6cm de altura.

As combinações testadas foram as mesmas utilizadas no teste com as minhocas, porém os cálculos diferiram nas quantidades de solo e de vinhaça (bruta/tratada) utilizados; cinco repetições foram utilizadas para cada combinação; após a adição dos solos com vinhaça, (bruta/tratada de acordo com os tratamentos estabelecidos), nos compartimentos, a divisória de plástico foi removida e foram introduzidos 20 colêmbolos com 10 a 12 dias de idade (provenientes de culturas sincronizadas) sobre a linha de separação entre os dois lados.

Os recipientes foram fechados com tampas transparentes perfuradas. Os animais não foram alimentados durante o teste. Ao fim de 48h, o conteúdo de cada compartimento foi transferido para outro recipiente onde se adicionou água e algumas gotas de tinta nanquim azul para aumentar o contraste e facilitar a contagem dos colêmbolos que estavam sobre a água. Em seguida, o número de indivíduos presente em cada compartimento foi contabilizado e tal como para as minhocas os valores foram registrados para posterior análise estatística. Os valores utilizados para montagem do experimento foram os seguintes (Tabela 3):

Tabela 3. Distribuição das amostras de vinhaça bruta/tratada, solo e água no teste de fuga com *F. candida*.

Combinações		Réplicas	Porcentagem de Vinhaça bruta/tratada	Volume de Vinhaça bruta/tratada (mL)	Água – diluição (g)	Solo total (g)	Solo/compartimento (g)
C0	C0	8	0 %	0	1028,0	2420	42,7
C0	C1	5	1 %	1,2	71,0	170	42,7
C0	C2	5	5 %	6,0	66,2	170	42,7
C0	C3	5	10 %	12,0	60,2	170	42,7
C0	C4	5	20 %	24,1	48,1	170	42,7
C0	C5	5	30 %	36,1	36,1	170	42,7
C0	C6	5	40 %	48,1	24,1	170	42,7
C0	C7	5	60 %	72,2	0	170	42,7

C0 - Solo controle; **C1** - Solo com 1% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C2** – Solo com 5% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C3** - Solo com 10% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C4** - Solo com 20% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C5** - Solo com 30% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C6** - Solo com 40% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C7**- Solo com 60% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada.

4.10 Testes de reprodução com *E. andrei*, *E. crypticus* e *F. cândida*

Ambos os testes foram realizados no Laboratório de Ecologia e Ecotoxicologia de Solo do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra. Os ensaios de reprodução com *E. andrei* foram realizados de acordo com o protocolo proposto na ISO - 11268 9 (2011). Para montagem dos testes foram utilizados recipientes de vidro de dimensões 8cm de diâmetro e 16cm de altura, onde foram colocados solo preparado com vinhaça (bruta/tratada) de acordo com os tratamentos estabelecidos; 10 minhocas adultas (com clitelo aparente) previamente aclimatadas em solo controle durante 24h foram lavadas com água, pesadas e inseridas em cada unidade experimental. Os recipientes foram fechados com tampas perfuradas e cada réplica foi alimentada com estrume de vaca (5 g por réplica) durante as primeiras 4 semanas do teste. Utilizaram-se quatro réplicas por concentração e o ensaio teve duração total de 56 dias.

Após decorrido 28 dias do início do teste, as minhocas adultas foram removidas e não foi mais colocado alimento no teste até o final do experimento. Ao término de 56 dias, os recipientes foram colocados em banho-maria numa temperatura de 60 ± 5 °C, por aproximadamente 30 minutos com o intuito de forçar o deslocamento dos juvenis para a superfície do solo, facilitando deste modo, a contagem dos animais. O registro da contagem foi analisado estatisticamente.

As disposições da quantidade de solo e dos resíduos em cada réplica foram da seguinte forma (Tabela 4):

Tabela 4. Distribuição das amostras de vinhaça bruta/tratada, solo e água no teste de reprodução com *E. andrei*.

Tratamento	Réplicas	Porcentagem de Vinhaça bruta/tratada	Volume de Vinhaça bruta/tratada (mL)	Água – diluição (g)	Solo total (g)	Solo/réplica (g)
C0	4	0%	0	879,3	2070	712,4
C1	4	1 %	14,7	864,7	2070	712,4
C2	4	5 %	73,3	806,1	2070	712,4
C3	4	10 %	146,6	732,8	2070	712,4
C4	4	20 %	293,1	586,2	2070	712,4
C5	4	30 %	439,7	439,7	2070	712,4
C6	4	40 %	586,2	293,1	2070	712,4
C7	4	60 %	879,3	0	2070	712,4

C0 - Solo controle; **C1** - Solo com 1% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C2** – Solo com 5% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C3** - Solo com 10% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C4** - Solo com 20% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C5** - Solo com 30% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C6** - Solo com 40% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C7**- Solo com 60% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada.

Os testes de reprodução com *E. crypticus* foram realizados de acordo com o protocolo proposto na ISO-16387 (2013). Para a montagem dos testes foram utilizados recipientes de vidro de dimensões 5cm de diâmetro e 9cm de altura; 10 indivíduos adultos clitelados foram inseridos nos recipientes contendo solo com vinhaça (bruta/tratada) de acordo com os tratamentos estabelecidos. Os testes foram alimentados semanalmente com flocos de aveia moídos e os recipientes foram fechados hermeticamente. Semanalmente, os frascos foram abertos, de modo a permitir trocas gasosas e realizada a reposição umidade do solo. Foram realizadas cinco réplicas para cada tratamento (vinhaça bruta/tratada) mais uma réplica sem animal e oito réplicas para os controles mais uma réplica sem animal. A duração do teste foi de 28 dias e ao término deste período foi realizada a desmontagem do teste, onde foram adicionados em cada réplica álcool 80% e corante Rosa de Bengala 1%, as réplicas foram mantidas nestas soluções por no mínimo 12 horas para que pudesse ser iniciada a contagem dos animais. O registro da contagem foi analisado estatisticamente.

As disposições da quantidade de solo e dos resíduos em cada réplica foram da seguinte forma (Tabela 5):

Tabela 5. Distribuição das amostras de vinhaça bruta/tratada, solo e água no teste de reprodução com *E. crypticus*.

Tratamento	Réplicas	Porcentagem de Vinhaça bruta/tratada	Volume de Vinhaça bruta/tratada (mL)	Água – diluição (g)	Solo total (g)	Solo/réplica (g)
C0	9	0%	0	97,7	230	28,5
C1	6	1 %	1,2	71,0	170	28,5
C2	6	5 %	6,0	66,2	170	28,5
C3	6	10 %	12,0	60,2	170	28,5
C4	6	20 %	24,1	48,1	170	28,5
C5	6	30 %	36,1	36,1	170	28,5
C6	6	40 %	48,1	24,1	170	28,5
C7	6	60 %	72,2	0	170	28,5

C0 - Solo controle; **C1** - Solo com 1% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C2** – Solo com 5% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C3** - Solo com 10% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C4** - Solo com 20% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C5** - Solo com 30% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C6** - Solo com 40% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C7**- Solo com 60% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada.

Os testes de reprodução com *F. candida* foram realizados de acordo com protocolo proposto na ISO - 11267 (1999). Para a montagem dos testes foram utilizados recipientes de vidro de dimensões 5cm de diâmetro e 9cm de altura; 10 colêmbolos adultos, com idades entre 10 e 12 dias (provenientes de culturas sincronizadas), foram introduzidos em cada unidade experimental e os recipientes foram fechados hermeticamente. O teste foi alimentado com levedura granulada seca (fermento biológico) no início do teste e após decorrido 14 dias; semanalmente, os recipientes foram abertos para permitir trocas gasosas. Foram realizadas cinco réplicas por tratamento mais uma réplica sem animal. Decorrido 28 dias os testes foram desmontados; o solo de cada réplica foi despejado em outro recipiente onde foram adicionadas água e tinta nanquim azul para aumentar o contraste e assim facilitar a contagem dos juvenis. Cada réplica foi fotografada para posteriormente contagem no programa Image J. O registro das contagens dos animais foi analisado estatisticamente. As disposições da quantidade de solo e dos resíduos em cada réplica foram da seguinte forma (Tabela 6):

Tabela 6. Distribuição das amostras de vinhaça bruta/tratada, solo e água no teste de reprodução com *F. candida*.

Tratamento	Réplicas	Porcentagem de Vinhaça bruta/tratada	Volume de Vinhaça bruta/tratada (mL)	Água – diluição (g)	Solo total (g)	Solo/réplica (g)
C0	6	0%	0	80,7	190	30
C1	6	1 %	1,3	79,4	190	30
C2	6	5 %	6,7	74,0	190	30
C3	6	10 %	13,5	67,3	190	30
C4	6	20 %	26,9	53,8	190	30
C5	6	30 %	40,4	40,4	190	30
C6	6	40 %	53,8	26,9	190	30
C7	6	60 %	80,7	0	190	30

C0 - Solo controle; **C1** - Solo com 1% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C2** – Solo com 5% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C3** - Solo com 10% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C4** - Solo com 20% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C5** - Solo com 30% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C6** - Solo com 40% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; **C7**- Solo com 60% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada.

5. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados na forma de artigos científicos os quais serão submetidos às revistas especializadas na área.

- **ARTIGO 1: Vinhaça de cana-de-açúcar tratada para ajuste em pH neutro revela baixa toxicidade em bioindicador de solo**
- **ARTIGO 2: Neutralização de pH da vinhaça de cana-de-açúcar gera diminuição de processos de estresse e morte celular em representantes da fauna edáfica**
- **ARTIGO 3: Avaliação ecotoxicológica da influência da vinhaça da cana-de-açúcar bruta e após ajuste de pH em organismos do solo por meio de testes certificados pela ISO**

ARTIGO 1

Vinhaça de cana-de-açúcar tratada para ajuste em pH neutro revela baixa toxicidade em biondicador de solo

Cristina Moreira de Sousa¹²; Cleiton Pereira de Souza¹²; Jorge Evangelista Correia¹; Raphael Bastão de Souza³; Antônio Yabuki¹; Carmem Silvia Fontanetti¹

¹ UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), Campus Rio Claro, São Paulo, Brasil.

² CAPES, Fundação, Ministério da Educação do Brasil, Brasília DF 70040-020, Brasil.

³ UNICAMP (Universidade de Campinas), Escola de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Campinas, Brasil.

Autora correspondente: Cristina Moreira de Sousa, moreiradesousa.c@gmail.com

UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), Departamento de Biologia, Instituto de Biociências. Av. 24-A, 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

Resumo

Uma das principais destinações finais da vinhaça de cana-de-açúcar tem sido a fertirrigação. Para que essa prática fosse executada da melhor forma, normas para um uso adequado foram desenvolvidas com o intuito de se respeitar as características e os limites do solo para o recebimento deste resíduo; inúmeros benefícios foram relatados sobre a utilização da vinhaça como fertilizante para as culturas que a recebem, no entanto, pesquisas revelaram que a vinhaça ocasiona prejuízos aos representantes da fauna. Diante da ampla utilização da vinhaça nos cultivos este trabalho propôs o tratamento do resíduo com cal (CaO) para ajuste de seu pH em 7,0 (neutro), na tentativa de diminuir sua toxicidade para posterior uso no solo, uma vez que, um dos grandes problemas apresentados pela vinhaça é seu pH ácido. Para tanto, foram utilizados como organismos bioindicadores, diplópodos da espécie *Rhinocricus padbergi*, animais bem estabelecidos para testes ecotoxicológicos de solo. Os testes foram compostos de cinco grupos: 1. Grupo controle (animais expostos somente ao solo); 2. Grupo de animais expostos ao resíduo em sua forma bruta (na concentração estabelecida pela Norma da CETESB); 3. Grupo exposto ao dobro desta mesma concentração, simulando uma situação de super dosagem; 4. Grupo exposto ao resíduo tratado com cal com pH ajustado para o valor 7,0 (na concentração estabelecida pela Norma da CETESB); 5. Grupo exposto ao dobro desta última concentração. O tempo de exposição adotado foi 30 dias; decorrido este período os animais foram dissecados para retirada do intestino médio, o qual foi processado para análise em microscopia eletrônica de transmissão. Os animais expostos ao grupo controle apresentaram o intestino médio com integridade morfológica. Os animais expostos à vinhaça bruta, tanto na concentração estabelecida, quanto ao dobro desta, apresentaram diversas alterações morfológicas nas células do intestino médio. Os animais expostos à vinhaça tratada, tanto na concentração estabelecida, quanto o dobro de seu valor, apresentaram a morfologia do intestino médio com menos danos celulares quando comparados aos expostos à vinhaça bruta, atestando que o tratamento da vinhaça para ajuste de pH em nível neutro, representa uma alternativa viável para a utilização do resíduo como fertilizante.

Palavras-chaves: Toxicidade terrestre; Resíduo agroindustrial, MET; Milípede.

1. Introdução

A cana-de-açúcar no Brasil representa fator de destaque na economia do país; seu cultivo ocupa atualmente uma área de 10 milhões de hectares, principalmente nas regiões Sudeste e Nordeste (UNICA, 2018) e diante dessa expansão do setor sucroalcooleiro é inevitável à preocupação com o volume de resíduos gerados, dentre os quais se destaca a vinhaça, subproduto da produção do etanol, visto que, para cada litro de álcool são produzidos de 10 a 18 de vinhaça. Este líquido residual gerado a partir da calda de destilação do licor de fermentação do álcool de cana-de-açúcar apresenta coloração castanho-escuro, odor incômodo aos humanos, alto conteúdo orgânico (COD: 50-150 gL⁻¹), além de ser geralmente ácido (pH: 3,5-5) (SILVA et al., 2017; NOCELLI et al., 2017; CHRISTOFOLETTI et al., 2017).

Após grandes quantidades de vinhaça lançadas em corpos d'água terem causado graves problemas de poluição, foi instituído em 1978 no Brasil uma Portaria do Ministério do Estado do Interior (n. 323, de 1978), o qual proibiu o lançamento direto de vinhaça em qualquer corpo hídrico pelas destilarias de álcool instaladas no país (DEMATTÊ et al., 2004). Em virtude disso, surgiram as alternativas de reciclar a vinhaça por meio de processos de fermentação, fertirrigação, concentração por evaporação, aproveitamento da mesma na produção de leveduras, uso na produção de energia, além das propostas de tratamento da vinhaça com cal hidratada (Ca (OH)₂) e bicarbonato de sódio (NaHCO₃), com as finalidades de neutralizar a acidez, bem como a utilização como matéria-prima para ração animal (ROBERTIELLO, 1982; DÖLL; FORESTI, 2010).

No entanto, a vinhaça apresenta características antagônicas, na medida em que pode ser benéfica proporcionando resultados positivos nas culturas, aumentando a fertilidade do solo, pode também ocasionar situações de desbalanceamento nos compostos presentes no mesmo. As elevadas concentrações de nitrato, potássio e matéria orgânica podem alterar as características do solo proporcionando modificações em suas propriedades químicas e favorecendo o aumento da disponibilidade de alguns elementos para as plantas. Por outro lado, a vinhaça também pode promover modificações das propriedades físicas do solo ocasionando elevação da capacidade de infiltração da água com consequente aumento da probabilidade de lixiviação de íons, contaminando águas subterrâneas quando em concentrações elevadas. Pode também promover dispersão de partículas do solo, com redução da sua taxa de infiltração de água e elevação do escoamento superficial, com possível contaminação de águas

superficiais (MEDEIROS et al., 2003; SILVA et al., 2007; BARROS et al., 2010). Por essa razão a Norma Técnica P4.231 (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 2015) estabelece os critérios e os procedimentos para aplicação adequada da vinhaça ao solo, levando em consideração vários parâmetros físico-químicos e de potencial agronômico do solo.

Vale ressaltar que, mesmo com o estabelecimento de normas que conduzem a uma utilização segura deste resíduo, inúmeros estudos demonstram que a utilização da vinhaça na fertirrigação apresentou não só vantagens do ponto de vista econômico e com melhorias nos cultivos, mas, sobretudo desvantagens quando se trata dos efeitos e impactos gerados em diferentes organismos bioindicadores (SILVA et al., 2007; LYRA, 2003; 2008; CHRISTOFOLETTI et al., 2013; 2016; PEDRO-ESCHER et al. 2014; 2016; GARCIA et al., 2017; COELHO et al., 2017; SOUZA et al., 2017).

O estreito contato com solo faz de alguns grupos taxonômicos de invertebrados excelentes bioindicadores da qualidade do solo, tais como, Isopoda, Collembola, Oligochaeta e Diplopoda (NATAL-DA-LUZ et al., 2004; SOCHOVÁ et al., 2006; FONTANETTI et al., 2011; 2012). Os diplópodos são animais cosmopolitas que colonizam camadas de solo em diferentes extensões, participam de processo de formação do solo e atuam como decompositores revolvendo o solo onde se encontram; diante dessas características e das respostas biológicas que fornecem representam excelentes bioindicadores de solo (PETERSEN, LUXTON, 1982; FONTANETTI et al., 2011; 2012; SOUZA et al., 2014).

Como o processo de calagem é comumente executado nas culturas de cana-de-açúcar para promover neutralização de Al^{3+} , elevação do pH, fornecimento de Ca^{+2} e Mg^{+2} , que consequentemente possibilitam a proliferação das raízes e as tornam resistentes mesmo em períodos de seca, por esta razão justifica-se a utilização da cal para neutralização do pH da vinhaça.

O objetivo deste trabalho foi verificar se o tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar com a finalidade de neutralizar seu pH (7,0) diminui sua toxicidade, expondo animais bioindicadores às concentrações do resíduo a partir da Norma Técnica P4.231 estabelecida pela Companhia de Tecnologia de Saneamento do Estado de São Paulo (CETESB), comparando os resultados obtidos com os de animais expostos à vinhaça bruta. A proposta da pesquisa foi oferecer evidências que o tratamento por ajuste de pH torne o resíduo viável não só economicamente, mas também ambientalmente.

2. Material e métodos

2.1 Solo

O solo utilizado para os bioensaios, classificado como latossolo (OLIVEIRA, 1999), foi coletado no local onde diplópodos foram obtidos (campus da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Rio Claro) (22° 24' 36'S/ 47° 33' 36' W), São Paulo, Brasil. As amostras de solo, utilizadas tanto para o controle quanto para a mistura com o resíduo, foram coletadas a uma profundidade de 20 cm; o solo foi previamente seco à temperatura ambiente, peneirado com uma de tela de 4 mm e analisado quimicamente.

2.2 Vinhaça de cana-de-açúcar

O resíduo foi coletado em usina localizada no interior do estado de São Paulo, Brasil. O efluente foi submetido a análises físico-químicas e mantido em câmara fria a 4°C até a montagem dos experimentos.

A aplicação da vinhaça bruta (com características físico-químicas mantidas desde a coleta na usina), bem como da vinhaça tratada para ajuste de pH (com adição de CaO até que o pH atingisse o valor 7,0) simulou a situação de fertirrigação empregada nas culturas aplicadas a partir de concentrações segundo legislação vigente (CETESB P4.231, 2015).

2.3 Caracterização química das amostras

As análises, química e físico-química, das amostras de solo e das amostras de vinhaça foram realizadas pelo laboratório ASL Análise Ambiental (Rio Claro, São Paulo, Brasil).

A caracterização de amostras de solo foi baseada em macronutrientes e micronutrientes (P, K, Ca, Mg, Al), matéria orgânica, pH, capacidade de troca catiônica (CTC), porcentagem de saturação de base e saturação de alumínio.

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

2.4 Cálculo para aplicação da vinhaça no solo (Norma Técnica – CETESB – P4.231)

Para calcular a dosagem adequada de vinhaça a ser aplicada no solo foram necessárias as análises físico-químicas da mesma e do potencial agronômico do solo, juntamente com os critérios e procedimentos para aplicação da vinhaça no solo agrícola estabelecidos pela Norma Técnica P4.231 da Companhia de Tecnologia de Saneamento do Estado de São Paulo (CETESB, 2015), agência governamental responsável pela fiscalização de atividades poluidoras no estado de São Paulo, Brasil. Neste estudo foi discriminado o termo “concentração de campo” para dosagem de vinhaça estipulada pela norma.

2.4 Material biológico

Foram utilizados como organismo-teste, indivíduos adultos da espécie *Rhinocricus padbergi*. Os espécimes foram coletados no campus da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, (22° 24' 36'S/ 47° 33' 36' W) São Paulo, Brasil. Os animais foram previamente aclimatados em laboratório por 30 dias em terrário contendo como substrato terra oriunda do local de coleta, temperatura de $\pm 23^{\circ}$ C e fotoperíodo controlado 12 horas claro/12 horas escuro.

2.6 Bioensaios com *R. padbergi*

Para a montagem dos experimentos foram utilizados 15 terrários de dimensões 20 cm de largura, 25 cm de altura e 45 cm de comprimento, nos quais foram colocados 5 Kg de solo em cada. Os bioensaios foram montados em triplicata de acordo com os tratamentos propostos e em conformidade com a Norma P4.231 (CETESB, 2015), organizados da seguinte forma:

- 1. Solo Controle:** 5 Kg de solo + 10 diplópodos.
- 2. Vinhaça bruta na concentração de campo:** 5 Kg de solo + 73,5 mL de vinhaça bruta + 10 diplópodos.
- 3. Vinhaça bruta no dobro da concentração de campo:** 5 Kg de solo + 147 mL de vinhaça bruta + 10 diplópodos.
- 4. Vinhaça tratada (pH neutro) na concentração de campo:** 5 Kg de solo + 73,5 mL de vinhaça tratada + 10 diplópodos.

5. Vinhaça tratada (pH neutro) no dobro da concentração de campo: 5 Kg de solo + 147 mL de vinhaça tratada + 10 diplódodos.

2.7 Dissecção dos animais

Decorrido o período de 30 dias de exposição dos animais aos resíduos foram coletados três indivíduos de cada tratamento; os animais foram anestesiados com éter sulfúrico e dissecados em placas de petri contendo solução fisiológica; o intestino médio foi retirado e as amostras do material foram previamente limpas; pequenos fragmentos do intestino médio foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0.1M a 4°C por 24 horas, após a fixação o material foi transferido para o tampão fostato de sódio (pH 7,4) e armazenado a 4°C para posterior processamento.

2.8 Ultraestrutura

Para a análise ultraestrutural as amostras fixadas foram lavadas em tampão cacodilato e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas. O material foi novamente lavado no mesmo tampão, colocado em álcool 10% por 15 minutos e contrastado com acetato de uranila 2% em álcool 10% por 4 horas. Em seguida, foi feita uma desidratação em série crescente de acetona e submetido à solução resina: acetona (1:1) por 12 horas; o material foi embebido em resina Epon-araldite com catalisador por 24 horas e levado para estufa a 70°C por 24 horas para a polimerização da resina, em seguida foi seccionado em ultramicrotomo e as grades obtidas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 100 para posterior documentação.

2.9 Análises dos resultados

A ultraestrutura do intestino médio dos diplódodos expostos a vinhaça bruta e tratada para ajuste de pH (ambas na concentração de campo e no dobro desta mesma concentração), foi descrita qualitativamente e as alterações morfológicas observadas foram analisadas semi-quantitativamente para cada diplópodo. O protocolo para tais alterações foi proposto por Christofoletti et al. (2016), o qual propõe as seguintes classificações: (1) patologia de importância mínima, ou seja, alterações morfológicas facilmente reversíveis quando expostos a agentes estressantes; (2) patologia de importância moderada, a lesão do tecido é reversível, na maioria dos casos, quando o agente estressor é neutralizado; (3) patologia de importância acentuada, onde a alteração

geralmente é irreversível, resultando na perda parcial ou total da função do órgão. Juntamente com estas classificações foram adicionados critérios do protocolo estabelecido por Köhler e Triebkorn (1998), que propuseram que as alterações devem ser classificadas de acordo com três categorias (estado de controle; compensação/reação e não compensação/destruição) e que para cada secção do tecido analisado deve-se examinar um mínimo de cinco células, resultando num número de quinze células investigadas por réplica.

A adequação dos protocolos para avaliação da toxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar foi investigada por meio dos impactos ultraestruturais que este resíduo provocou nos tecidos do intestino médio dos diplopodos (região de tubo digestório responsável pela maior parte da digestão destes animais) expostos aos tratamentos descritos anteriormente.

A tabela 1 traz as classificações para os danos investigados no presente trabalho, bem como o fator de importância atribuído para cada dano observado no intestino médio dos animais.

Escore de 0 a 6 foram utilizados para classificar o exame das alterações ultraestruturais dependendo do nível ou extensão da alteração: (0) inalterada; (2) pequena alteração; (4) alteração moderada e (6) alteração grave. Escores intermediários também foram utilizados. Os escores (a) foram multiplicados pelo fator de importância de cada alteração (w) para definir um índice de dano (I) por indivíduo. Os resultados da avaliação ultraestrutural semiquantitativa foram obtidos comparando as alterações nos tecidos do intestino médio de indivíduos expostos aos solos contaminados com as diferentes concentrações de vinhaça aos indivíduos expostos ao solo controle.

A distribuição dos dados quanto à normalidade e a homogeneidade de variâncias foram avaliadas pelos testes de Shapiro Wilk e Levene, respectivamente. De modo a não violar o pressuposto de homogeneidade de variâncias para a aplicação de um teste paramétrico, os dados foram transformados por meio dos valores de raiz quadrada. Realizou-se então com o Teste de Análise de Variâncias (ANOVA) um critério, seguido pelo Teste de Dunnett para comparações múltiplas dos efeitos entre os diferentes grupos.

3. Resultados

3.1 Análises químicas das amostras

Os valores sobre o potencial agrônômico e fertilidade do solo, os quais são fundamentais para os cálculos de aplicação do resíduo no solo de acordo com a legislação brasileira encontram-se na tabela 2. Na tabela 3 são apresentadas as análises físico-químicas e de metais das amostras de solo e de vinhaça. Os valores de DBO e DQO são considerados altos, demonstrando grande quantidade de matéria orgânica; o pH apresenta valor baixo, confirmando a acidez do resíduo e as quantidades de metais não se apresentaram significativas de acordo com a legislação que prevê as quantidades desses elementos no solo (VALORES ORIENTADORES PARA SOLO E ÁGUA SUBTERRÂNEA NO ESTADO DE SÃO PAULO, 2016).

3.2 Ultraestrutura

3.2.1 Grupo controle

A análise ultraestrutural do intestino médio dos animais do grupo controle demonstrou-se de acordo com o padrão descrito para espécie *R. padbergi* (FONTANETTI et al., 2015). O epitélio apresentou células absortivas (também chamadas de células principais), dotadas de microvilosidades íntegras e núcleos íntegros; o citoplasma destas células apresentou-se eletrondenso com mitocôndrias alongadas, localizadas preferencialmente na região apical, grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso e esferocristais (Fig. A1). Abaixo do epitélio as células hepáticas apresentaram os núcleos íntegros e citoplasma eletrólúcido e heterogêneo, com poucos vacúolos autofágicos de conteúdo eletrondenso; o material intercelular estava preservado com presença de traquéolas, as quais são comumente observadas no órgão sadio (Fig. A2).

3.2.2 Grupo exposto à vinhaça bruta – concentração de campo

As células epiteliais observadas neste grupo apresentaram poucas alterações. As microvilosidades apresentaram diminuição no tamanho e na presença ao longo do epitélio (seta na Fig. A3); o citoplasma apresentou grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso exibindo um arranjo mielínico, onde as cisternas estavam dispostas de maneira concêntrica, e que em algumas células promoveram a alteração da morfologia do núcleo (Fig. A3). Também se observou dilatação e degranulação das cisternas do RER (setas na Fig. A4). Observou-se aumento dos espaços intercelulares entre as células absortivas (setas na Fig. A5). Houve perda da integridade das membranas das células hepáticas e condensação do citoplasma, resultando em um

citoplasma eletrondenso (Fig. A6). Todas as alterações foram estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (Tabela 4).

3.2.3 Grupo exposto à vinhaça bruta – dobro da concentração de campo

A análise do intestino médio deste grupo revelou alterações morfológicas mais acentuadas, quando comparadas ao tratamento anterior.

No epitélio foram observadas redução (Fig. B1) e em alguns pontos perda total das microvilosidades (Fig. B2) das células absortivas; aumento de liberação de vesículas de secreção com conteúdo heterogêneo pelas microvilosidades em toda extensão do epitélio (Fig. B3 e detalhe); alteração do conteúdo citoplasmático das células absortivas (Fig. B2); aumento no número de dilatação e degranulação das cisternas do RER (Fig. B4). Em parte do material a região epitelial apresentou desprendimento celular; houve perda da integridade citoplasmática das células epiteliais (citoplasma completamente danificado), bem como perda da adesão intercelular (setas na Fig. B1) indicativo do processo de morte celular. A camada de células hepáticas apresentou-se bastante danificada, com perda da integridade do núcleo e do citoplasma, bem como das membranas citoplasmáticas revelando alteração do conteúdo citoplasmático (Fig. B5). Todas as alterações foram estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (Tabela 4).

3.2.4 Grupo exposto à vinhaça tratada – concentração de campo

Observou-se que não houve danos celulares comparando aos tratamentos anteriores. As células epiteliais mantiveram a integridade morfológica e organelas íntegras (Fig. C1); a camada de células hepáticas apresentou citoplasma eletrólucido e homogêneo, repleto de gotículas lipídicas (setas na Fig. 2C). As células não apresentaram alterações estatisticamente significativas.

3.2.5 Grupo exposto à vinhaça tratada – dobro da concentração de campo

Observou-se que neste tratamento foi mantida a integridade morfológica do epitélio (Fig. C3); a camada de células hepáticas apresentou-se preservada (Fig. C4). No geral a morfologia do tecido apresentou-se similar ao padrão morfológico descrito no controle. As células não apresentaram alterações estatisticamente significativas.

4. Discussão

A utilização da vinhaça de cana-de-açúcar na fertirrigação é uma prática que levanta muitos questionamentos do ponto de vista científico. Inúmeros pesquisadores a defendem como um excelente fertilizante, uma vez que, aumenta a produtividade nas culturas, enriquece e aumenta a fertilidade do solo (FEIGIN et al., 1991; FREIRE; CORTÊZ, 2000; MEDEIROS et al., 2003; BEBÉ et al., 2009; BARROS et al., 2010; ESPAÑA-GAMBOA, 2011; SILVA et al., 2014). Porém, vários estudos apontam que o uso desse resíduo como fertilizante ainda apresenta risco ao meio ambiente (CHRISTOFOLETTI et al., 2013a; b; 2016; PEDRO-ESCHER et al., 2014; 2016; MARINHO et al., 2014; CORREIA et al., 2017a; b; GARCIA et al., 2017; COELHO et al., 2017; SOUZA et al., 2017; ALFARO-SOTO, et al., 2017; SOUZA-CAMPANA, et al., 2017).

A utilização de animais biondicadores, em contato com o resíduo, juntamente com análises morfológicas de seus tecidos, fornece uma importante análise sobre os possíveis impactos que a vinhaça pode ocasionar na fisiologia, bem como na morfologia celular destes animais (KÖHLER, TRIEBSKORN, 1988; CHRISTOFOLETTI et al., 2016). Sabe-se que o contato com o ambiente externo pode ocasionar impactos e modificações fisiológicas em órgãos e tecidos, que conseqüentemente são refletidos na constituição ultraestrutural das células (STORCH, 1988; BERTOSSA, 2011). Somado as análises qualitativas, a abordagem quantitativa para avaliar as reações de estresse ultraestrutural tem ganhado destaque nos campos da patologia, toxicologia e ecotoxicologia (KÖHLER, TRIEBSKORN, 1988; DITTBRENNER et al. 2011; CHRISTOFOLETTI et al., 2016).

O presente estudo traz a combinação das análises qualitativas com análises semiquantitativas das alterações ultraestruturais oferecendo uma melhor classificação nas análises dos efeitos da vinhaça da cana-de-açúcar bruta e após neutralização de seu pH, sobre um bioindicador de solo.

As observações realizadas neste trabalho corroboram ao que se tem encontrado na literatura. Os animais do grupo controle apresentaram a constituição ultramorfológica do intestino médio semelhante ao descrito para a espécie *R. padbergi* por Camargo-Mathias et al. (2004), logo, essa constituição celular sinaliza que o órgão encontra-se saudável.

A ultramorfologia do intestino médio dos animais expostos à vinhaça bruta, tanto na concentração de campo, quanto os expostos ao dobro da concentração, apresentaram danos morfológicos consideráveis.

A exposição à concentração de campo revelou nas células absorptivas diminuição, em número e tamanho, das microvilosidades ao longo do epitélio, enquanto que na exposição ao dobro da concentração de campo houve redução e perda das microvilosidades. Sabe-se que as microvilosidades além de aumentar a superfície também possuem função de manter o equilíbrio homeostático interno, adesão celular, absorção e secreção (STEVENS, LOWE, 2002). Porém, quando ocorre redução ou o desaparecimento das microvilosidades, sugere-se que estas alterações sejam uma resposta ao processo de intoxicação celular, pois a perda das microvilosidades geralmente está relacionada com a concentração do agente toxicante (CHARLES; DE BARJAC, 1983; ARRUDA et al., 2008). Kölher e Triebkorn (1998) classificaram a redução em número das microvilosidades como um processo de compensação, ou seja, uma reação frente a um agente estressor, enquanto que, o total desaparecimento das microvilosidades implicam num processo de não-compensação, ou seja, um sintoma de destruição num modo não reversível de alteração ultramorfológica.

Diante destas observações pode-se inferir que, no presente estudo, este foi um recurso em diminuir a superfície de contato e, conseqüentemente, diminuir a absorção do resíduo nocivo ao organismo, na tentativa de manter o equilíbrio homeostático e a viabilidade das células, sendo reversível diante da ausência do agente estressor.

O citoplasma das células absorptivas dos animais, expostos à concentração de campo da vinhaça, apresentou um aumento na quantidade de retículo endoplasmático rugoso, os quais apresentaram uma estruturação concêntrica das cisternas, resultando na deformação do núcleo em diversas células. De acordo com a literatura este arranjo mielínico das cisternas é uma forma espacialmente econômica para uma célula com abundância de RER e com necessidade de espaço para acúmulo temporário de determinadas substâncias (BIOLOGIA CELULAR ATLAS DIGITAL, 2018).

Tanto na exposição à concentração de campo da vinhaça, quanto ao dobro da concentração, verificou-se que o retículo endoplasmático rugoso apresentou dilatação e degranulação das cisternas. Kölher e Triebkorn (1998) listaram os processos de dilatação e degranulação do RER como alterações celulares reversíveis, segundo os autores esses processos representam um sintoma de reação celular, onde as alterações ultraestruturais não afetaram a integridade morfológica das organelas, mas refletiram alterações fisiológicas. Outras explicações também são atribuídas a estes processos, pois de acordo com outros autores, alterações na morfologia do RER podem indicar que as células estão severamente afetadas, pois as áreas de dilatação das cisternas livres de

ribossomos possivelmente estão retendo produtos de secreção (HASSUNUMA, 2006). Matsuo et al. (1996; 1998) observaram que a dilatação das cisternas sugere algum distúrbio na via de transporte das proteínas produzidas e acúmulo de material intracisternal. Possivelmente um agente estressor interfere no mecanismo de transporte intracelular, retardando o material proteico dentro das cisternas do RER.

Kubota et al. (2005) mencionaram que um caso de estresse no RER pode alterar o processo de síntese e retenção das proteínas e isso favorece a ativação de caspases, as quais atuam no DNA, provocando danos que poderiam levar a apoptose. A literatura também aponta que quando a célula encontra-se muito ativa, com alta síntese proteica, há dilatação das cisternas do RER e os ribossomos se desligam do RER (BIOLOGIA CELULAR ATLAS DIGITAL, 2018).

Para o presente estudo sugere-se que essas alterações no RER estejam relacionadas à exposição à vinhaça. Por analogia houve um aumento na quantidade dos processos de dilatação e degranulação das cisternas dos animais expostos ao grupo da vinhaça bruta na concentração de campo em relação à vinhaça no dobro da concentração. O resíduo pode ter provocado um estresse no RER e, conseqüentemente, a retenção das proteínas nas cisternas.

O grupo exposto à concentração de campo da vinhaça revelou aumento dos espaços intercelulares entre as células epiteliais, enquanto que o grupo exposto ao dobro da concentração revelou a perda de adesão celular. As junções celulares são responsáveis por proporcionar estabilidade entre as células epiteliais (KIERSENBAUM; TRES, 2016). Se houver a formação, bem como a ampliação dos espaços intercelulares, isso pode refletir em efeitos iniciais de processo de morte celular, uma vez que os complexos funcionais foram rompidos permitindo a formação destes espaços e conseqüente separação das células (STEINLY; BEREBAUM, 1985; REY et al., 1999).

Esse processo pode ser entendido como uma supressão na síntese de moléculas de adesão e conseqüente desintegração das junções celulares levando à dissociação e perda da coesão entre as células (CHEVILLE, 1994). Deste modo, propõe-se que os espaços celulares formados observados entre as células epiteliais analisadas na exposição à vinhaça na concentração de campo, bem como a perda da adesão intercelular verificada no tratamento com o dobro da concentração da vinhaça, seja um indicativo de que estas células estavam perdendo as moléculas que conferem a junção celular e num estado de dilatação mais severa destes espaços as células perderam

totalmente a coesão celular, atingindo o processo de morte celular, visto que, a perda de limites de células está entre as principais características de células em morte (ZAKERI; LOCKSHIN, 2002).

O grupo da vinhaça na concentração de campo demonstrou nas células hepáticas um estado de condensação citoplasmática, visto que as células apresentaram redução do volume celular e um estado de retração. Esse tipo de alteração celular também pode ser entendido como um processo de hipotrofia, uma adaptação celular em resposta a um determinado estímulo (PORTH; GROSSMAN, 2016). Em células encolhidas o citoplasma curva-se e apresenta projeções irregulares do citoplasma (MORRIS et al., 1986). A razão para o estado de plasmólise pode estar relacionada com a capacidade da célula em regular seu volume face ao desafio osmótico, considerado um mecanismo homeostático celular fundamental (HALLOWS; KNAUF, 1993). O estresse osmótico é um potente regulador da função normal das células que se encontram expostas a ambientes osmoticamente ativos em condições fisiológicas ou patológicas. Alterações na osmolaridade extracelular alteram o volume celular e, portanto, a concentração de macromoléculas intracelulares (RAND et al., 2000; FINAN; GUILAK, 2010). O pH é um fator que também afeta a estrutura e a atividade das macromoléculas biológicas (NELSON; COX, 2014). Sendo assim pode-se inferir que a exposição da vinhaça tenha alterado o meio extracelular, uma vez que este resíduo apresenta um pH ácido, além da presença de metais, e deste modo pode ter provocado um estresse osmótico desequilibrando a permeabilidade das membranas, bem como sua regulação interna e a mobilidade de solutos.

O processo de desprendimento celular foi observado com frequência no epitélio do intestino médio dos animais expostos ao dobro da concentração de vinhaça, o que permite ser interpretado como um processo de morte celular, pois houve total desintegração do núcleo e do citoplasma. De acordo com as observações feitas por Christofolletti et al. (2016) em suas análises histopatológicas, o desprendimento celular, aqui observado, pode ser entendido como um processo de renovação celular.

A renovação celular atesta que ocorreu uma lesão tecidual, com possível substituição de células e a finalidade de manter a integridade e funcionalidade do epitélio. Quando a ocorrência deste processo ocorre de maneira moderada é considerado um processo fisiológico normal, devido ao crescimento e divisão de células regenerativas (HOPKIN, READ, 1992), porém células epiteliais expostas a diferentes contaminantes estão sujeitas a alterações que podem levar à morte, representando uma

alternativa do organismo do animal em compensar o dano sofrido após a ingestão de solo contaminado (SOUZA; FONTANETTI, 2011).

A camada de células hepáticas concentra-se ativamente na desintoxicação do organismo quando é prejudicado por substâncias tóxicas (KÖHLER et al., 2002). A tentativa de manter a homeostase e o equilíbrio iônico fazem com que as células hepáticas absorvam metais e demais substâncias e assim evitem comprometer todo o organismo. Diversos estudos apontam a reação da camada das células hepáticas frente a agentes contaminantes, o que sugere uma resposta do tecido, perante aos agentes estressores, mediando e defendendo as células (FONTANETTI et al., 2006; GODOY; FONTANETTI, 2010; NOGAROL; FONTANETTI, 2010; PEREZ; FONTANETTI, 2011; MERLINI et al., 2012).

Tanto os processos de condensação citoplasmática, quanto à ocorrência da perda de integridade citoplasmática, observados nas células hepáticas do presente estudo sinalizam a reação destas células frente à exposição à vinhaça. Com efeito, estas células desempenharam sua função até que a concentração da vinhaça excedesse o limite de desintoxicação das células hepáticas, levando-as a morte nos animais do grupo exposto ao dobro da concentração.

Os animais expostos à vinhaça tratada (pH neutro) na concentração de campo não demonstraram alterações ultramorfológicas, comparativamente aos grupos com a vinhaça bruta. Nesta concentração as células epiteliais, tal como suas organelas revelaram total integridade e a camada de células hepáticas apresentou citoplasma homogêneo e eletrólucido similar ao material do grupo controle.

No dobro da concentração de campo da vinhaça tratada, também não houve alteração ultramorfológica nas células epiteliais; a morfologia observada foi muito semelhante ao descrito para a o grupo controle, o que evidencia que o tratamento da vinhaça para ajuste de seu pH é de fato uma alternativa viável para que o resíduo amenize os impactos que, comprovadamente, acarreta no meio ambiente.

O tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar com cal (CaO) foi um recurso também utilizado por Correia et al. (2017b), que verificaram o potencial tóxico da vinhaça fazendo uso de tilápias (*Oreochromis niloticus*) como organismos bioindicadores. O objetivo dos autores foi ajustar o pH, neutralizando-o e assim observar os efeitos da mesma nos animais expostos; o resultado foi satisfatório, uma vez que reduziu a mortalidade dos peixes em concentrações que previamente apresentaram danos ao DNA, provando que este recurso demonstrou ser uma alternativa eficaz.

5. Conclusão

Em síntese, o presente estudo forneceu informações bastante pertinentes a cerca das respostas ultramorfológicas obtidas diante da exposição de animais biondicadores à vinhaça da cana-de-açúcar em sua forma bruta e após a neutralização de seu pH. As alterações celulares analisadas sob a ótica semiquantitativa atrelada à análise qualitativa, também permitiram uma classificação mais adequada dos danos celulares. O tratamento da vinhaça para ajuste de pH representou uma alternativa viável no que diz respeito aos impactos causados aos animais habitantes do solo utilizados neste trabalho; o contato com o resíduo tratado, apresentando pH neutro, apresentou menores danos celulares aos animais, atestando sua viabilidade e um possível meio de utilização da vinhaça como fertilizante.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), a FAPESP (processo: 2012/50197-2) e ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisas) pelo apoio financeiro.

7. Referências

ALFARO-SOTO, M.; BASSO, J. B.; KLANG, C. H. Impacto da fertirrigação da cana-de-açúcar por vinhaça nas propriedades físicas, químicas e hidráulicas do solo. In: FONTANETTI, C.S.; BUENO, O.C. (Org.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. 1ed. Bauru, SP: Canal 6, v. 1, p. 103-124, 2017.

ARRUDA, W.; CAVASIN, G. M.; SILVA, I. G. Estudo ultra-estrutural do efeito da toxicidade do extrato a *Magonia pubescens* (st. hil .) no mesêntero de larvas de *Aedes aegypti* (l.) (Diptera: Culicidae). **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 3, p. 255-267, 2008.

BARROS, R. P.; VIÉGAS, P. R. A.; SILVA, T. L.; SOUZA, R. M.; BARBOSA, L.; VIÉGAS, R. A.; BARRETO, M. C. V.; MELO, A. S. Alterações em atributos químicos de solo cultivado com cana-de-açúcar e adição de vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 3, p. 341-346, 2010.

BEBÉ, F. V.; ROLIM, M. M.; PEDROSA, E. M. R.; SILVA, G. B.; OLIVEIRA, V. S. Avaliação de solos sob diferentes períodos de aplicação com vinhaça. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 6, p. 781-787, 2009.

BERTOSSA, R. C. Morphology and behaviour: functional links in development and evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 366, p. 20556-2068, 2011.

BIOLOGIA CELULAR ATLAS DIGITAL. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/biologiacerularatlas/org1.htm> Acessado em: 24 de Abril de 2018.

CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FANTAZZINI, E. R.; FONTANETTI, C. S. Ultrastructural features of the midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda: Spirobolida). **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 21, n. 2, p. 65-71, 2004.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – **Norma Técnica P4.231: Vinhaça: Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola**, 3ed, 2ª versão, pp15, 2015.

CHARLES, J. F., DE BARJAC, H. Action des cristaux de *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* sur l'intestin moyen des larves de *Aedes aegypti*, en microscopie életronique. **Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie**, v134, n.2, Supplement A, p. 197-218, 1983.

CHEVILLE, N. F. **Utrastructural Pathology: an introduction to interpretation**. Editora: Wiley, pp. 946, 1994.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; FRANCISCO, A.; PEDRO-ESCHER, J.; GASTALDI, V. D.; FONTANETTI, C. S. Diplopods as Soil Bioindicators of Toxicity After Application of Residues From Sewage Treatment Plants and Ethanol Industry. **Microscopy and Microanalysis**, v. 22, p. 1098–1110, 2016.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; MOREIRA-DE-SOUSA, C.; SOUZA, R. B.; FRANCISCO, A.; GASTALDI, V. D. O emprego de diferentes resíduos utilizados como fertilizantes na cultura de cana-de-açúcar. . In: FONTANETTI, C.S.; BUENO, O.C. (Org.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. 1ed. Bauru, SP: Canal 6, v. 1, p. 63-86, 2017.

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

CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C. S. Assessment of the Genotoxicity of Two Agricultural Residues After Processing by Diplopods Using the *Allium cepa* Assay. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 224, p. 1523-1537, 2013b.

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

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

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

DEMATTÊ, J.A.M.; GAMA, M.A.P.; COOPER, J.C.A.; NANNI, M.R.; FIORIO, P.R. Effect of fermentation residue on the spectral reflectance properties of soils. **Geoderma**, v. 120, p. 187-200, 2004.

DITTBRENNER, N.; SCHMITT, H.; CAPOWIEZ, Y.; TRIEBSKORN, R. Sensitivity of *Eisenia fetida* in comparison to *Aporrectodea caliginosa* and *Lumbricus terrestris* after imidacloprid exposure. Body mass change and histopathology. **Journal of Soils and Sediments**, v. 11, p. 1000–1010, 2011.

DÖLL, M. M. R.; FORESTI, E. Efeito do bicarbonato de sódio no tratamento de vinhaça em AnSBBR operado a 55 e 35°C. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 15, n. 3, p. 275-282, 2010.

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

FEIGIN, A.; RAVINA, I.; SHALHEVET, J. **Irrigation with treated sewage effluent: management for environmental protection**. Berlin: Springer-Verlag, pp. 224, 1991.

FINAN, J. D.; GUILAK, F. The effects of osmotic stress on the structure and function of the cell nucleus. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 109, n. 3, p. 460–467, 2010.

FONTANETTI, C. S.; MOREIRA DE SOUSA, C.; PINHEIRO, T. G.; SOUZA, R. B.; FRANCISCO, A. **Diplopoda-Digestive System**. In: Alessandro Minelli. (Org.). Treatise on Zoology-Anatomy, Taxonomy, Biology. 1ed. Leiden-Boston: Brill, v. 2, p. 109-128, 2015.

FONTANETTI, C. S.; NOGAROL, L. R.; SOUZA, R. B.; PEREZ, D. G.; MAZIVIERO, G. Bioindicators and Biomarkers in the Assessment of Soil Toxicity. In: Simone Pascucci. (Org.). **Soil Contamination**. 1ªed. Rijeka, Croácia: InTech, p. 143-168, 2011.

FONTANETTI, C. S.; PINHEIRO, T. G.; SOUZA, R. B.; MARCATO, A. C. C.; MOREIRA-DE-SOUSA, C. M. Electron microscopy and the responses of terrestrial invertebrates against contaminants of soil. In: Antonio Méndez-Vilas. (Org.) **Current**

Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology. 1ed.Espanha: FORMATEX, v. 1, p. 335-342, 2012.

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

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

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

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

HALLOWS, K. R.; KNAUF, P. A. **Cellular and Molecular physiology of cell volume regulation**. In: STRANGE, K. (ed). 1st Edition. Editora: Boa Raton, FL: CRC Press, pp. 416, 1993.

HASSUNUMA, R. M. **Estudo Morfológico Ultraestrutural e Imuno-Histoquímico da Influência do Excesso de Flúor no Desenvolvimento do Germe Dental de Incisivo de Rato**. Tese de Doutorado. Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo. 199p, 2006.

HOPKIN, S.P.; READ, H. J. **The biology of millipedes**. New York: Oxford University Press, 2nd ed., 233pp, 1992.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e Biologia Celular - Uma Introdução À Patologia**. 4^a Ed. pp. 752, 2016.

KUBOTA, K.; LEE, D. H.; TSUCHIYA, M.; YOUNG, C. S.; EVERETTI, E. T.; MARTINEZ-MIER, E. A.; SNEAD, M. L.; NGUYEN, L.; URANO, F.; BARTLETT, J. D. Fluoride induces endoplasmic reticulum stress in ameloblasts responsible for dental enamel formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 24, p. 23194–23202, 2005.

KÖHLER, H. R. Localization of metals in cells of saprophagous soil arthropods (Isopoda, Diplopoda, Collembola). **Microscopy Research and Technique**, v. 56, p. 393-401, 2002.

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

LYRA, M. R. C. C. **Estudo comparativo da aplicação da vinhaça tratada e in natura em solos sob o cultivo de cana-de-açúcar**. 140p. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Departamento de Engenharia Civil, Recife, PE, 140p, 2008.

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

MATSUO, S.; INAI, T.; KURISU, K.; KIYOMIYA, K.; KUREBE, M. Influence of fluoride on secretory pathway of the secretory ameloblast in rat incisor tooth germs exposed to sodium fluoride. **Archives of Toxicology**, v. 70, n. 7, p. 420-9, 1996.

MATSUO, S.; KIYOMIYA, K.; KUREBE, M. Mechanism of toxic action of fluoride in dental fluorosis: whether trimeric G proteins participate in the disturbance of intracellular transport of secretory ameloblast exposed to fluoride. **Archives of Toxicology**, v. 72, n. 12, p. 798-806, 1998.

MEDEIROS, S. C. L.; RIBEIRO, S. R.; CONEGLIAN, C. M. R.; BARROS, R. M.; BRITO, N. N.; DRAGONI SOBRINHO, G.; TONSO, S.; PELEGRINI, R. Impactos da agroindústria canavieira sobre o meio ambiente. **In: Fórum de Estudos Contábeis**, 3, 2003, Rio Claro, Anais. Rio Claro: UNICAMP, 2003.

MERLINI, V. V.; NOGAROL, L. R.; MARIN-MORALES, M. A.; FONTANETTI, C. S. Toxicity of trifluralin herbicide in a representative of the edaphic fauna: Histopathology of the midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 1361-1369, 2012.

MORRIS, G. J.; WINTERS, L.; COULSON, G. E.; CLARKE, K. J. Effect of Osmotic Stress on the Ultrastructure and Viability of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 2023-2034, 1986.

NATAL-DA-LUZ, T.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J.P. Avoidance tests with collembola and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.23, n. 9, p. 2188-2193, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª ed. Editora: Artmed Editora, Porto Alegre, RS, pp.425, 2014.

NOCELLI, R. C. F.; ZAMBON, V.; SILVA, O. G. M.; MORINI, M. S. C. Histórico da cana-de-açúcar no Brasil: contribuições e importância econômica. Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica. In: FONTANETTI, C.S.; BUENO, O.C. (Org.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. 1ed. Bauru, SP: Canal 6, v. 1, p. 13-30, 2017.

NOGAROL, L. R.; FONTANETTI, C.S. Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate containing sewage mud: Tissue responses of the midgut. **Micron**, v. 41, p. 239- 246, 2010.

OLIVEIRA, J.B. Solos do Estado de São Paulo: descrição das classes registradas no mapa pedológico. **Boletim Científico** n. 45. Campinas, Instituto Agrônomo, 1999. 112p.

PEDRO-ESCHER, J.; MAZIVIERO, G.; FONTANETTI, C.S. Mutagenic action of sugarcane vinasse in the *Tradescantia pallida* test system. **Journal of Ecosystem & Ecography**, v. 4, n. 2, p. 1-4, 2014.

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

PEREZ, D. G.; FONTANETTI, C. S. Assessment of the toxic potential of sewage sludge in the midgut of the diplopod *Rhinocricus padbergi*. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 128, p. 437-444, 2011.

PETERSON, H.; LUXTON, M. A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. **Oikos**, Buenos Aires, v. 34, p. 287-388, 1982.

PORTH, C. M.; GROSSMAN, S. C. **Fisiopatologia**. 9^aed, Editora: Guanabara Koogan Ltda, pp. 917, 2016.

RAND, R. P.; PARSEGAN, V. A.; RAU, D. C. Intracellular osmotic action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, p. 1018-1032, 2000.

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

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

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

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

SOCHOVÁ, I.; HOFMAN, J.; HOLOUBEK, I. Using nematodes in soil ecotoxicology. **Environmental International**, v. 32, n. 3, p. 374-383, 2006.

SOUZA-CAMPANA, D. R.; SAAD, L. P.; SILVA, O. G. M.; BUENO, O. C.; MORINI, M. S. C. Comunidades de formigas em cultivos de cana-de-açúcar. In: FONTANETTI, C.S.; BUENO, O.C. (Org.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. 1ed. Bauru, SP: Canal 6, v. 1, p. 149-178, 2017.

SOUZA, R. B., MOREIRA-DE-SOUSA, C.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; SOUZA, C. P.; FONTANETTI, C. S. Impacto de resíduos (vinhaça e biossólido) lançados no cultivo de cana-de-açúcar em representantes da fauna edáfica. In: FONTANETTI, C.S.; BUENO, O.C. (Org.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. 1ed. Bauru, SP: Canal 6, v. 1, p. 197-214, 2017.

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

SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S. Morphological biomarkers in the *Rhinocricus padbergi* midgut exposed to contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 10-18, 2011.

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

STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**. Editora São Paulo: Editora Manole, 2ªed, pp. 655, 2002.

STORCH, V. Cell and environment: a link between morphology and ecology. In: ITURRONDORBEITIA, J. C. (ed). **Biologia Ambiental**. Bilbo: Serv. Ed. Univers. Pais Vasco, v. 1, p. 179–190, 1988.

UNICA – União da Indústria de cana-de-açúcar, <http://www.unica.com.br/> Acessado em 20 de fevereiro de 2018.

VALORES ORIENTADORES PARA SOLO E ÁGUA SUBTERRÂNEA NO ESTADO DE SÃO PAULO, COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, CETESB, Anexo único, Publicado no Diário Oficial Estado de São Paulo - Caderno Executivo I (Poder Executivo, Seção I), edição nº126 (219) do dia 24/11/2016, p. 55-56.

ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R. Cell death during development. **Journal of Immunological Methods**, v. 265, p. 3-20, 2002.

Tabela 1. Classificação das alterações ultraestruturais no intestino médio dos diplópodos expostos à vinhaça bruta e tratada com base em uma avaliação semiquantitativa.

Regiões analisadas	Importância Patológica Mínima (1)	Importância Patológica Moderada (2)	Importância Patológica Acentuada (3)
Epitélio	Redução das microvilosidades nas células absorptivas		Ruptura de membrana ou ausência total das microvilosidades
	Aumento na quantidade de RER	Dilatação e degranulação das cisternas do RER	Degradação do núcleo
	Aumento da liberação de vesículas de secreção	Dilatação de espaços intercelulares	Perda da integridade de membranas citoplasmáticas
Células hepáticas		Formação de arranjo mielínico do RER	Perda de adesão intercelular /desprendimento células epiteliais
			Degradação citoplasmática
			Perda da integridade das membranas citoplasmáticas
		Alteração do conteúdo citoplasmático	Condensação/Degradação citoplasmática
			Degradação do núcleo

Fator de importância: (1) Importância Patológica Mínima, onde o dano morfológico é facilmente reversível na medida em que a exposição ao agente estressor cessa; (2) Importância Patológica Moderada, o dano morfológico é reversível na maioria dos casos quando o agente estressor é neutralizado; (3) Importância Patológica Acentuada, o dano morfológico é irreversível, resultando na perda parcial ou total da função do órgão.

Tabela 2. Dados referentes à fertilidade do solo controle.

Parâmetro	Solo
pH (CaCl ₂)	5
MO(g/dm ³)	20
P (mg/dm ³)	6
K (mmol _c /dm ³)	1,4
Ca (mmol _c /dm ³)	19
Mg (mmol _c /dm ³)	10
H+Al (mmol _c /dm ³)	23
SB (mmol _c /dm ³)	30,4
CTC (mmol _c /dm ³)	53,4
V%	57

MO: matéria orgânica; **CTC:** capacidade de troca catiônica; **SB:** soma das bases; **V:** saturação de bases.

Método: Análise química para a avaliação da fertilidade de solos tropicais, Instituto Agrônômico, 2001.

Tabela 3. Análises físico-químicas e de metais das amostras de solo e de vinhaça.

Parâmetro	Amostras		VPM		Método	
	Solo (mg/Kg)	Vinhaça (mg/L)	Solo	Vinhaça	Solo	Vinhaça
Arsênio	9,25	<0,005	NA	NA	USEPA 7062	USEPA 7062
Bário	24,95	0,201	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Cádmio	<0,167	<0,001	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Cálcio	360	992	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
		(Diluição: 50)				
Carbono orgânico total ²	3,49	7820	NA	NA	POPPA 182	SMEWW 5310B
Chumbo	25,67	<0,005	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Cobre	13,67	0,119	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Alumínio ³ /Alumínio	1	2,18	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Ferro	-	6,33	NA	NA	-	SMEWW 3030E
Manganês	-	3,357	NA	NA	-	SMEWW 3030E
		(Diluição: 10)				
Condutividade eletrolítica	78	10740	NA	NA	IAC 2009	SMEWW 2510B
(µs/cm)						
Cromo	15,93	0,025	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Cloreto	-	1443		250	-	USEPA 300.1
		(Diluição: 100)				
Enxofre total	41,75	-	NA	NA	USEPA 3050B	-
Fósforo total	237	49,3	NA	NA	USEPA 3050B	USEPA 300.1
	(Diluição: 10)	(Diluição: 50)				
Magnésio	158	307	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
		(Diluição: 10)				
Mercurio	<0,011	<0,0002	NA	NA	USEPA 7471	USEPA 7470
Molibdênio	1,750	0,010	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Níquel	4,060	0,024	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Nitrogênio nítrico	<1,262	<11,400 (Diluição: 100)	NA	NA	USEPA 300.1	USEPA 300.1
Nitrogênio nitroso	<0,033	<0,300	NA	NA	USEPA 300.1	USEPA 300.1
		(Diluição: 100)				
Nitrogênio amoniacal	18,5	10,77	NA	NA	SMEWW 4500-NH3 B, C	SMEWW 4500-NH3D
		(Diluição: 10)				
Nitrogênio kjedahl	433,1	278,9	NA	NA	SMEWW 4500-Norg B	SMEWW 4500-NorgB
pH	5	4,23	NA	NA	USEPA 9045	USEPA 9045
Potássio	1,4	3210	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
		(Diluição: 50)				
Selênio	<0,278	<0,005	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Sódio total	<55,556	12,4	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Conteúdo sólido		3860	NA	NA	-	SMEWW 2540D
Umidade	10,12	-	NA	NA	POPDAM 049	-
Zinco	9,61	0,754	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Prata	-	<0,005	NA	0,01	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Dureza calculada	-	1457,0	NA	NA	-	SMEWW 2340B
DBO	-	16586	NA	NA	-	SMEWW 5210B
(incubação de 5 dias)						
DQO	-	31257	NA	NA	-	SMEWW 5220D
(Diluição: 50)						

VMP: valor máximo permitido, segundo a CETESB (195/2005-E); **SMEWW:** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22th Edition, 2012; **USEPA:** United States Environmental Protection Agency; **POP:** Procedimento Operacional Padrão para determinação por cálculo; ICA: Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agrônomo de Campinas, 2009; **NA:** não aplicável.

Tabela 4. Média e desvio padrão das alterações ultraestruturais observadas no intestino médio dos diplópodos expostos à vinhaça bruta e tratada.

Regiões analisadas	Alterações	Tratamentos				
		Controle	Vinhaça bruta concentração de campo	Vinhaça bruta dobro da concentração de campo	Vinhaça tratada concentração de campo	Vinhaça tratada dobro da concentração de campo
Epitélio	Redução das microvilosidades	0±0	1,66±0,5*	12,66±2,5*	0±0	0±0
	Ausência total das microvilosidades	1,66±1,58	3±0	12,66±2,5*	0,66±1,32	1±1,5
	Aumento de RER	0,55±0,52	5,4±0,52*	4,55±0,72*	0,44±0,52	0,33±0,5
	Dilatação/ degranulação das cisternas do RER	0±0	9,77±2,1*	9,77±1,56*	0±0	0±0
	Formação de arranjo mielínico do RER	0±0	9,77±2,1*	0±0	0±0	0±0
	Dilatação dos espaços intercelulares	1,11±1,23	9,55±1,66*	12±0*	1,77±1,2	1,33±1,41
	Liberação de vesículas de secreção	1,33±0,5	4±0,7*	5,33±0,7*	1,33±0,5	1,33±0,5
	Degradação do núcleo	1±1,5	3±0*	12,66±1,32*	1±1,5	1,33±1,58
	Perda da integridade das membranas citoplasmáticas	1±1,5	15,66±2,5*	16,66±1,58*	1,33±1,58	0±0
	Desprendimento de células epiteliais	1,66±1,58	12,33±1,8*	16,66±1,58*	1,33±1,58	1±1,5
Células hepáticas	Condensação/Degradação citoplasmática	0±0	15,66±2,5*	17,66±1*	0±0	0±0
	Alteração do conteúdo citoplasmático	0±0	8,66±1,73*	10,88±1,05*	1,77±2,1	1,77±2,1
	Perda da integridade das membranas citoplasmáticas	1±1,5	15,66±2,5*	16,66±1,58*	1,33±1,58	0±0
	Degradação do núcleo	1±1,5	3±0*	12,66±1,32*	1±1,5	1,33±1,58

* estatisticamente significativo - ANOVA/Dunnett (p<0, 05).

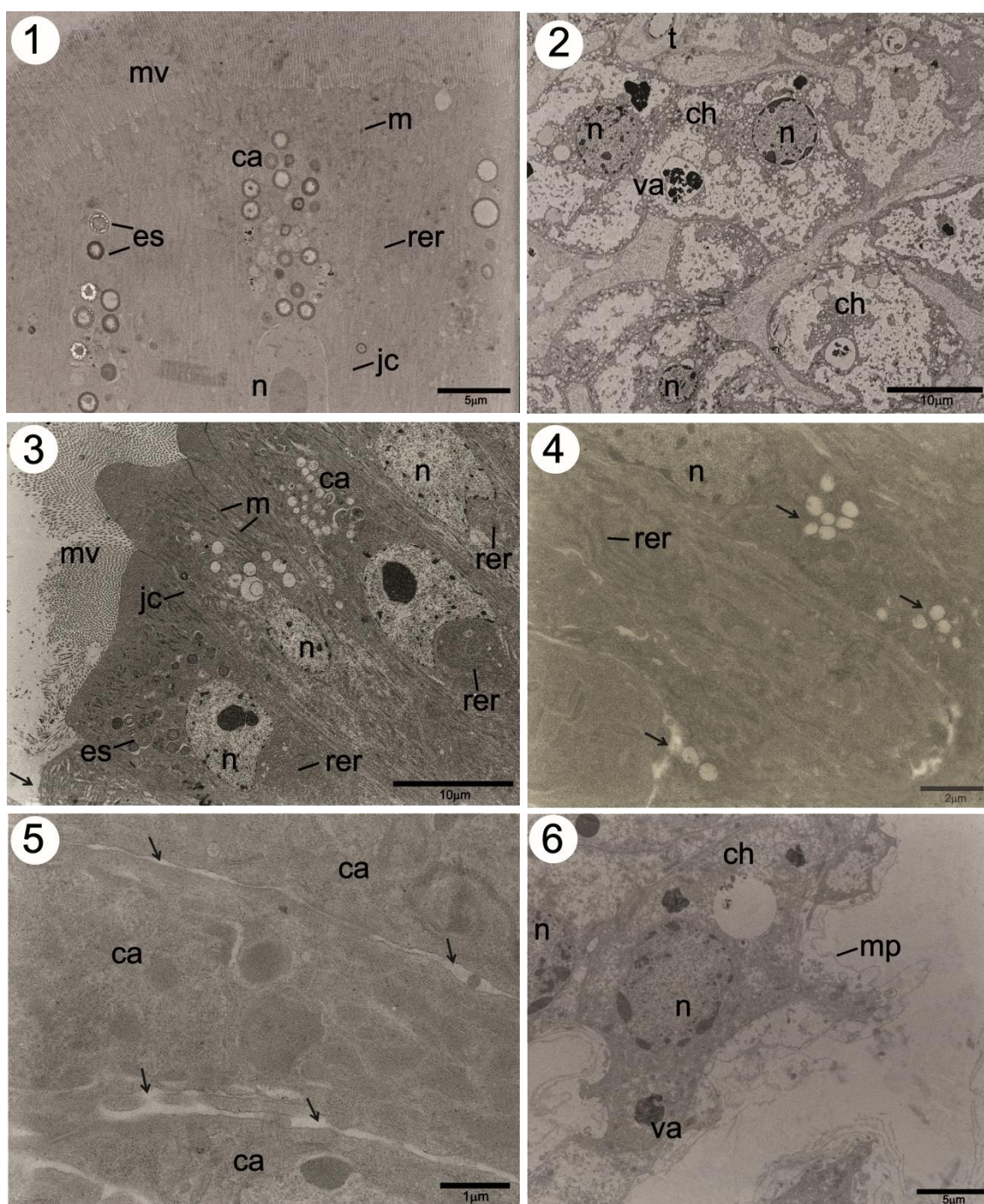


Figura A: Micrografias eletrônicas do intestino médio do diplópodos *Rhinocricus padbergi*. 1 – 2: grupo controle; 3 – 6: grupo exposto à vinhaça bruta na concentração de campo.

ca: célula absorptiva; ch: célula hepática; es: esferocristal; jc: junção celular; m: mitocôndria; mp: membrana plasmática; mv: microvilosidades; n: núcleo; rer: retículo endoplasmático rugoso; t: traquéola; va: vacúolo autofágico; seta em 3: redução das microvilosidades; setas em 4: distensão e degranulação das cisternas do retículo endoplasmático rugoso; setas em 5: espaços intercelulares.

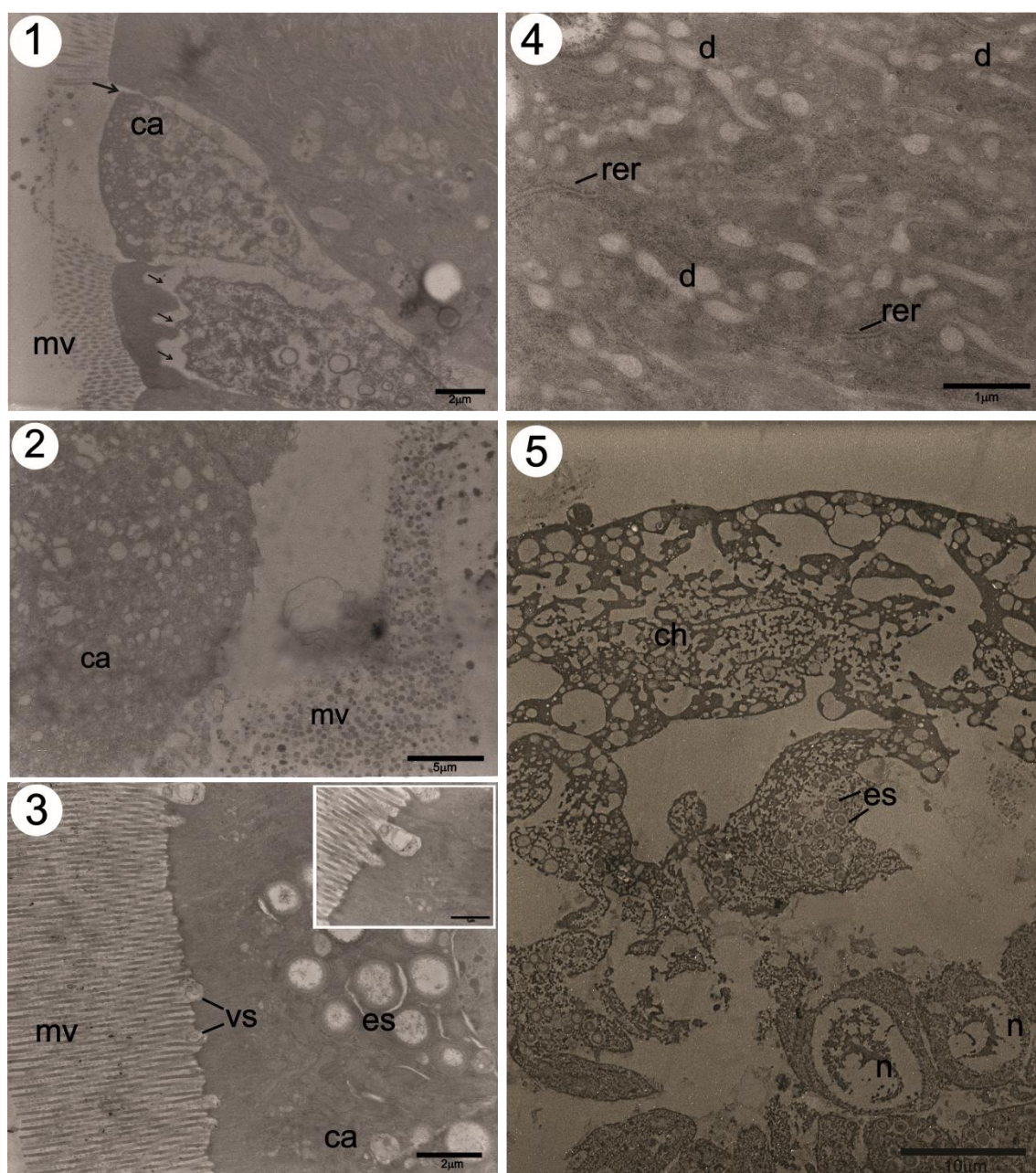


Figura B: Micrografias eletrônicas do intestino médio do diplópodos *Rhinocricus padbergi*. 1 - 5: exposto à vinhaça com o dobro da concentração de campo.

ca: célula absorptiva; ch: célula hepática; d: dilatação e degranulação das cisternas do retículo endoplasmático rugoso; es: esferocrystal; mv: microvilosidade; n: núcleo; vs: vesícula secretora; seta em 1: perda de adesão celular.

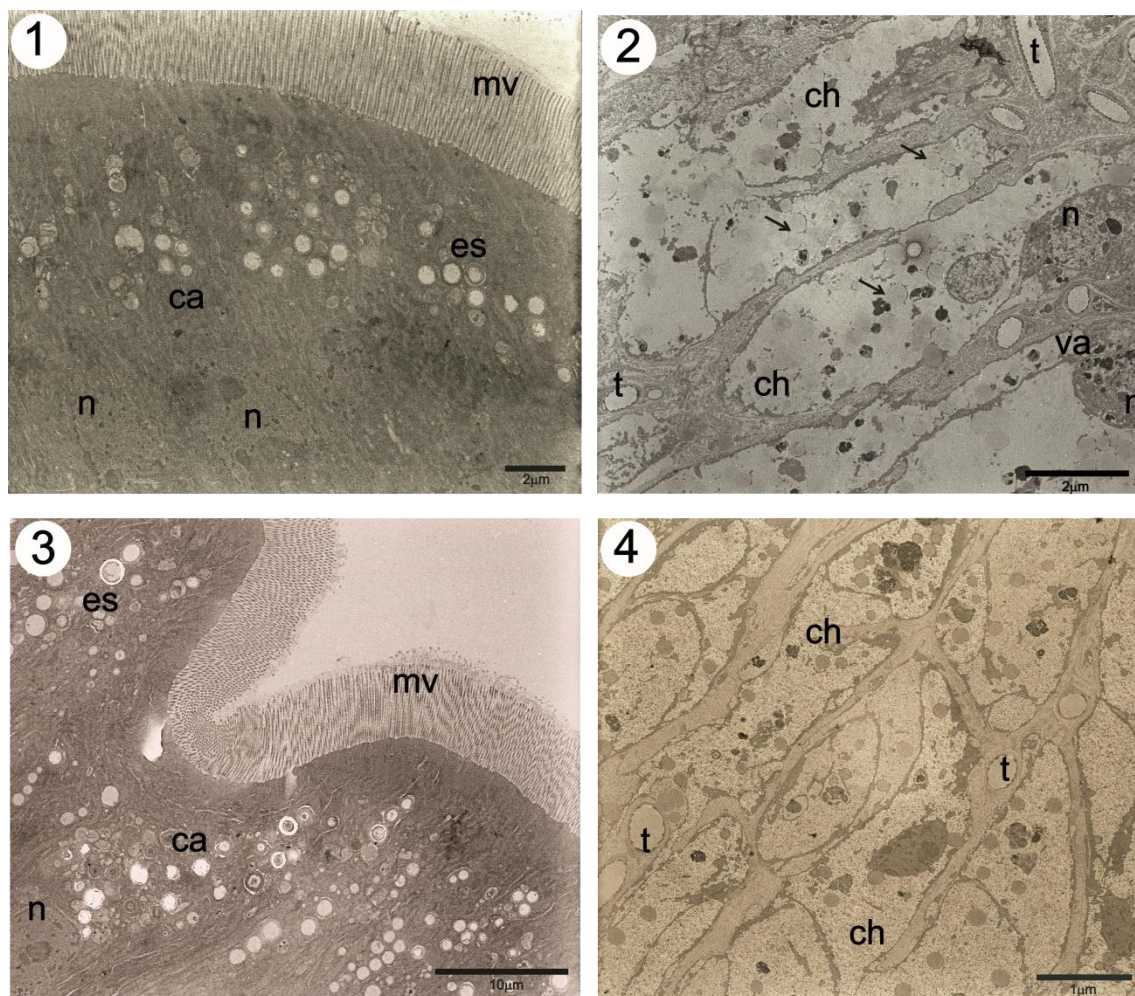


Figura C: Micrografias eletrônicas do intestino médio do diplópodos *Rhinocricus padbergi*. **1 – 2:** grupo exposto á vinhaça tratada na concentração de campo; **3 – 4:** grupo exposto à vinhaça tratada com o dobro da concentração de campo.
ca: célula absorptiva; ch: célula hepática; es: esferocristal; mv: microvilosidade; n: núcleo; t: traqueíola; va: vacúolo autofágico; setas em **2**: gotículas de lipídeo.

ARTIGO 2

Neutralização de pH da vinhaça de cana-de-açúcar gera diminuição de processos de estresse e morte celular em representante da fauna edáfica

Cristina Moreira de Sousa^{1,2}; Hellen Soares Lima³; Tatiane Grella⁴; Pâmela Décio⁴; Thays Guedes de Andrade^{1,2}; Raphael Bastão de Souza⁵; Cleiton Pereira de Souza^{1,2}; Priscila Cintra Socolowski⁶; Carmem Silvia Fontanetti¹

¹ UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

² CAPES, Fundação, Ministério da Educação do Brasil, Brasília DF 70040-020, Brasil.

³ UFSCAR (Universidade Federal de São Carlos), Centro de Ciências e Tecnologias para Sustentabilidades, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

⁴ Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Rio Claro, São Paulo, Brasil.

⁵ UNICAMP (Universidade de Campinas), Escola de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Campinas, Brasil.

⁶ Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. Distrito de Rubião Júnior, s/n . Botucatu-São Paulo, Brasil.

Autora correspondente: Cristina Moreira de Sousa, moreiradesousa@gmail.com

UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), Departamento de Biologia, Instituto de Biociências. Av. 24-A, 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

Resumo

A prática da fertirrigação utilizando-se da vinhaça de cana-de-açúcar é descrita como a forma mais empregada de reaproveitamento deste resíduo. Representa uma medida satisfatória tanto do ponto vista econômico, quanto agrônômico, visto que a grande quantidade de matéria orgânica presente no resíduo exclui a necessidade de adubação das lavouras, além de apresentar aumento na produtividade. Entretanto, efeitos negativos em organismos bioindicadores foram relatados diante do uso da vinhaça como fertilizante, gerando alerta quanto ao emprego do resíduo. A utilização de diplópodos como organismos-teste na avaliação de toxicidade de solo, bem como a utilização de marcadores moleculares, tem sido empregada com sucesso, pois a junção destas duas ferramentas fornece respostas importantes sobre o efeito de agentes estressores no meio ambiente. Nesse sentido, este trabalho traz como proposta a correção do pH da vinhaça, para seu nível neutro na tentativa de diminuir sua toxicidade para posterior uso no solo, visto que uma das características negativas da vinhaça é seu pH ácido. Diplópodos da espécie *Rhinocricus padbergi* foram utilizados como bioindicadores para realização dos testes, os quais foram elaborados da seguinte forma: 1. Grupo controle (animais expostos somente ao solo); 2. Grupo de animais expostos ao resíduo em sua forma bruta (na concentração estabelecida pela Norma da CETESB); 3. Grupo exposto ao dobro desta mesma concentração, simulando uma situação de super dosagem; 4. Grupo exposto ao resíduo tratado com cal - pH ajustado para o valor 7,0 (na concentração estabelecida pela Norma da CETESB); 5. Grupo exposto ao dobro desta última concentração. Após a exposição de 30 dias os animais foram dissecados para retirada do intestino médio, o qual foi processado para posteriores análises. Os efeitos dos resíduos foram avaliados por meio da imunomarcação da proteína de estresse HSP70 e por meio da investigação de células em morte programada, utilizando-se do método de TUNEL, ambos de forma quantitativa e qualitativa. Os efeitos da vinhaça bruta na concentração de campo e no dobro desta concentração foram analisados comparativamente aos efeitos da vinhaça tratada na concentração de campo e no dobro desta concentração. Os resultados apontaram que os animais em contato com a vinhaça tratada, tanto na concentração de campo, quanto ao dobro da concentração, apresentaram menores marcações da proteína HSP70 em comparação aos animais expostos à vinhaça bruta. Os resultados do método de TUNEL também revelaram menores índices de marcação na vinhaça tratada, nas duas concentrações,

comparativamente ao que se observou na vinhaça bruta. Essas observações atestam que o tratamento da vinhaça com a finalidade de neutralizar o pH demonstrou ser menos prejudicial aos animais.

Palavras-chave: HSP70, TUNEL, bioindicador de solo, diplópodo, toxicidade, vinhaça.

Introdução

O Brasil ocupa posição de destaque no cultivo da cana-de-açúcar e é considerado um dos maiores produtores de etanol do mundo, logo essa categoria também apresenta como resultado altas quantidades de resíduos gerados. A vinhaça é o principal líquido residual proveniente da calda de destilação do licor de fermentação do álcool, de coloração acastanhada, ácido; cerca de 93% da vinhaça é de água e 75% da matéria seca é composta, principalmente, por glicerol, etanol, ácido láctico, ácido acético e compostos fenólicos, altos teores de fósforo e de potássio, caracterizando-a por alto poder fertilizante, mas também alto valor poluente (RAHMAN et al., 2018; FREITAS et al., 2018).

A indústria sucroalcooleira geralmente produz em média 156L de vinhaça para 12L de etanol; com base nessa relação de produção é esperado que o volume deste efluente devará aumentar com a produção de etanol; a perspectiva é de que em 2024 serão produzidos 1742 bilhão de litros de vinhaça (HOARAU et al., 2018).

No passado, o manejo inadequado desse resíduo provocou graves problemas de poluição e diante disso medidas foram tomadas para que houvesse uma maior conscientização do destino da vinhaça. Foi instituída, em 1978 no Brasil, uma Portaria do Ministério do Estado do Interior (n. 323, de 1978), que proibiu o lançamento direto de vinhaça em qualquer corpo hídrico pelas destilarias de álcool instaladas no país (DEMATTE et al., 2004). Dentre as possibilidades de reaproveitamento da vinhaça a fertirrigação passou a ser a mais empregada, graças ao seu elevado conteúdo de matéria orgânica (CHRISTOFOLETTI et al., 2017).

Os riscos de fertirrigação com a vinhaça estão associados principalmente acúmulo de nutrientes no solo, incluindo salinização e super fertilização, levando à lixiviação de sal para as águas subterrâneas, aumentando a instabilidade e/ou eutrofização dos corpos d'água. As altas quantidades de metais e conteúdos orgânicos representa um grande desafio para os ambientes naturais e, conseqüentemente, os

processos de despoluição da vinhaça devem ser aplicados antes da descarga no meio ambiente (HOARAU et al., 2018).

Sabendo que a vinhaça apresenta não só alto conteúdo de matéria orgânica, mas também, apresenta vários metais em sua constituição (Cu, Cr, Ni e Zn), uma norma de aplicação foi criada para o emprego deste resíduo. A Norma Técnica P4.231 (CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2015) estabelece os critérios e procedimentos para aplicação adequada da vinhaça no solo, proibindo a fertirrigação em áreas de risco, estabelecendo dosagens permitidas de acordo com o tipo de solo e variedade de cana-de-açúcar e alertando para que os tanques de armazenamentos e drenos sejam impermeáveis de modo a impedir contaminações de solo e de água (MORINI et al., 2017). No entanto, esta norma prevê apenas os riscos de alterações nas características químicas do solo, os efeitos ecológicos da sua aplicação não são considerados, principalmente os relacionados à fauna do solo (SOUZA et al., 2017).

Estudos realizados no sentido de avaliar o potencial tóxico da vinhaça comprovaram seus efeitos nocivos em diferentes organismos bioindicadores, alertando que a utilização da vinhaça como fertilizante ainda requer cautela (SILVA et al., 2007; LYRA, 2008; CHRISTOFOLETTI et al., 2013; 2016; PEDRO-ESCHER et al. 2014; 2016; MARINHO et al., 2014; CORREIA et al., 2017a; b; GARCIA et al., 2017; COELHO et al., 2017; SOUZA et al., 2017).

Nesse sentido, o emprego de diplópodos para análises ecotoxicológicas de solo tem sido uma ferramenta de grande auxílio, pois estes animais, além de possuir um íntimo contato com o solo, se movem por várias camadas de solo, o que reverte em informações essenciais no que diz respeito ao ambiente onde se encontram (SOUZA et al., 2017). E acrescido à utilização dos diplópodos, fazer uso das ferramentas moleculares representa uma forma mais abrangente de avaliar a complexidade com a qual agentes estressores podem afetar os bioindicadores.

As proteínas de choque térmico (HSPs), conservadas desde os organismos mais primitivos até os mais complexos, exercem função citoprotetora e permite que as células respondam a diversas perturbações homeostáticas induzidas por estresse. Em virtude disso, essas proteínas são consideradas uma ferramenta eficiente em estudos de toxicidade, e, especificamente as HSP70, as quais, além de executar diferentes tarefas nos compartimentos celulares, encontram-se em todos os organismos vivos, são abundantes, altamente sensíveis e apresentam rápida expressão diante de um agente

estressor (MISHRA; PALAI, 2014; COELHO et al., 2017; MOREIRA-DE-SOUSA et al., 2018).

A apoptose, ou morte celular programada, é um processo fisiológico pelo qual as células são removidas dos tecidos de maneira controlada. Células condenadas a apoptose apresentam alterações morfológicas características, as quais incluem condensação do citoplasma e núcleo da célula, fragmentação do DNA, dissociação das organelas celulares e ruptura da membrana plasmática da célula. Células apoptóticas são fagocitadas por células vizinhas e macrófagos e entre as alterações bioquímicas da apoptose estão a translocação da fosfatidilserina para o lado externo da membrana plasmática da célula, a exposição da anexina I e da calreticulina na superfície celular e o aumento do citocromo c no citoplasma da célula. As caspases são proteínas pro-apoptóticas presentes como zimogênios e ativadas por hidrólise. Uma vez ativadas, elas funcionam como proteases de cisteína e ativam outras caspases, as quais podem ser distinguidas em dois grupos, as caspases iniciadoras, que iniciam o processo, e as caspases efetoras, que especificamente lisam moléculas que são essenciais para a sobrevivência celular. A apoptose pode ser desencadeada por estímulos provenientes do meio extracelular (via extrínseca) ou dentro da célula (vias intrínsecas) (BLANCO; BLANCO, 2017).

Nesse sentido, a apoptose desempenha um papel crítico durante o desenvolvimento normal e a homeostase dos tecidos, conseqüentemente, a desregulação da apoptose está associada não só a doenças, mas também pelo contato com substâncias tóxicas que induzem a morte celular via apoptose e, o índice apoptótico pode servir de indicador de estresse ambiental (GARCIA-CASCA et al., 2010; MALLADI et al., 2010).

O objetivo deste trabalho foi verificar se o tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar com a finalidade de neutralizar seu pH (7,0) diminui sua toxicidade, expondo animais bioindicadores à concentrações do resíduo a partir da Norma Técnica P4.231 estabelecida pela CETESB, comparando os resultados obtidos com os de animais expostos à vinhaça bruta por meio da análise da marcação da proteína de estresse HSP70 e da marcação dos núcleos no processo de morte celular pelo método de TUNEL correlacionado os resultados de ambas as técnicas. A proposta da pesquisa é oferecer evidências que o tratamento por ajuste de pH torne o resíduo viável não só economicamente, mas também ambientalmente.

2. Material e métodos

2.1 Solo

O solo utilizado para os bioensaios, classificado como latossolo (OLIVEIRA, 1999), foi coletado no local onde diplópodos foram obtidos (campus da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Rio Claro) (22° 24' 36'S/ 47° 33' 36' W), São Paulo, Brasil. As amostras de solo, utilizadas tanto para o controle quanto para a mistura com o resíduo, foram coletadas a uma profundidade de 20 cm; o solo foi previamente seco à temperatura ambiente, peneirado com uma de tela de 4 mm e analisado quimicamente.

2.2 Vinhaça de cana-de-açúcar

O resíduo foi coletado em usina localizada no interior do estado de São Paulo, Brasil. O efluente foi submetido a análises físico-químicas e mantido em câmara fria a 4°C até a montagem dos experimentos.

A aplicação da vinhaça bruta (com características físico-químicas mantidas desde a coleta na usina), bem como da vinhaça tratada para ajuste de pH (com adição de CaO até que o pH atingisse o valor 7,0) simulou a situação de fertirrigação empregada nas culturas aplicadas a partir de concentrações segundo legislação vigente (CETESB P4.231, 2015).

2.3 Caracterização química das amostras

As análises, química e físico-química, das amostras de solo e das amostras de vinhaça foram realizadas pelo laboratório ASL Análise Ambiental (Rio Claro, São Paulo, Brasil).

A caracterização de amostras de solo foi baseada em macronutrientes e micronutrientes (P, K, Ca, Mg, Al), matéria orgânica, pH, capacidade de troca catiônica (CTC), porcentagem de saturação de base e saturação de alumínio.

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

2.4 Cálculo para aplicação da vinhaça no solo (Norma Técnica – CETESB – P4.231)

Para calcular a dosagem adequada de vinhaça a ser aplicada no solo foram necessárias as análises físico-químicas da mesma e do potencial agrônômico do solo, juntamente com os critérios e procedimentos para aplicação da vinhaça no solo agrícola estabelecidos pela Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2015), agência governamental responsável pela fiscalização de atividades poluidoras no estado de São Paulo, Brasil. Neste estudo foi discriminado o termo “concentração de campo” para dosagem de vinhaça estipulada pela norma.

2.4 Material biológico

Foram utilizados como organismo-teste, indivíduos adultos da espécie *Rhinocricus padbergi*. Os espécimes foram coletados no campus da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, (22° 24' 36'S/ 47° 33' 36' W) São Paulo, Brasil. Os animais foram previamente aclimatados em laboratório por 30 dias em terrário contendo como substrato terra oriunda do local de coleta, temperatura de $\pm 23^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo controlado 12 horas claro/12 horas escuro.

2.6 Bioensaios com *R. padbergi*

Para a montagem dos experimentos foram utilizados 15 terrários de dimensões 20 cm de largura, 25 cm de altura e 45 cm de comprimento, nos quais foram colocados 5 Kg de solo em cada juntamente com 10 animais. Os bioensaios foram montados em triplicata de acordo com os tratamentos propostos e em conformidade com a Norma P4.231 (CETESB, 2015), estruturados da seguinte forma:

- 1. Solo Controle:** 5 Kg de solo + 10 diplópodos.
- 2. Vinhaça bruta na concentração de campo:** 5 Kg de solo + 73,5 mL de vinhaça bruta + 10 diplópodos.
- 3. Vinhaça bruta no dobro da concentração de campo:** 5 Kg de solo + 147 mL de vinhaça bruta + 10 diplópodos.
- 4. Vinhaça tratada (pH neutro) na concentração de campo:** 5 Kg de solo + 73,5 mL de vinhaça tratada + 10 diplópodos.

5. Vinhaça tratada (pH neutro) no dobro da concentração de campo: 5 Kg de solo + 147 mL de vinhaça tratada + 10 diplópodos.

2.7 Dissecção dos animais

Após 30 dias de exposição aos resíduos foram coletados três indivíduos de cada tratamento; os animais foram anestesiados com éter sulfúrico e dissecados em placas de petri contendo solução fisiológica; o intestino médio foi retirado e as amostras do material foram previamente limpas; pequenos fragmentos do intestino médio foram fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas e após a fixação as amostras foram transferidas para o tampão fosfato de sódio (pH 7,4) e armazenadas a 4°C para posterior processamento.

2.8 Imunomarcção da proteína HSP70 (Imuno-histoquímica)

As amostras do material foram desidratadas em série crescente de álcool gelado preparado com tampão fosfato de sódio (PBS) pH 7,4 (15, 30, 50, 70, 85, 90, e 95%) durante 20 minutos cada banho. Em seguida, o material foi colocado em xilol + álcool por 20 minutos e em seguida xilol também por 20 minutos. Após este procedimento, foi feita a embebição do material em parafina líquida (Paraplast), sendo três trocas de 8 horas cada e inclusão em parafina ultra-pura (Paraplast). Posteriormente, o material foi seccionado em secções de 6µm com auxílio do micrótomo; as secções foram então hidratadas e recolhidas em lâminas apropriadas para imuno-histoquímica (Immunoslide, Ref. EP-51-30185).

Para a realização da imuno-histoquímica, foi seguido um protocolo proposto em Coelho et al. (2017). Para marcação da HSP70 foi utilizado o anticorpo primário (monoclonal anti heat shock protein 70 - HSP70 produzido em mouse, Sigma) e, em seguida, o anticorpo secundário (anti mouse IgG molécula inteira) conjugado com fosfatase alcalina. Para a revelação da imunomarcção foi utilizado o Kit Dako EnVision™ G2 System/AP Rabbit/Mouse (Permanent Red).

O material foi fotografado e analisado no programa Image J e partir destas análises testes estatísticos foram realizados pelo programa Sigma Plot 13.

2.9 Análises dos resultados – HSP70

Utilizando-se do microscópio de luz, todas as lâminas foram qualitativamente analisadas nas objetivas de 10x, 20x e 40x. A imunomarcação positiva foi definida quando da observação da cor vermelho-rosada e de acordo com sua intensidade, podendo ser maior ou menor conforme a quantidade de proteínas da família HSP70 presente nas células; a marcação negativa foi definida quando não se observou coloração no tecido/célula. Somada a esta análise, as lâminas também foram analisadas quantitativamente. As imagens obtidas de todos os cortes foram digitalizadas a partir de uma câmera acoplada ao microscópio, fazendo-se uso de um programa para captura de imagens – Leica Qwin Standard v. 2.8. As imagens foram transferidas ao programa Image J e a partir dele, calculou-se a porcentagem de área imunomarcada em relação à área total do material analisado em cada secção histológica. Os dados obtidos na avaliação quantitativa de cada tratamento foram comparados aos resultados obtidos para os indivíduos expostos à amostra de solo controle, por meio do teste estatístico Kruskal-Wallis. Antes da execução do teste estatístico de múltipla comparação, a normalidade e a homogeneidade de variância dos dados foram testadas por meio dos testes Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe, respectivamente. O teste estatístico e a representação gráfica foram realizados no programa Sigma Plot 13.

2.10 Método de TUNEL

Para melhor estabelecimento da arquitetura tecidual no microscópio confocal de varredura a laser foi necessária a utilização de uma técnica auxiliar para marcação da actina-F e núcleo, a qual forneceu o delineamento do intestino médio, facilitando a posterior análise pelo método de TUNEL.

Para a marcação da actina-F e do núcleo as amostras do material foram fixadas em paraformaldeído 4% por 4 horas e colocadas em tampão fosfato de sódio (PBS) pH 7,4; os materiais foram incluído em agarose e seccionados num vibrátomo. Os cortes foram permeabilizados com 0,2% de Triton X-100 (Sigma) e lavados em PBS e em seguida foram incubados por 30 minutos com faloidina conjugada com Alexa 488 (Molecular Probes), soro normal de cabra (Vector) e PBS. Os núcleos foram marcados com DAPI (4',6'-diamino-2-fenilindol, Molecular Probes); as lâminas foram montadas utilizando o Prolong® Diamond Antifade (Molecular Probes).

As lâminas foram analisadas e fotografadas por meio do microscópio confocal de varredura a laser (Leica TCS-SP5 II) e seguindo os mesmos parâmetros: (laser

Argônio=10%, λ =488 nm, Gain=957.0 V, Offset=-1.9%, Pinhole=53.64 μ m), DAPI (laser diodo=10%, λ =405 nm, Gain=730.0 V, Offset=-1.0%, Pinhole=67.90 μ m). Como estas marcações da actina-F e do núcleo foram realizadas para simples conferência da estruturação do intestino médio, e também para facilitar a localização das marcações encontradas no teste de TUNEL, as imagens não foram analisadas estatisticamente.

Para a realização do método de TUNEL as amostras do material foram fixadas e, paraformoldeído 4% por 24 horas e transferidas para tampão fosfato de sódio (PBS) pH 7,4; as amostras foram incluídas em agarose e seccionadas em vibrátomo.

Para aplicação da técnica de TUNEL foi seguido o protocolo do kit AP “In Situ Cell Death Detection” (Roche). Os cortes adquiridos em lâminas foram recobertos com solução de proteinase K (20 μ g/mL em 100mL Tris-HCl, pH 7,5), por 15 minutos, a temperatura ambiente e câmara úmida (caixa específica que protege as lâminas da luz e contém algodão com água destilada, o que impede os cortes de secarem). Em seguida, lavados em quatro banhos de PBS para retirar o excesso do reagente anterior, de 2 minutos cada. Posteriormente foram colocados 50 μ L da solução de TUNEL, de acordo com o protocolo do kit, sobre as secções histológicas tratadas, enquanto que a secção controle recebeu 50 μ L da solução 1, que contem no kit, sem a enzima. As secções foram mantidas em câmara úmida por 60 minutos a 37°C e posteriormente lavadas três vezes em PBS, 2 minutos cada troca; em seguida as lâminas foram então montadas com Prolong® Diamond Antifade (Molecular Probes).

Para a realização desta técnica foram feitos controles positivos e negativos. Nos controles positivos foi adicionada a DNase, que tem a função de induzir a quebra do DNA, para que ocorra marcação, mesmo que não haja morte celular neste tecido. Neste controle, a DNase é a adicionada e o protocolo normal do TUNEL é seguido com as aplicações dos anticorpos. Já no controle negativo é adicionado apenas o anticorpo sem a enzima, pois dessa forma testa-se a viabilidade e funcionalidade do kit.

2.11 Análises dos resultados – TUNEL

As lâminas foram visualizadas e analisadas no laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP de Rio Claro-SP por meio de um microscópio confocal de varredura a laser (Leica TCS-SP5 II) e para a aquisição das imagens foi utilizado o software Leica Application Suite-AF. Todas as lâminas foram fotografadas com os mesmos parâmetros, sendo eles: Smart Gain: 1141.0 V; Smart Offset: 0,2%; Pinholi:

67.97; Line: 8; Frame: 2; Resolução: 1024x1024; Velocidade: 40Hz; Lazer 14% Standby; Número de steps: 5 e Z-volume = 25 μm . A quantificação da marcação de TUNEL nas imagens adquiridas foi feita com auxílio do software Leica Application Suite-AF, nas quais a intensidade de fluorescência emitida foi mensurada em escala de cinza. Os valores da marcação de TUNEL obtidos para cada grupo experimental foram comparados estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis, programa Sigma Plot 13. A partir das imagens obtidas foi realizado teste estatístico e a representação gráfica, os quais foram realizados no programa. Antes da execução do teste estatístico de múltipla comparação, a normalidade e a homogeneidade de variância dos dados foram testadas por meio dos testes Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe, respectivamente.

3. Resultados

3.1 Análises químicas das amostras

Os resultados da sobre o potencial agronômico e fertilidade do solo, os quais são fundamentais para os cálculos de aplicação do resíduo no solo de acordo com a legislação brasileira encontram-se na tabela 1.

Na tabela 2 são apresentadas as análises físico-químicas e de metais das amostras de solo e de vinhaça. Os valores de DBO e DQO são considerados altos, demonstrando grande quantidade de matéria orgânica; o pH apresenta valor baixo, confirmando a acidez do resíduo e as quantidades de metais não se apresentaram significativas de acordo com a legislação que prevê as quantidades desses elementos no solo (VALORES ORIENTADORES PARA SOLO E ÁGUA SUBTERRÂNEA NO ESTADO DE SÃO PAULO, 2016).

3.2 Imuno-histoquímica – proteína HSP70

A análise do intestino médio dos animais do grupo controle apresentou uma marcação evidente, porém considerada imunomarcação fraca na região basal do epitélio, moderada na região apical do epitélio, bem como na camada de células hepáticas e negativa para HSP70 na camada muscular (Fig. 1A).

Nos animais expostos à vinhaça bruta na concentração de campo, a imunomarcação observada revelou-se fortemente marcada na região apical do epitélio e na camada de células hepáticas, houve fraca marcação na base do epitélio e marcação negativa na camada muscular (Fig. 1B).

No grupo exposto à vinhaça bruta no dobro da concentração de campo a imunomarcção observada foi bastante similar ao observado no tratamento na concentração de campo, porém é possível visualizar que as células apresentaram uma marcação mais intensa. A forte marcação observada na região apical do epitélio, por vezes, se estendeu até a região basal (seta na Fig. 1C) e a camada de células hepáticas mostrou-se fortemente marcada e a camada muscular permaneceu negativa (Fig. 1C).

A exposição à vinhaça tratada na concentração de campo revelou uma fraca imunomarcção na região apical do epitélio quando comparado aos tratamentos com a vinhaça bruta em ambas as concentrações, aproximando-se do observado para o grupo controle, na região basal do epitélio a marcação foi negativa, assim como na camada muscular, e, na camada de células hepáticas houve células com marcações fracas e células moderadamente marcadas (setas na Fig. 1D).

No grupo exposto à vinhaça tratada no dobro da concentração de campo observou-se uma imunomarcção fraca na região apical e basal do epitélio, marcação negativa na camada muscular e forte na camada de células hepáticas em comparação ao grupo controle, mas moderada em relação aos tratamentos com vinhaça bruta em ambas as concentrações (Fig. 1E).

3.3 Análise estatística da imunomarcção da proteína HSP70

Embora tenham sido observadas imunomarcações consideráveis de HSP70 no intestino médio dos diplópodos de todos os tratamentos com a vinhaça, a comparação estatística da área imunomarcada em relação a área total da imagem adquirida entre os grupos experimentais não mostrou significância ($p = 0,147$). A figura 2 apresenta graficamente estes resultados.

3.4 Método de TUNEL

Uma vez estabelecida a arquitetura tecidual do intestino médio com a técnica de marcação de actina-F e núcleo observou-se que os núcleos foram marcados de azul nas células epiteliais e nas células hepáticas; o bordo em escova foi marcado de verde, situando a orientação do epitélio; os limites celulares também foram marcados de verde; a camada muscular foi fracamente marcada em verde demonstrando o limite entre o epitélio e a camada de células hepáticas (Fig. 3A)

A marcação pelo método de TUNEL apresentou-se positiva para o intestino médio do diplópodo avaliado em todos os tratamentos aos quais foram submetidos, pois o método foi considerado válido, uma vez que os controles positivos e negativos reagiram conforme o esperado; no controle positivo da técnica ocorreram marcações em todos os núcleos das células epiteliais e das células hepáticas (Fig. 3B), ao contrário do controle negativo que não apresentou marcação, atestando o funcionamento correto do método (Fig. 3C).

No intestino médio dos animais expostos ao grupo controle o índice maior de marcações foi observado na região epitelial, sendo os núcleos da porção apical e média do epitélio os que mais apresentaram marcações; marcações mais espaçadas foram observadas nos núcleos da camada de células hepáticas, demonstrando processos naturais de morte celular no tecido (Fig. 3D).

No grupo exposto à vinhaça bruta na concentração de campo, poucas marcações foram observadas. Os núcleos epiteliais apresentaram marcações mínimas, a maioria das marcações dos núcleos localizou-se preferencialmente na camada de células hepáticas (Fig. 4A).

No grupo exposto à vinhaça bruta no dobro da concentração de campo observou-se que houve um aumento das marcações em comparação ao tratamento na concentração de campo e grupo controle, sendo a maioria concentrada nos núcleos da camada de células hepáticas; na região epitelial novamente houve mínimas marcações (Fig. 4B).

O grupo exposto à vinhaça tratada na concentração de campo apresentou poucas marcações. Na região epitelial poucos núcleos foram marcados na porção apical e média; na camada de células hepáticas também houve marcação de poucos núcleos em comparação aos tratamentos com a vinhaça bruta em ambas as concentrações (Fig. 4C).

No grupo exposto à vinhaça tratada no dobro da concentração de campo observou-se que a região epitelial não apresentou marcações e a camada de células hepáticas apresentou núcleos marcados em maior incidência quando comparado ao tratamento com a vinhaça tratada na concentração de campo, mas não superior aos tratamentos com a vinhaça bruta em ambas as concentrações (Fig. 4D).

3.5 Análise estatística da marcação dos núcleos pelo método de TUNEL

Não houve diferença estatística entre as intensidades de fluorescência mensuradas para os diferentes grupos experimentais ($p= 0,337$), sendo que as médias ficaram próximas. A figura 5 representa graficamente estes resultados.

4. Discussão

A fertirrigação da vinhaça da cana-de-açúcar tem sido apresentada como uma prática de grande auxílio para as usinas, pois vários problemas são resolvidos em uma única ação, ou seja, define um destino para o resíduo, ao passo que serve como fertilizante, diminuindo gastos com adubação. Entretanto, essa solução requer cuidados específicos no que diz respeito à contaminação ambiental, pois pode causar severa deterioração dos solos, de águas superficiais e lençóis freáticos. Diante da alta capacidade poluidora da vinhaça vários países foram levados a adotar regulamentações sobre a descarga deste efluente, visando reduzir o impacto ambiental e minimizando o contato direto de vinhaça bruta com o meio ambiente (ARAÚJO; OLIVEIRA, 2016; MORINI et al., 2017; HOARAU, et al., 2018; RAHMAN et al., 2018).

Com efeito, não é somente o solo e os recursos hídricos que podem ser prejudicados pela vinhaça, mas também os seres vivos que os habitam. Experimentos utilizando-se de organismos bioindicadores expostos à vinhaça também revelaram os diversos impactos negativos que o resíduo pode provocar. Souza et al. (2017) apresentaram os efeitos da vinhaça em invertebrados sob diferentes formas de análise e as avaliações histopatológicas, imunohistoquímicas e alterações comportamentais demonstraram o potencial tóxico da vinhaça sobre estes animais.

Sabe-se que as proteínas de choque térmico HSP70 são chaperonas moleculares envolvidas em inúmeras funções intra e extracelulares, e todas elas estão relacionadas à citoproteção, participando ativamente da maquinaria de reparo celular. Nesse sentido, essas proteínas têm sido amplamente empregadas em processos de avaliação de contaminações ambientais, pois sua expressão é indicativa do quanto o agente poluidor/estressor está interferindo nas atividades celulares e fisiológicas dos organismos. Sabe-se também que as HSPs estão envolvidas no processo de apoptose, pois inúmeros trabalhos apontam as intervenções que essas proteínas apresentam nas vias apoptóticas, de modo que, foram classificadas como anti-apoptóticas as HSP27, HSP70 E HSP90 e pró-apoptóticas as HSP60 e HSP10 (BEERE. GREEN, 2001;

DIDELOT et al., 2006; ARYA et al., 2007; CASTRO et al., 2013; MOREIRA-DE-SOUSA et al., 2018). A resistência adquirida das células ao estresse é um conceito bem estabelecido, no entanto, em estudos dos principais mediadores desta resposta oriunda das proteínas de choque térmico (HSPs) levaram a descoberta dos importantes papéis desempenhados por essas proteínas na regulação da morte celular apoptótica (KENNEDY et al., 2014).

Com base nisso, o presente estudo fornece informações sobre os efeitos da vinhaça da cana-de-açúcar bruta e após neutralização de seu pH, sobre um bioindicador de solo, avaliando a ativação da proteína HSP70 e o processo de apoptose pelo método de TUNEL, traçando um paralelo entre os resultados obtidos. O uso de diplópodos como bioindicadores acrescido da utilização das técnicas moleculares apropriadas para avaliar os processos de estresse e morte celular tornou possível inferir efeitos mais complexos nestes organismos em contato com o resíduo como um agente estressor.

As imunomarcações da HSP70 observadas nos animais expostos ao grupo controle em regiões específicas, como células epiteliais e células hepáticas, são um indicativo de que essas proteínas residem normalmente nas células e fazem parte da linha de defesa das mesmas em condições normais. Ao passo que as marcações de apoptose no grupo controle apresentaram-se concentradas na região epitelial, sendo os núcleos da porção apical e média do epitélio os que mais apresentaram marcações; na camada de células hepáticas houve marcações com maior distanciamento uma das outras, também indicativo de que este processo participa da homeostase tecidual normal.

O processo de renovação celular na região epitelial, bem como a função de detoxificação sabidamente exercida pela camada de células hepáticas possibilita uma interpretação numa área de intersecção entre a imunomarcação da HSP70 e o processo de apoptose, pois a ativação da proteína ocorre em mecanismos normais como, no ciclo de divisão celular, crescimento celular e processos de morte celular. Se no organismo há necessidade de renovar as células por uma razão de desgaste, mau funcionamento ou excesso de acúmulo de substâncias nocivas, as HSP70 são ativadas como meio de controle da qualidade do processo e, consequentemente, a via apoptótica é também ativada, pois a homeostase tecidual é dependente do equilíbrio dinâmico entre proliferação celular e apoptose (JÄÄTELA et al., 1998; CASTRO et al., 2013; COELHO et al., 2017; MOREIRA-DE-SOUSA et al., 2018).

No grupo de animais expostos a vinhaça bruta, na concentração de campo, a HSP70 apresentou imunomarcção mais intensa na região apical do epitélio e na camada de células hepáticas, quando comparado ao grupo controle, enquanto que no grupo exposto ao dobro da concentração as células hepáticas apresentaram imunomarcção com maior intensidade comparativamente ao grupo exposto a concentração de campo, bem como ao controle. Enquanto que no grupo exposto à vinhaça bruta, na concentração de campo, poucas marcações de apoptose foram observadas, sendo a maioria localizada, preferencialmente, na camada de células hepáticas, enquanto que, no dobro da concentração de campo, houve um aumento das marcações em comparação ao grupo anterior, sendo a maioria concentrada nos núcleos da camada de células hepáticas.

Os resultados para HSP70 corroboram ao que foi descrito por Coelho et al. (2017) que também expuseram diplópodos à vinhaça de cana-de-açúcar e relataram que nos animais expostos a esse resíduo, as imunomarcações positivas na região apical do epitélio eram compatíveis com processos de proteção celular, na medida em que as imunomarcações positivas observadas nas células hepáticas também sinalizaram a função citoprotetora, pois ambas as células asseguraram a homeostase celular estimulando uma reação do organismo frente ao resíduo. Diante da escassez de trabalhos com HSP70 em diplópodos expostos a agentes estressores, os autores correlacionaram os dados obtidos aos dados de morfologia existentes com estes animais para facilitar as inferências sobre o contato dos animais com a vinhaça.

Deste modo, as imunomarcações observadas nos animais expostos à vinhaça, em ambas as concentrações refletem na porção apical do epitélio a primeira barreira de defesa do órgão. Sabe-se que nesta região encontram-se as células absortivas dotadas de microvilosidades, as quais participam não só da absorção de alimentos, como também impedem que substâncias nocivas adentrem ao organismo; sendo assim a participação das HSP70 nessa etapa é recrutada. Supõe-se também que a localização da expressão da proteína HSP70, preferencialmente em determinadas regiões, relaciona-se com a disposição das organelas nas células, visto que nas células absortivas a ocorrência de muitas mitocôndrias na porção apical das células, bem como a grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso na porção mediana destas células, possivelmente estabilizam as reações celulares evitando comprometimentos das funções proteicas diante de substâncias citotóxicas (KÖLHER et al., 1995; CAMARGO-MATHIAS et al.,

2004; ALVES FILHO, 2008; CASTRO et al., 2013; FONTANETTI et al., 2015; CRISTOFOLETTI et al., 2016; COELHO et al., 2017). Por estas razões, sugere-se que as imunomarcações localizadas na porção apical do epitélio estejam participando dos processos de citoproteção ao organismo frente a substâncias nocivas, função esta tão bem desempenhada pelas HSP70.

Sabe-se que a vinhaça apresenta quantidades desbalanceadas de elementos minerais e orgânicos, além de pH ácido, logo uma situação de estresse osmótico também pode ocorrer nas células levando ao aumento dos níveis de HSP70 na medida em que auxiliam na síntese e maturação de novas proteínas que irão substituir aquelas afetadas pelo estresse metabólico (CASTRO et al., 2013; CRISTOFOLETTI et al., 2017).

As imunomarcações mais intensas observadas nas células hepáticas nas exposições à vinhaça bruta, em ambas as concentrações, atestam que altos níveis de HSP70 são decorrentes da citoproteção exercida por estas células, pois correlacionando aos vários trabalhos com o intestino médio do diplópodo *R. padbergi*, em todos são relatados grandes acúmulos de esferocristais nas células hepáticas, desempenhando o papel de inativação de compostos químicos tóxicos no organismo do animal (FONTANETTI et al., 2015).

Paralelamente aos resultados de marcação de apoptose, em ambos os grupos expostos à vinhaça bruta, pode-se inferir que na situação de pouca marcação no método de TUNEL a super expressão da HSP70 (resultado de marcações mais intensas) tenha inibido a apoptose, uma vez que inúmeros trabalhos relatam a intervenção das HSP70 nas vias apoptóticas, as quais também protegem as células contra estímulos apoptóticos. A literatura ainda aponta que as HSP70 podem atuar em vários pontos nas vias apoptóticas com a finalidade de garantir que o dano induzido pelo estresse não desencadeie, inadequadamente, a morte celular, visto que o custo energético para célula do processo de morte é grande, portanto verificações apropriadas antes que a cascata apoptótica tenha “permissão” para executar a morte são de fundamental importância. Ao que parece as HSP70 fornecem um forte sistema de verificação (BEERE; GREEN 2001; DIDELOT et al., 2006; 2007; ARYA et al., 2010).

A participação das mitocôndrias na regulação da apoptose também tem sido reportada, ao que parece vários estímulos de morte atingem essas organelas e estimulam, por um mecanismo desconhecido, a liberação de várias proteínas, incluindo

o citocromo c e, uma vez liberado no citosol, o citocromo c liga-se à sua molécula adaptadora Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1) que oligomeriza e ativa a pró-caspase-9, formando o complexo apoptossomo, resultando na clivagem e ativação de pró-caspase-9 e outras pró-caspases que são responsáveis pelas etapas executivas da morte celular apoptótica (ROBERTSON; ORREINIUS, 2000). Considerando estas informações e o fato de que muitas mitocôndrias ocorrem nas células principais do intestino médio, possivelmente essas organelas estão envolvidas tanto na ativação das HSP70 quanto nos processos de apoptose destas células.

O tratamento da vinhaça para neutralização de seu pH revelou-se menos danoso aos tecidos analisados, pois as imunomarcações observadas no grupo exposto à vinhaça tratada, na concentração de campo, foram consideradas fracas em relação ao observado nos grupos expostos à vinhaça bruta, aproximando-se do observado para o grupo controle. Enquanto que nos animais expostos à vinhaça tratada no dobro da concentração houve imunomarcação forte na camada de células hepáticas. Comparativamente aos resultados para marcação da apoptose, poucas marcações foram observadas em relação aos grupos expostos à vinhaça bruta e, no grupo exposto à vinhaça tratada, dobro da concentração de campo, a região epitelial não apresentou marcações e a camada de células hepáticas apresentou núcleos marcados em maior incidência quando comparado ao tratamento anterior, mas não superior aos tratamentos com a vinhaça bruta.

A correlação destes resultados sugere que nas células com menos ativação da HSP70, provavelmente, o resíduo não alterou o meio celular, bem como neutralizou a absorção de substâncias tóxicas pelo intestino médio. Os processos de renovação celular foram mínimos, também atestando não haver muitas ocorrências de células danificadas. Consequentemente, os processos de apoptoses mantiveram-se na incidência normal do tecido.

A análise de células em apoptose pode representar grande utilidade em processos de avaliações ambientais, tanto quanto a HSP70, pois além de estarem associadas, apresentam grande sensibilidade diante de substâncias citotóxicas. Alguns exemplos de trabalhos com o uso desta ferramenta foi apresentado por Garcia-Casca et al. (2010), que avaliaram a apoptose folicular no mexilhão da espécie *Mytella strigata* e obtiveram dados que sinalizaram que o índice apoptótico em mexilhões tropicais pode sim representar um indicador útil de estresse ambiental nos ecossistemas costeiros.

Yavaşoğlu et al. (2016) utilizaram a espécie *Mytilus galloprovincialis* (mexilhão negro) para avaliar o efeitos de agentes poluidores por meio da imunorreação de TUNEL e o nível de apoptose em paralelo com alterações histopatológicas. O aumento da expressão do gene da caspase e da imunoreatividade do TUNEL nos tecidos de mexilhões mais expostos aos contaminantes do ambiente foram encontrados em confirmação com as alterações histopatológicas, especialmente no hepatopâncreas, órgão mais afetado por poluentes orgânicos e inorgânicos devido ao fato de ser uma região metabolicamente ativa. Logo, os resultados mostraram que o hepatopâncreas é mais sensível ao dano causado por poluentes ambientais do que as brânquias e que estes tecidos podem ser usados como um sistema de alerta precoce e monitoramento da poluição no ecossistema marinho.

5. Conclusão

Face ao exposto, o presente estudo trouxe como proposta o tratamento da vinhaça para ajuste de pH e a avaliação dos efeitos do resíduo tratado em comparação a sua forma bruta em animais bioindicadores de solo. Em associação com ferramentas moleculares como a investigação da ativação das proteínas HSP70 e do processo de morte por apoptose foi possível observar que o resíduo com pH neutro apresentou menores alterações nestes tipos de resposta nas células dos animais, confirmando ser uma alternativa viável para o emprego da vinhaça na fertirrigação.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), a FAPESP (processo 2012/50197-2) e ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisas) pelo apoio financeiro.

7. Referências

ALVES FILHO, M. Chaperonas, as ‘damas de companhia’ das proteínas. **Jornal da Unicamp**, n. 9, 2008.

ARAUJO, G. J. F.; OLIVEIRA, S. V. W. B. Vinhaça - conceito, desafios e oportunidades: uma revisão bibliográfica. In: **XXIII Simpósio de Engenharia de**

Produção, Gestão de Operações em Serviços e seus Impactos Sociais, Bauru, SP, p. 1-14, 2016.

ARYA, R.; MALLIK, M.; LAKHOTIA, S. C. Heat shock genes – integrating cell survival and death. **Journal of Biosciences**, v. 32, n. 3, p. 595–610, 2007.

BEERE, H. M.; GREEN, D. R. Stress management – heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. **TRENDS in Cell Biology**, v.11, n. 1, p. 6-10, 2001.

BLANCO, A.; BLANCO, G. Chapter 32- Apoptosis. In: BLANCO, A.; BLANCO, G. **Medical Biochemistry**, Elsevier, p. 791-796, 2017.

CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FANTAZZINI, E. R.; FONTANETTI, C. S. Ultrastructural features of the midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda: Spirobolida). **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 21, n. 2, p. 65-71, 2004.

CASTRO, S. V.; LOBO, C. H FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Proteínas de choque térmico HSP70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 4, p. 261-271, 2013.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – **Norma Técnica P4.231: Vinhaça: Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola**, 3ed, 2ª versão, pp15, 2015.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; FRANCISCO, A.; PEDRO-ESCHER, J.; GASTALDI, V. D.; FONTANETTI, C. S. Diplopods as Soil Bioindicators of Toxicity After Application of Residues From Sewage Treatment Plants and Ethanol Industry. **Microscopy and Microanalysis**, v. 22, p. 1098–1110, 2016.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; MOREIRA-DE-SOUSA, C.; SOUZA, R. B.; FRANCISCO, A.; GASTALDI, V. D. O emprego de diferentes resíduos utilizados como fertilizantes na cultura de cana-de-açúcar. . In: FONTANETTI, C.S.; BUENO,

O.C. (Org.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. 1ed. Bauru, SP: Canal 6, v. 1, p. 63-86, 2017.

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

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

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

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

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

DIDELTOT, C.; LANNEAU, D.; BRUNET, M.; JOLY, A. L.; THONEL, A.; CHIOSIS, G.; GARRIDO, C. Anti-Cancer Therapeutic Approaches Based on Intracellular and Extracellular Heat Shock Proteins. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 2839-2847, 2007.

DIDELOT, C.; SCHMITT, E.; BRUNET, M.; MAINGRET, L.; PARCELLIER, A.; GARRIDO, C. Heat Shock Proteins: Endogenous Modulators of Apoptotic Cell Death. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 172, p. 171-198, 2006.

FONTANETTI, C. S.; MOREIRA DE SOUSA, C.; PINHEIRO, T. G.; SOUZA, R. B.; FRANCISCO, A. **Diplopoda-Digestive System**. In: Alessandro Minelli. (Org.). Treatise on Zoology-Anatomy, Taxonomy, Biology. 1ed. Leiden-Boston: Brill, v. 2, p. 109-128, 2015.

FREITAS, P. V.; DA SILVA, D. R.; BELUOMINI, M. A.; DA SILVA, J. L.; STRADIOTTO, N. R. Determination of Phenolic Acids in Sugarcane Vinasse by HPLC with Pulse Amperometry. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, doi.org/10.1155/2018/4869487, p. 1-10, 2018.

GARCIA-CASCA, A.; LEAL-TARIN, B.; RÍOS-SICAIROS, J.; HERNÁNDEZ-CORNEJO, R.; AGUILAR-ZÁRATE, G.; BETANCOURT-LOZANO, M. Follicular apoptosis in the mussel (*Mytella strigata*) as potential indicator of environmental stress in coastal ecosystems. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, v. 45, p. 56–61, 2010.

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

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

JÄÄTELÄ, M.; WISSING, D.; KOKHOLM, K.; KALLUNKI, T.; EGEHLAD, M. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. **The EMBO Journal**, v.17, n. 21, p. 6124–6134, 1998.

KENNEDY, D.; JÄGER, R.; MOSSER, D. D.; SAMALI, A. Critical Review Regulation of Apoptosis by Heat Shock Proteins. **IUBMB Life, International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, p. 327-338, 2014.

KÖHLER, H.R.; KÖRTJE, K.H.; ALBERTI, G. Content, absorption quantities and intracellular storage sites of heavy metals in Diplopoda (Arthropoda). **BioMetals**, v. 8, p. 37-46, 1995.

LYRA, M. R. C. C. **Estudo comparativo da aplicação da vinhaça tratada e in natura em solos sob o cultivo de cana-de-açúcar**. 140p. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Departamento de Engenharia Civil, Recife, PE, 140p, 2008.

MALLADI, S.; CHALLA-MALLADI, M.; BRATTON, S. B.; 2.28 - Apoptosis. In: McQUEEN, C. **Comprehensive Toxicology** (Second edition), v. 2, p. 543-578, 2010.

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

MISHRA, S. R.; PALAI, T. K. Importance of heat shock protein 70 in livestock - at cellular level. **Journal of Molecular Pathophysiology**, v. 3, n. 2, p. 30-32, 2014.

MOREIRA-DE-SOUSA, C.; SOUZA, R. B.; FONTANETTI, C. S. HSP70 as a Biomarker: an Excellent Tool in Environmental Contamination Analysis - a Review. **Water, Air, & Soil Pollution**, doi.org/10.1007/s11270-018-3920-0, p. 229-264, 2018.

MORINI, M. S. C.; SILVA, O. G. M.; ZAMBON, V.; NOCELLI, R. N. F. Cultura de cana-de-açúcar no brasil: manejo, impactos econômicos, sociais e ambientais. . In: FONTANETTI, C.S.; BUENO, O.C. (Org.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. 1ed. Bauru, SP: Canal 6, v. 1, p. 31-50, 2017.

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

PEDRO-ESCHER, J.; MAZIVIERO, G.; FONTANETTI, C.S. Mutagenic action of sugarcane vinasse in the *Tradescantia pallida* test system. **Journal of Ecosystem & Ecography**, v. 4, n. 2, p. 1-4, 2014.

RAHMAN, S.; SABNIS, M.; KUUSISTO, L. M.; SATTLER, M.; CHEN, V. Models for organics removal from vinasse from ethanol production. **Clean Technologies and Environmental Policy**, doi.org/10.1007/s10098-018-1496-4, 2018.

ROBERTSON, D. J; ORRENIUS, S. Molecular Mechanisms of Apoptosis Induced by Cytotoxic Chemicals. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, n. 5, p. 609-627, 2000.

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

SOUZA, R. B., MOREIRA-DE-SOUSA, C.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; SOUZA, C. P.; FONTANETTI, C. S. Impacto de resíduos (vinhaça e biossólido) lançados no cultivo de cana-de-açúcar em representantes da fauna edáfica. In: FONTANETTI, C.S.; BUENO, O.C. (Org.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. 1ed. Bauru, SP: Canal 6, v. 1, p. 197-214, 2017.

YAVAŞOĞLU, A.; ÖZKAN, D.; GÜNER, A.; KATALAY, S.; OLTULU, F.; YAVAŞOĞLU, N. K. Histopathological and apoptotic changes on marine mussels *Mytilus galloprovincialis* (Lamark, 1819) following exposure to environmental pollutants. **Marine Pollution Bulletin**, DOI.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.084, p. 1-8, 2016.

Tabela 1. Dados referentes à fertilidade do solo controle.

Parâmetro	Solo
pH (CaCl ₂)	5
MO(g/dm ³)	20
P (mg/dm ³)	6
K (mmol _c /dm ³)	1,4
Ca (mmol _c /dm ³)	19
Mg (mmol _c /dm ³)	10
H+Al (mmol _c /dm ³)	23
SB (mmol _c /dm ³)	30,4
CTC (mmol _c /dm ³)	53,4
V%	57

MO: matéria orgânica; **CTC:** capacidade de troca catiônica; **SB:** soma das bases; **V:** saturação de bases.

Método: Análise química para a avaliação da fertilidade de solos tropicais, Instituto Agrônômico, 2001.

Tabela 2. Análises físico-químicas e de metais das amostras de solo e de vinhaça.

Parâmetro	Amostras		VPM		Método	
	Solo (mg/Kg)	Vinhaça (mg/L)	Solo	Vinhaça	Solo	Vinhaça
Arsênio	9,25	<0,005	NA	NA	USEPA 7062	USEPA 7062
Bário	24,95	0,201	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Cádmio	<0,167	<0,001	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Cálcio	360	992	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
		(Diluição: 50)				
Carbono orgânico total ²	3,49	7820	NA	NA	POPPA 182	SMEWW 5310B
Chumbo	25,67	<0,005	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Cobre	13,67	0,119	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Alumínio ³ /Alumínio	1	2,18	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Ferro	-	6,33	NA	NA	-	SMEWW 3030E
Manganês	-	3,357	NA	NA	-	SMEWW 3030E
		(Diluição: 10)				
Condutividade eletrolítica (µs/cm)	78	10740	NA	NA	IAC 2009	SMEWW 2510B
Cromo	15,93	0,025	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Cloreto	-	1443		250	-	USEPA 300.1
		(Diluição: 100)				
Enxofre total	41,75	-	NA	NA	USEPA 3050B	-
Fósforo total	237	49,3	NA	NA	USEPA 3050B	USEPA 300.1
	(Diluição: 10)	(Diluição: 50)				
Magnésio	158	307	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
		(Diluição: 10)				
Mercurio	<0,011	<0,0002	NA	NA	USEPA 7471	USEPA 7470
Molibdênio	1,750	0,010	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Níquel	4,060	0,024	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Nitrogênio nítrico	<1,262	<11,400 (Diluição: 100)	NA	NA	USEPA 300.1	USEPA 300.1
Nitrogênio nitroso	<0,033	<0,300	NA	NA	USEPA 300.1	USEPA 300.1
		(Diluição: 100)				
Nitrogênio amoniacal	18,5	10,77	NA	NA	SMEWW 4500-NH3 B, C	SMEWW 4500-NH3D
		(Diluição: 10)				
Nitrogênio kjedahl	433,1	278,9	NA	NA	SMEWW 4500-Norg B	SMEWW 4500-NorgB
pH	5	4,23	NA	NA	USEPA 9045	USEPA 9045
Potássio	1,4	3210	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
		(Diluição: 50)				
Selênio	<0,278	<0,005	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Sódio total	<55,556	12,4	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Conteúdo sólido		3860	NA	NA	-	SMEWW 2540D
Umidade	10,12	-	NA	NA	POPDAM 049	-
Zinco	9,61	0,754	NA	NA	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Prata	-	<0,005	NA	0,01	USEPA 3050B	SMEWW 3030E
Dureza calculada	-	1457,0	NA	NA	-	SMEWW 2340B
DBO	-	16586	NA	NA	-	SMEWW 5210B
(incubação de 5 dias)						
DQO	-	31257	NA	NA	-	SMEWW 5220D
(Diluição: 50)						

VMP: valor máximo permitido, segundo a CETESB (195/2005-E); **SMEWW:** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22th Edition, 2012; **USEPA:** United States Environmental Protection Agency; **POP:** Procedimento Operacional Padrão para determinação por cálculo; ICA: Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agrônomo de Campinas, 2009; **NA:** não aplicável.

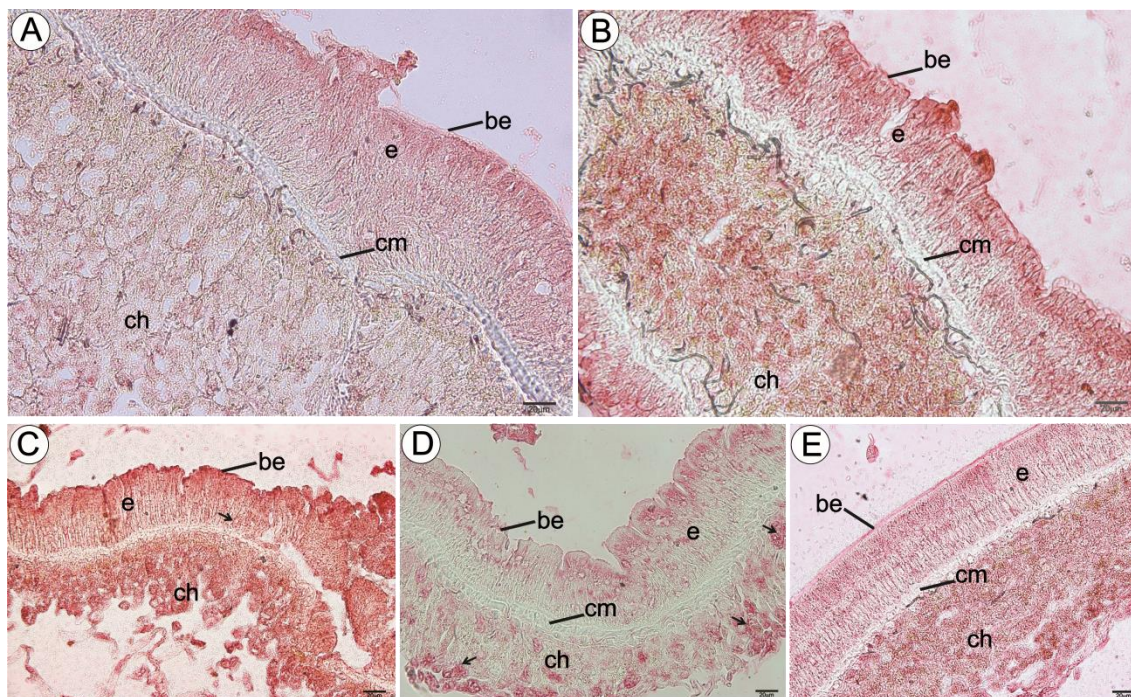


Figura 1. Secções histológicas do intestino médio de *R. padbergi* submetidas a técnica de imunohistoquímica para marcação da proteína HSP70. **A:** grupo controle. **B:** grupo exposto a vinhaça bruta na concentração de campo; **C:** grupo exposto a vinhaça bruta no dobro da concentração de campo; **D:** grupo exposto a vinhaça tratada na concentração de campo; **E:** grupo exposto a vinhaça no dobro da concentração de campo. be: bordo em escova; cm: camada muscular; ch: célula hepática; e: epitélio

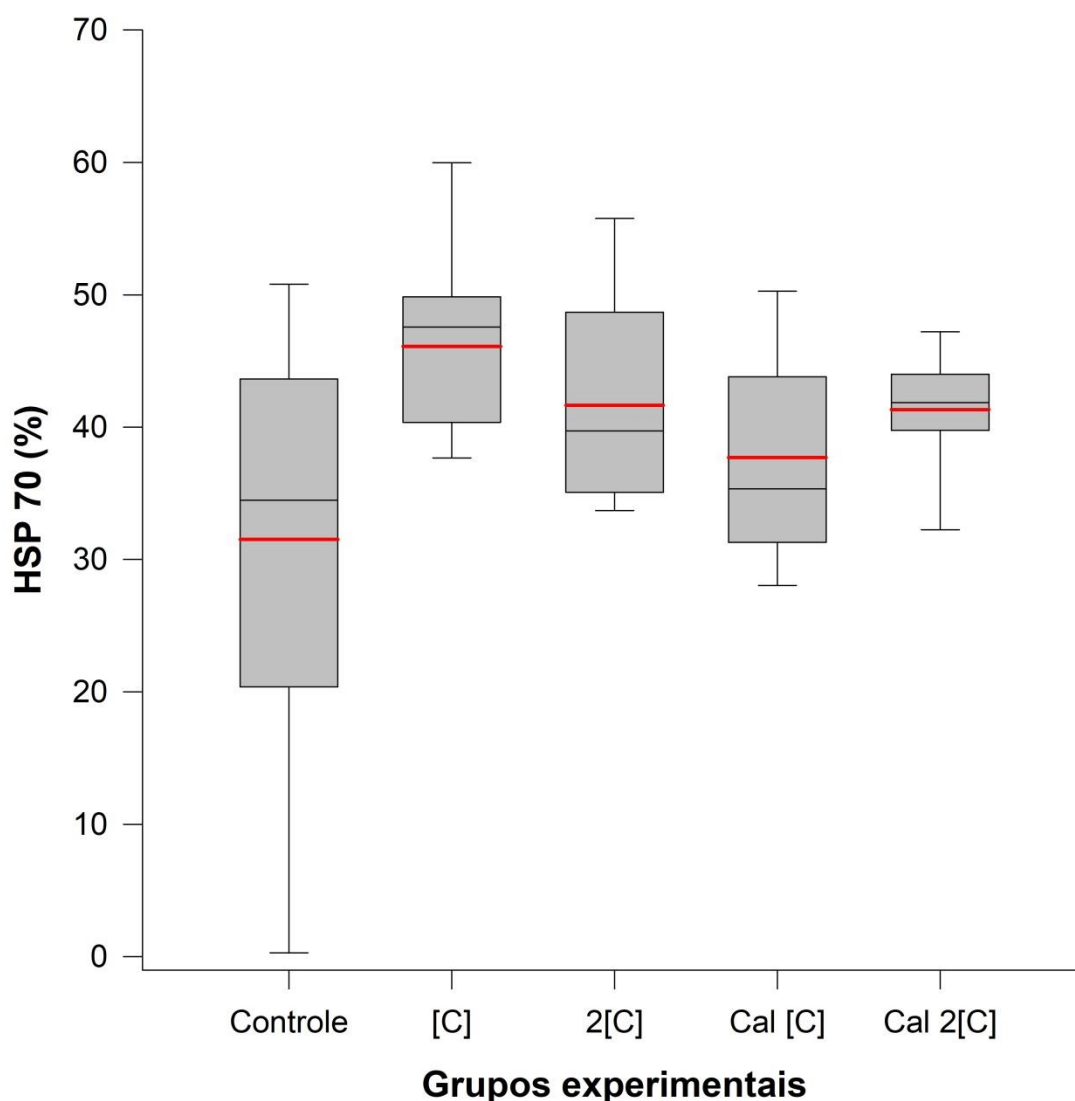


Figura 2. Representação gráfica das imunomarcações da proteína HSP70 por porcentagem de área do intestino médio de *R. padbergi*.

controle: grupo expostos ao solo controle; [C]: grupo exposto a solo contendo vinhaça bruta na concentração de campo; 2[C]: grupo exposto a solo contendo vinhaça bruta no dobro da concentração de campo; Cal [C]: grupo exposto a solo contendo vinhaça tratada na concentração de campo; Cal 2[C]: grupo exposto a solo contendo vinhaça tratada no dobro da concentração de campo.

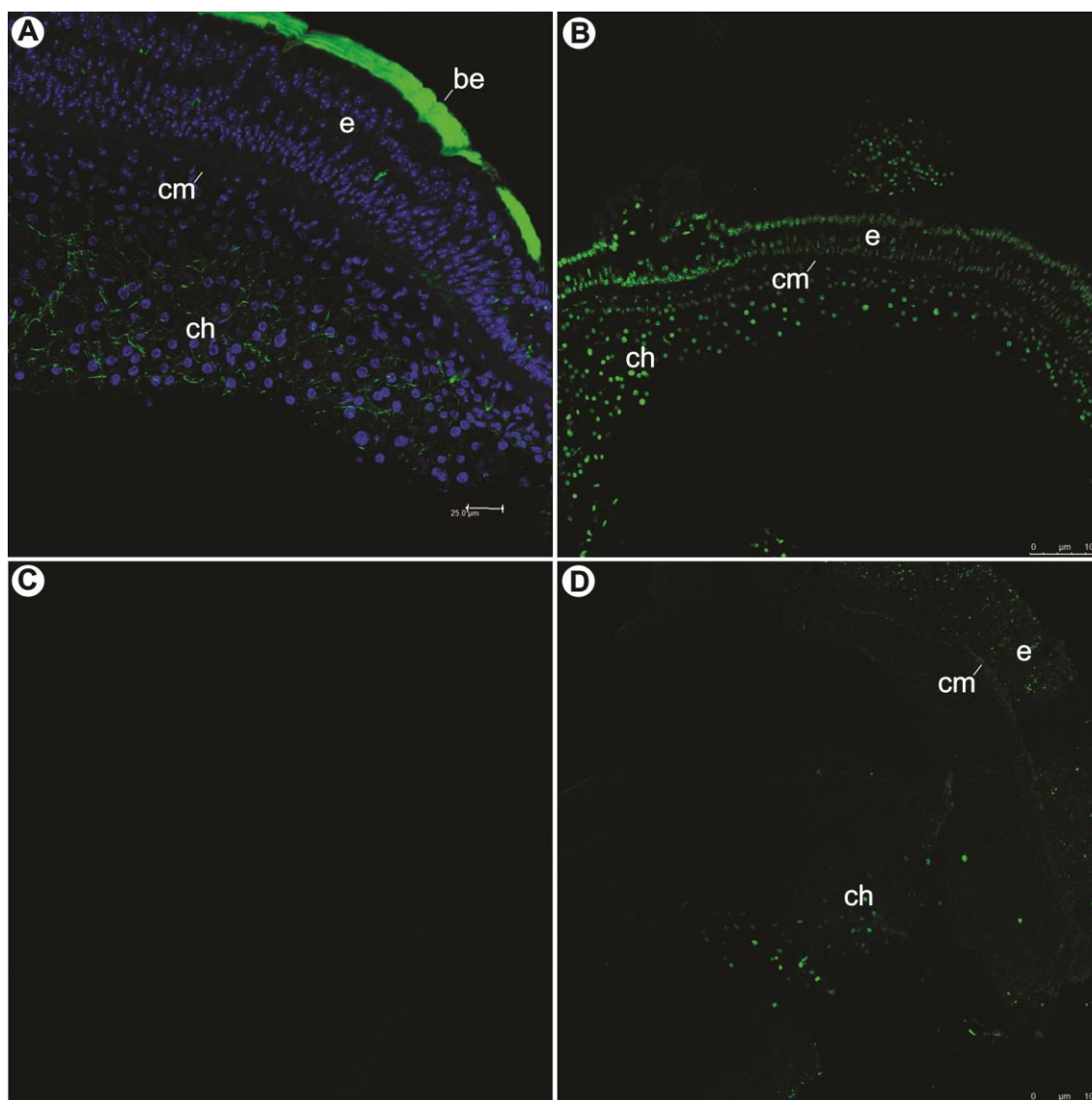


Figura 3. Secções histológicas do intestino médio do diplópodo *R. padbergi* submetidos a aplicação da técnica de Marcação da actina-F/núcleo e método de TUNEL. **A:** Marcação da actina-F/núcleo; **B:** controle positivo do método de TUNEL; **C:** controle negativo do método de TUNEL; **D:** grupo controle.

e- epitélio, ch- camada de células hepáticas, cm- camada muscular

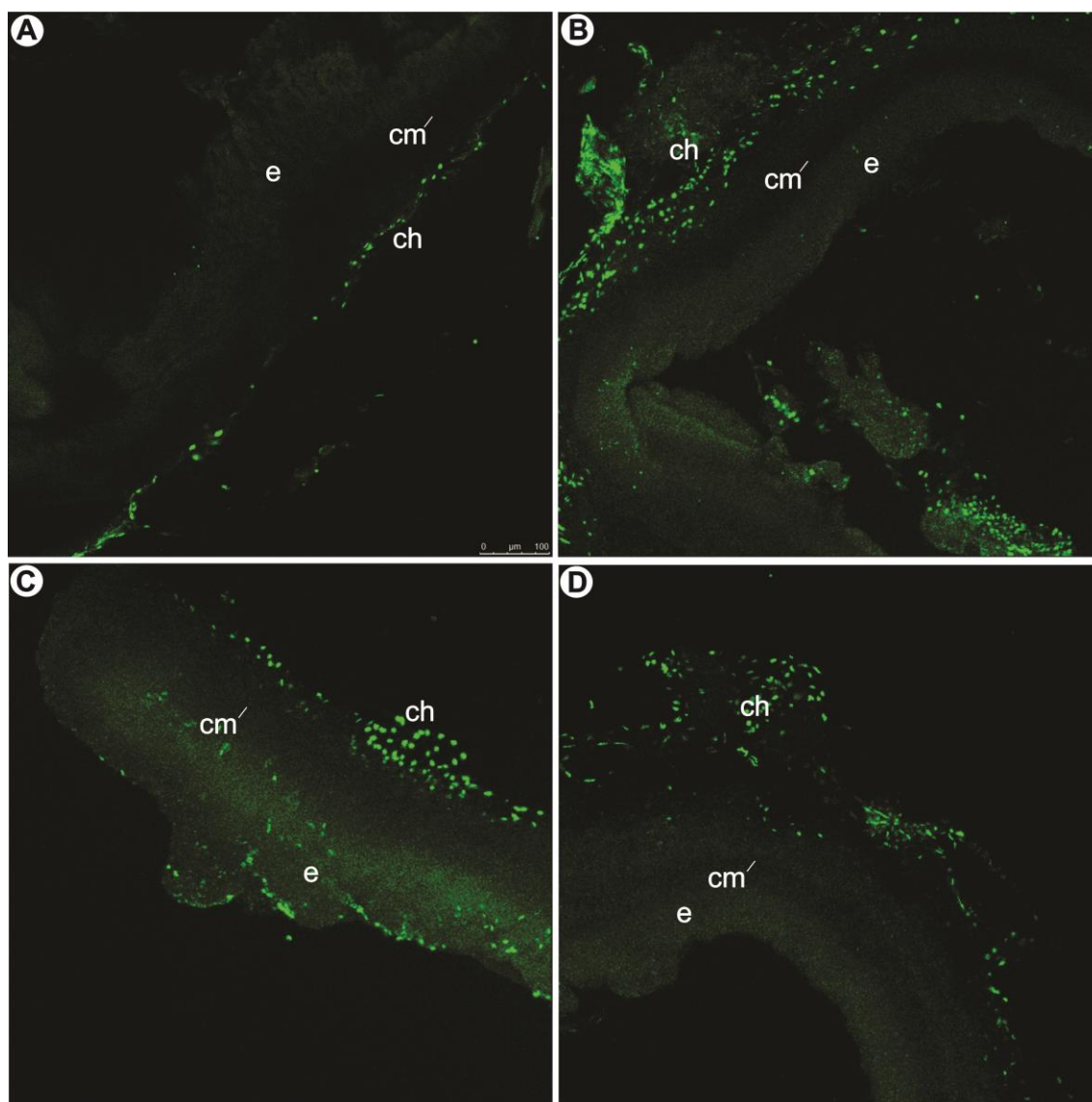


Figura 4. Secções histológicas do intestino médio do diplópodo *R. padbergi* submetidos ao método de TUNEL. **A:** grupo exposto à vinhaça bruta na concentração de campo; **B:** grupo exposto à vinhaça bruta no dobro da concentração de campo; **C:** grupo exposto à vinhaça tratada na concentração de campo; **D:** grupo exposto à vinhaça no dobro da concentração de campo.

e- epitélio, ch- camada de células hepáticas, cm- camada muscular

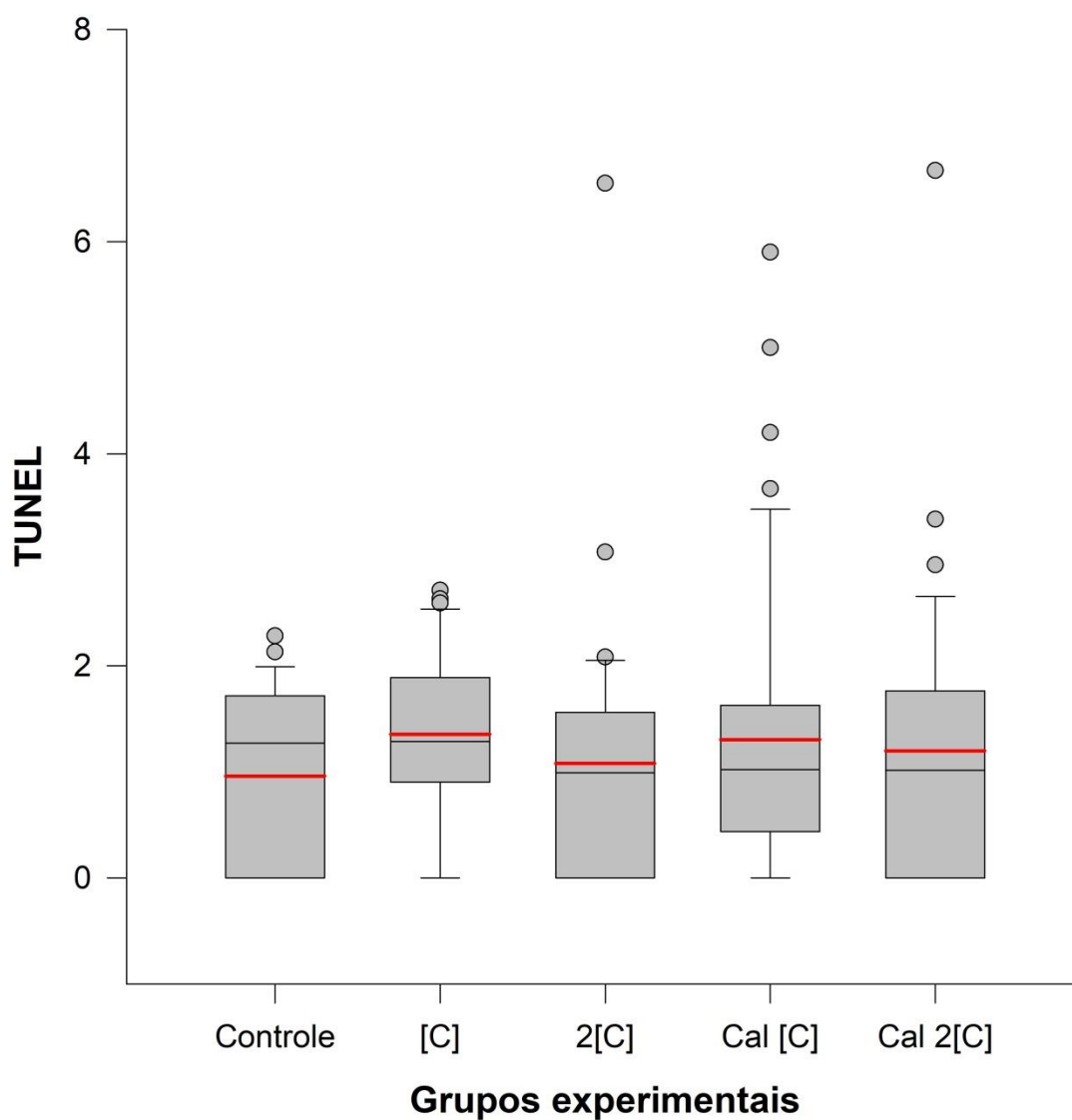


Figura 5. Representação gráfica das marcações pelo método de TUNEL no intestino médio de *R. padbergi*.

controle: grupo expostos ao solo controle; [C]: grupo exposto a solo contendo vinhaça bruta na concentração de campo; 2[C]: grupo exposto a solo contendo vinhaça bruta no dobro da concentração de campo; Cal [C]: grupo exposto a solo contendo vinhaça tratada na concentração de campo; Cal 2[C]: grupo exposto a solo contendo vinhaça tratada no dobro da concentração de campo.

ARTIGO 3

Avaliação ecotoxicológica da influência da vinhaça da cana-de-açúcar bruta e após ajuste de pH em organismos do solo por meio de testes certificados pela ISO

Cristina Moreira de Sousa^{1,2}; Cleiton Pereira de Souza^{1,2}; Hellen Maria Soares Lima³; Tiago Natal da Luz⁴; José Paulo Sousa⁴; Carmem Silvia Fontanetti¹

¹ UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), Campus Rio Claro, São Paulo, Brasil.

² CAPES, Fundação, Ministério da Educação do Brasil, Brasília DF 70040-020, Brasil.

³ UFSCAR (Universidade Federal de São Carlos), Centro de Ciências e Tecnologias para Sustentabilidades, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

⁴ Instituto de Ciências da Vida, Departamento de Zoologia da Universidade de Coimbra, Portugal.

Autora correspondente: Cristina Moreira de Sousa, moreiradesousa.c@gmail.com

UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), Departamento de Biologia, Instituto de Biociências. Av. 24-A, 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

Resumo

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar, com capacidade de produzir 31 bilhões de litros de etanol/ano; essa grande produção gera uma grande quantidade de resíduos e coloca o país em uma situação preocupante diante da destinação destes resíduos que essa alta produção acarreta. A vinhaça é o líquido residual de caráter ácido, gerado a partir da calda de destilação do licor de fermentação do álcool de cana-de-açúcar, sendo que sua produção é de 8 a 13 vezes maior que a do álcool gerado no processo. A utilização da vinhaça na fertirrigação tem sido uma prática amplamente empregada no cultivo da cana-de-açúcar, com o intuito de fornecer um melhor destino ao resíduo. No entanto a fertirrigação com vinhaça requer alguns cuidados, visto que ela pode promover melhorias na qualidade do solo, mas também pode ocasionar complicações devido ao seu alto poder poluente. Nesse sentido, a utilização de animais bioindicadores de solo para avaliar os efeitos deste resíduo faz-se necessária, visto que as respostas que estes animais podem fornecer são imprescindíveis para que a aplicação deste resíduo ocorra de forma correta. Este trabalho propôs o tratamento da vinhaça para neutralização do pH como meio de minimizar os efeitos provocados pela mesma. Para comprovar a eficácia desta proposta foram realizados testes ecotoxicológicos internacionalmente padronizados (ISO) utilizando os seguintes bioindicadores: minhocas (*Eisenia andrei*), colêmbolos (*Folsomia candida*) e enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*). Foram realizados testes de avoidance com as minhocas e os colêmbolos e testes de reprodução com minhocas, colêmbolos e enquitreídeos. Diante dos resultados verificou-se que a neutralização do pH da vinhaça influenciou os comportamento de fuga e reprodução das espécies testadas de maneira distinta. As espécies *E. crypticus* e *F. candida* não foram influenciadas, nem pela vinhaça bruta, nem pela vinhaça tratada, enquanto que, a espécie *E. andrei* apresentou-se mais sensível a presença da vinhaça no solo, demonstrando comportamento de fuga em concentrações mais elevadas de vinhaça bruta e tratada, e, no teste de reprodução, apresentou aumento no número de juvenis na exposição à vinhaça tratada, em relação a vinhaça bruta.

Keywords: Bioindicadores de solo; vinhaça de cana-de-açúcar tratada; testes de fuga; testes de reprodução.

1. Introdução

No Brasil a alta produção de etanol a partir da cana-de-açúcar resulta num grande volume de vinhaça, um resíduo de tonalidade castanho escuro, de alto conteúdo orgânico e pH geralmente ácido. Inicialmente este resíduo era lançado em corpos hídricos, porém causou sérios problemas de poluição. Frente à necessidade de encontrar novos meios para seu descarte, diversas formas de reuso foram criadas, dentre elas a mais difundida foi a prática da fertirrigação (ALVES et al., 2015; CHRISTOFOLETTI et al. 2017).

Amparada pela Norma Técnica P4.231 (CETESB-Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2015), a qual estabelece os critérios e os procedimentos adequados de utilização da vinhaça no solo, a fertirrigação foi muito bem vinda, pois muito pesquisadores relataram grandes benefícios nas culturas, como aumento da fertilidade do solo, disponibilidade de altas concentrações de nitrato, potássio e matéria orgânica, favorecendo positivamente a produtividade das culturas (FEIGIN et al., 1991; FREIRE; CORTÊZ, 2000; MEDEIROS et al., 2003; LYRA, 2008; BEBÉ et al., 2009; BARROS et al., 2010; DÖLL; FORESTI, 2010; ESPAÑA-GAMBOA, 2011; SILVA et al., 2014). Em contrapartida diversos trabalhos também revelaram o potencial tóxico que a vinhaça pode apresentar, pois diferentes organismos bioindicadores expostos ao resíduo apresentaram alterações significativas e preocupantes (YESILADA, 1999; KUMAR; GOPAL, 2001; CHRISTOFOLETTI et al., 2013b; 2016; PEDRO-ESCHER et al., 2014; 2016; MARINHO et al., 2014; GARCIA et al., 2017; COELHO et al., 2017; SOUZA et al., 2017; CORREIA et al., 2017a; b).

Nesse sentido, a necessidade de avaliar de forma mais completa os efeitos da vinhaça associada a ensaios ecotoxicológicos com os organismos vivos são de grande importância, uma vez que buscam complementar as avaliações químicas, investigando a toxicidade de substâncias, ou misturas, no ecossistema de forma mais pragmática (GUARATIN et al., 2008; ALVES et al., 2015). Para obtenção de resultados mais relevantes para o ecossistema, os ensaios devem ser aplicados com espécies pertencentes a diferentes níveis tróficos, visto que os efeitos resultarão não só da concentração e da composição do poluente, mas também irão repercutir de modo diferente para cada espécie, podendo ser tóxicos para todos os organismos ou limitar-se apenas a uma ou outra espécie (BIANCHI et al., 2010).

Espécies-padrão, como minhocas, enquitreídeos e colêmbolos, são ecologicamente relevantes e têm sido amplamente empregadas em avaliações de risco ecológico, pois fornecem respostas importantes a cerca de determinadas substâncias, bem como sua repercussão no meio ambiente (HUND- RINKE; WIECHERING, 2001; NATAL-DA-LUZ et al., 2004; ALVES et al., 2015).

As importantes funções exercidas pelas minhocas e o estreito contato com o solo confere a estes animais um excelente papel de bioindicador da qualidade de solo. As espécies *Eisenia andrei* e *Eisenia fetida* são espécies-padrão utilizadas em estudos ecotoxicológicos de solo, mundialmente empregadas para avaliação de resíduos e substâncias químicas, padronizadas pela ISO (International Organization for Standardization); essas espécies são facilmente criadas e manipuladas em laboratório (OECD, 2004; ISO - 17512-1, 2008; ISO – 11268-2, 2011).

O enquitreídeos desempenham papéis similares aos das minhocas, e, além disso, possuem quimiorreceptores altamente sensíveis a compostos químicos no ambiente onde se encontram. Por estas razões estes organismos também são considerados excelentes bioindicadores da qualidade de solo. A facilidade de criação e utilização das espécies *Enchytraeus albidus* e *Enchytraeus crypticus* em laboratório tornou-as padronizadas no protocolo da ISO-16387 (2013).

Tão eficientes quanto os anelídeos citados anteriormente, os colêmbolos também têm sido utilizados como organismos-teste na avaliação de diversas substâncias tóxicas, pois são animais com alta sensibilidade a alterações ambientais (BELLINGER et al. 2015). A espécie *Folsomia candida* é padronizada pela ISO (11267, 1999; 17512-2, 2011) nos testes de fuga e reprodução respectivamente. Diante de seu curto ciclo de vida e a capacidade de reprodução partenogenética, estes animais são excelentes organismos para estudar diferentes parâmetros individuais e populacionais em um único experimento (CROMMENTUIJN, et al. 1993; FOUNTAIN; HOPKIN, 2005).

Face ao exposto o objetivo deste trabalho foi verificar se o tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar com a finalidade de neutralizar seu pH (7,0) afetaria o comportamento e reprodução dos bioindicadores utilizados em testes ecotóxicológicos internacionalmente padronizados pela ISO.

2. Material e métodos

2.1 Solo

Para a montagem dos experimentos foi utilizado solo artificial 10% (SAT), preparado em laboratório de acordo com protocolo proposto para os testes de fuga e reprodução. A mistura foi composta de 10% de fibra de coco, 20% de caulino em pó e 70% de areia fina (OECD, 1984). A capacidade de retenção máxima de água (WHC) deste solo foi calculada de acordo com as orientações do Anexo C da ISO-16387, 2013. A partir do valor obtido adotou-se para estes ensaios 60% da WHC do SAT 10%.

2.2 Vinhaça de cana-de-açúcar

A vinhaça foi coletada em usina localizada no interior do estado de São Paulo, Brasil. O efluente foi coletado próximo da montagem dos experimentos e mantido em câmara fria (4°C), até o início dos mesmos.

Foram utilizadas nos ensaios vinhaça bruta e vinhaça tratada com adição de CaO para ajuste de pH (pH 7,0). Diferentes concentrações (1, 5, 10, 20, 30, 40 e 60%) foram estabelecidas para o emprego dos resíduos nos ensaios, as quais foram calculadas em relação à WHC.

2.3 Caracterização química da vinhaça bruta

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

2.4 Organismos testes

Foram utilizadas nos ensaios ecotoxicológicos laboratoriais minhocas da espécie *E. andrei* (Lumbricidae), enquitreídeos da espécie *E. crypticus* (Enchytraeidae) e colêmbolos da espécie *F. candida* (Isotomidae).

As minhocas *E. andrei* foram aclimatadas em laboratório em recipientes de plástico contendo substrato de esterco de vaca. Os enquitreídeos *E. crypticus* foram mantidos em culturas em placas de Petri contendo agar composto por uma mistura de solução de sais de cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, cloreto de potássio e bicarbonato de sódio, bicarbonato de sódio, cloreto de potássio, água destilada e solução

constituída por bacti-agar, como substrato para os enquitreídeos; as culturas foram alimentadas com farinha de aveia de uma a duas vezes por semana. A espécie *F. candida* foi cultivada em laboratório em caixas de plástico contendo como substrato uma mistura de carvão ativado e gesso; as culturas foram alimentadas com fermento biológico de duas a três vezes por semana.

2.5 Testes ecotoxicológicos

2.5.1 Teste de fuga com *E. andrei*

Os ensaios de fuga com as minhocas foram realizados em conformidade com a ISO 17512-1 (2008); cinco réplicas por combinação dos tratamentos (sete para vinhaça bruta e sete para vinhaça tratada) e controle duplo, foram realizadas em recipientes plásticos de dimensões 20 cm de comprimento, 12 cm de largura e 5 cm de altura; os recipientes foram divididos em duas partes utilizando uma divisória de plástico introduzida verticalmente. Em um dos lados foi adicionado solo misturado à vinhaça e no outro lado o mesmo peso de solo controle. A divisória foi removida e 10 espécimes adultos de *E. andrei* foram colocadas sobre a linha de separação dos dois compartimentos. Os recipientes foram fechados com tampas perfuradas para permitir a circulação de ar; os animais não foram alimentados durante o teste e, ao final de 48h, o número de indivíduos presentes em cada compartimento foi registrado para posterior análise estatística. A porcentagem de fuga dos animais foi estabelecida, segundo a ISO-17512-1 (2008).

2.5.2 Teste de fuga com *F. candida*

Os ensaios de fuga com os colêmbolos ocorreram de acordo com as descrições estabelecidas na ISO-17512-2 (2001); seguiu-se o mesmo princípio dos testes de fuga com minhocas, porém os recipientes possuíam dimensões 7 cm de diâmetro e 6 cm de altura; as combinações testadas foram as mesmas utilizadas no teste com as minhocas, porém os cálculos diferiram nas quantidades de solo e de vinhaça (bruta/tratada) utilizados; cinco repetições foram utilizadas para cada combinação; após a adição dos solos com vinhaça, (bruta/tratada de acordo com os tratamentos estabelecidos) nos compartimentos, a divisória de plástico foi removida e foram introduzidos 20 colêmbolos com 10 a 12 dias de idade (provenientes de culturas sincronizadas) sobre a linha de separação entre os dois lados. Os recipientes foram fechados com tampas

transparentes. Os animais não foram alimentados durante o teste. Ao fim de 48h, o conteúdo de cada compartimento foi transferido para outro recipiente onde se adicionou água e algumas gotas de tinta nanquim azul para aumentar o contraste e facilitar a contagem dos colêmbolos que estavam sobre a água. Em seguida, o número de indivíduos presentes em cada compartimento foi contabilizado e tal como para as minhocas, os valores foram registrados para posterior análise estatística. A porcentagem de fuga dos animais foi estabelecida, segundo a ISO-17512-2 (2001).

2.5.3 Teste de reprodução com *E. andrei*

Os ensaios de reprodução com *E. andrei* foram realizados de acordo com o protocolo proposto na ISO-11268 9 (2011). Para montagem dos testes foram utilizados recipientes de vidro de dimensões 8 cm de diâmetro e 16 cm de altura, onde foram colocados solo preparado com vinhaça (bruta/tratada) de acordo com os tratamentos estabelecidos; 10 minhocas adultas (com clitelo aparente) previamente aclimatadas em solo controle durante 24h foram lavadas com água, pesadas e inseridas em cada unidade experimental. Os recipientes foram fechados com tampas perfuradas e cada réplica foi alimentada com estrume de vaca (5 g por réplica) durante as primeiras quatro semanas do teste. Utilizaram-se quatro réplicas por concentração e o ensaio teve duração total de 56 dias.

Após decorrido 28 dias do início do teste as minhocas adultas foram removidas e não foi mais colocado alimento no teste até o final do experimento. Ao término de 56 dias, os recipientes foram colocados em banho-maria numa temperatura de $60 \pm 5^{\circ}\text{C}$, por aproximadamente 30 minutos com o intuito de forçar o deslocamento dos juvenis para a superfície do solo, facilitando deste modo, a contagem dos animais. O registro da contagem foi analisado estatisticamente.

2.5.4 Teste de reprodução com *E. crypticus*

Os testes de reprodução com *E. crypticus* foram realizados de acordo com o protocolo proposto na ISO-16387 (2013). Para a montagem dos testes foram utilizados recipientes de vidro de dimensões 5 cm de diâmetro e 9 cm de altura; 10 indivíduos adultos clitelados foram inseridos nos recipientes contendo solo com vinhaça (bruta/tratada) de acordo com os tratamentos estabelecidos. Os testes foram alimentados semanalmente com farinha de aveia e os recipientes foram fechados hermeticamente.

Semanalmente, os frascos foram abertos, de modo a permitir trocas gasosas e realizada a reposição da umidade do solo. Foram realizadas cinco réplicas para cada tratamento (vinhaça bruta/tratada) mais uma réplica sem animal e oito réplicas para os controles mais uma réplica sem animal. A duração do teste foi de 28 dias e ao término deste período foi realizada a desmontagem do teste, onde foram adicionados em cada réplica álcool 96% e corante Rosa de Bengala 1%; as réplicas foram mantidas nestas soluções por no mínimo 12 horas para que pudesse ser iniciada a contagem dos animais. O registro da contagem foi analisado estatisticamente.

2.5.5 Teste de reprodução com *F. candida*

Os testes de reprodução com *F. candida* foram realizados de acordo com protocolo proposto na ISO-11267 (1999). Para a montagem dos testes foram utilizados recipientes de vidro de dimensões 5 cm de diâmetro e 9 cm de altura; 10 colêmbolos adultos, com idades entre 10 e 12 dias (provenientes de culturas sincronizadas), foram introduzidos em cada unidade experimental e os recipientes foram fechados hermeticamente. O teste foi alimentado com levedura granulada seca (fermento biológico) no início do teste e após 14 dias; semanalmente, os recipientes foram abertos para permitir trocas gasosas. Foram realizadas cinco réplicas por tratamento mais uma réplica sem animal. Decorrido 28 dias os testes foram desmontados; o solo de cada réplica foi despejado em outro recipiente onde foi adicionado água e tinta nanquim azul para aumentar o contraste e assim facilitar a contagem dos juvenis. Cada réplica foi fotografada para posteriormente contagem no programa Image J. O registro das contagens dos animais foi analisado estatisticamente.

2.6 Análises estatísticas

Para os testes de fuga, os resultados obtidos foram avaliados pelo Exato de Fisher (disponível no site <http://www.langsrud.com/fisher.htm>), sendo que $p < 0,05$ representa a ocorrência de fuga. Os gráficos da porcentagem de fuga apresentados foram plotados com auxílio do programa Sigma Plot 13.

Os resultados referentes às avaliações de reprodução passaram pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk e pelo teste de homogeneidade de variâncias de Brown-Forsythe. Posteriormente, os dados obtidos, para as diferentes concentrações de cada tratamento (vinhaça bruta e vinhaça tratada), foram comparados estatisticamente para os

valores paramétricos pelo teste de ANOVA one way e Tukey, e para os valores não paramétricos pelo teste de Kruskal-Wallis e Dunn. Foi avaliada a interação entre os fatores tipo de vinhaça (bruta ou tratada com CaO) e concentração, com relação ao número de juvenis, pela ANOVA two way. Como os experimentos com os tipos distintos de vinhaça não foram realizados concomitantemente, os dados de reprodução de cada concentração foram divididos pela média dos seus respectivos controles, antes de passar pela análise estatística ANOVA two way, com o objetivo de se avaliar a sensibilidade dos animais e eliminar possíveis diferenças entre experimentos. Todos os testes estatísticos e a representação gráfica foram realizados no programa Sigma Plot 13.

3. Resultados

3.1 Análises químicas da vinhaça bruta

Na tabela 1 são apresentadas as análises físico-químicas e de metais da amostra de vinhaça. Os valores de DBO e DQO são considerados altos, demonstrando grande quantidade de matéria orgânica; o pH apresenta valor baixo, confirmando a acidez do resíduo e as quantidades de metais não se apresentaram significativas de acordo com a legislação que prevê as quantidades desses elementos no solo (VALORES ORIENTADORES PARA SOLO E ÁGUA SUBTERRÂNEA NO ESTADO DE SÃO PAULO, 2016).

3.2 Testes de fuga e reprodução com *F. candida*

A análise do teste de fuga demonstrou que tanto nas concentrações da vinhaça bruta quanto nas concentrações da vinhaça tratada não houve fuga dos animais no tempo avaliado, não tendo, portanto, significância estatística. No entanto, na Fig. 1A pode se observar que, de modo comparativo, não houve “preferência” dos animais expostos à vinhaça bruta na concentração C1, e que nas concentrações de C2 a C7 houve maior atração dos animais pela vinhaça bruta. Na exposição à vinhaça tratada o resultado foi bastante similar às observações feitas com a vinhaça bruta, porém não houve diferenças estatísticas (Figs. 1A; 1B).

Na análise do teste de reprodução observou-se que as diferentes concentrações de vinhaça bruta não ocasionaram diferenças significativas na reprodução dos colêmbolos (ANOVA one way, $p = 0,349$) (Fig. 2A), assim como as concentrações de

vinhaça tratada (ANOVA one way, $p = 0,737$) (Fig. 2B). A análise estatística apontou que não houve diferenças significativas na reprodução dos colêmbolos quando comparados os diferentes tipos de vinhaça utilizados (ANOVA two way, $p = 0,424$) (Fig. 3).

3.3 Testes de fuga e reprodução com *E. andrei*

No teste de fuga observou-se que nas duas maiores concentrações da vinhaça bruta (C6-40%- e C7-60%) houve fuga dos animais (Exato de Fisher, $p = 0,00011$ e $p = 2,591 \times 10^{-11}$ respectivamente), enquanto apenas na maior concentração da vinhaça tratada (C7-60%) levou a fuga das minhocas (Exato de Fisher, $p = 0,00031$) (Figs. 4A; 4B).

No teste de reprodução, as diferentes concentrações de vinhaça bruta não ocasionaram diferenças significativas na reprodução das minhocas (ANOVA one way, $p = 0,752$) (Fig. 5A), assim como as concentrações de vinhaça tratada (ANOVA one way, $p = 0,310$) (Fig. 5B). Observou-se que os diferentes tipos de vinhaça resultaram em diferenças na reprodução, independentemente da concentração (ANOVA two way; Tukey, $p = 0,013$), sendo que, no geral, o número de juvenis foi menor para vinhaça bruta em relação à vinhaça tratada (Fig. 6).

3.4 Reprodução de *E. crypticus*

No teste de reprodução dos enquitreídeos, houve diferença estatística apenas na comparação entre as concentrações C2 e C6 (5% e 40%) da vinhaça bruta (Kruskal-Wallis; Dunn, $p = 0,010$) (Fig. 7A), enquanto as diferentes concentrações de vinhaça tratada não causaram alterações no comportamento reprodutivo (ANOVA one way, $p = 0,121$) (Fig. 7B).

Os testes mostraram que não houve diferenças significativas na reprodução dos enquitreídeos quando comparados os diferentes tipos de vinhaça utilizados (ANOVA two way, $p = 0,169$) (Fig. 8).

4. Discussão

O reaproveitamento da vinhaça de cana-de-açúcar com o intuito de contribuir para sustentabilidade do setor sucroenergético é uma prática bastante difundida, no entanto, diversos cuidados são necessários, não só com o local de aplicação do resíduo

como fertilizante, mas também com a fauna existente (MORINI et al., 2017; CHRISTOFOLETTI et al., 2017).

A literatura traz informações sobre os impactos causados em diversos bioindicadores expostos a vinhaça e alertam que a utilização deste resíduo ainda requer cautela em sua disponibilização no solo devido as suas implicações ambientais, as quais têm sido motivo de preocupação, em virtude da presença de contaminantes, como por exemplo, metais, compostos alcoólicos e fenólicos, substâncias antibióticas entre outros (ALVES et al., 2015; SOUZA et al., 2017).

Nesse sentido, o presente estudo utilizou testes ecotoxicológicos estabelecidos mundialmente pela Organização Internacional para Padronização (ISO) para avaliar os efeitos da vinhaça bruta e após neutralização de seu pH, em concentrações crescentes, empregando as espécies *F. candida*, *E. andrei* e *E. crypticus* bioindicadoras padronizadas na avaliação da qualidade do solo.

O teste de fuga fornece informações sobre a capacidade dos organismos de detectar e evitar o solo, indicando o potencial de estresse de substâncias presente no mesmo. É ecologicamente relevante devido às relações diretas com a biodiversidade do solo e sua qualidade como habitat para esses organismos (HUND-RINKE; WIECHERING, 2001).

De acordo com os resultados obtidos no teste de fuga com *F. candida* pode-se perceber que ambas as vinhaças (bruta/tratada) não provocaram a fuga destes animais, pelo contrário, eles foram atraídos pelos resíduos. Natal-da-Luz et al. (2008) avaliaram a resposta de minhocas e colêmbolos diante de solos com diferentes propriedades (conteúdo/textura/matéria orgânica) e a combinação com contaminantes. Os autores demonstraram que *F. candida* apresentou comportamento de fuga em solos com baixos níveis de matéria orgânica, independente da textura do solo, e, pelo contrário houve nítida preferência desses organismos por solos com maior teor de matéria orgânica. Possivelmente, o comportamento de atração pela vinhaça, encontrado no presente trabalho, ocorreu pelo fato da vinhaça apresentar em sua constituição grande quantidade de matéria orgânica.

No teste de reprodução, *F. candida* não demonstrou sensibilidade significativa diante do contato com a vinhaça (bruta/tratada), porém, vale ressaltar que, uma observação mais detalhada dos resultados permite inferir que na vinhaça bruta os animais apresentaram um sutil aumento na taxa de reprodução em comparação à

vinhaça tratada; como os experimentos foram realizados em dias distintos foi necessário dividir o número de juvenis de cada grupo experimental pela média dos respectivos controles para se obter o gráfico de sensibilidade, o qual tem por finalidade neutralizar as possíveis diferenças entre os experimentos que foram realizados em diferentes dias, logo observou-se uma pequena diferença de reprodução entre a vinhaça bruta e tratada. Sabe-se que a vinhaça apresenta quantidades desbalanceadas de elementos minerais e orgânicos (CHRISTOFOLETTI et al., 2017), logo a grande quantidade de matéria orgânica pode significar inicialmente um atrativo para os animais. Mussury et al. (2008) também afirmaram que a quantidade de matéria orgânica presente numa dada área também pode influenciar na população destes indivíduos. Segundo Cassagne et al. (2004) e Bellini e Zeppelini (2009) fatores que podem afetar a presença de colêmbolos, em determinadas áreas, estão relacionadas ao pH, liberação de íons e umidade, aparecimento de substâncias que compõem pesticidas e/ou metais.

No teste de fuga com *E. andrei* nas concentrações maiores de vinhaça bruta, C6 e C7, houve comportamento de fuga dos animais, enquanto que, na vinhaça tratada houve fuga somente na C7. Isso demonstra que a vinhaça tratada não foi nociva para as minhocas, porém, quando a concentração do resíduo excedeu ao limite suportado por elas, também houve fuga. O teste de reprodução mostrou que esses animais responderam de forma distinta aos tratamentos com as vinhaças, bruta e tratada, e que, de certo modo, houve um efeito positivo, da vinhaça tratada em relação à bruta, no comportamento reprodutivo destes animais.

Natal-da-Luz et al. (2008) verificaram que, em geral, a espécie *F. candida* parece ser menos sensível do que as minhocas quando expostos à solos com diferentes teores de matéria orgânica. Supondo que a matéria orgânica presente na vinhaça tenha sido atrativa para os colêmbolos, o mesmo não foi observado no presente estudo, pois, comparativamente, os colêmbolos foram mais atraídos pela vinhaça (bruta/tratada) em relação às com as minhocas.

A vinhaça com pH neutro representou-se mais atrativa para as minhocas, as quais só apresentaram comportamento de fuga na concentração mais elevada. Supostamente deve haver um limite ao qual elas suportam a mistura complexa que a vinhaça apresenta em associação com o fator pH. Pode-se inferir também que as minhocas sejam mais sensíveis, devido ao fato de apresentarem diferentes vias de

exposição, ou seja, uma cutícula exposta ao contaminante presente no solo, e a ingestão do mesmo.

O teste de reprodução com *E. crypticus* demonstrou sensibilidade em concentrações específicas para a vinhaça bruta, enquanto a vinhaça tratada não interferiu no comportamento reprodutivo destes animais. Foi possível perceber que houve aumento, bem como diminuição no número de indivíduos, e que a vinhaça tratada demonstrou aumento no número de juvenis em comparação à vinhaça bruta.

Alves et al. (2015) expuseram as espécies *Hypoaspis aculeifer*, *E. andrei*, *E. crypticus* e *F. candida* a três tipos de vinhaça, sendo duas provenientes de destilarias diferentes e uma produzida em laboratório e testaram a disposição das mesmas em diferentes tipos de solos; os autores observaram que as vinhaças das usinas foram mais tóxicas do que a vinhaça preparada em laboratório, independente do solo utilizado. Corroborando ao encontrado no presente estudo, em solo artificial os autores observaram que as minhocas apresentaram maiores índices de fuga comparados aos colêmbolos. Enquanto que, de um modo geral, nos testes de reprodução tanto as minhocas, quanto os enquitreídeos e os colêmbolos apresentaram reprodução reduzida na exposição às vinhaças das diferentes usinas em todos os solos testados, diferentemente do observado no presente trabalho.

Alves et al. (2015) chamaram a atenção para as diferenças de toxicidade entre vinhaças, as quais são atribuídas, principalmente, às distintas composições e à origem dos efluentes; as diferentes toxicidades observadas entre as vinhaças empregadas pelos autores provavelmente são devidas às distintas composições dos vinhos produzidos nas destilarias que, por sua vez, dependem da origem e composição da matéria-prima. Além disso, o sistema usado no preparo do mosto, método de fermentação, tipo de aparelho destilatório, técnica de destilação, entre outros, são fatores que tornam a composição das vinhaças das usinas destilatórias diferentes entre si e tudo isso pode influenciar de diferentes maneiras os animais.

Somado às características da vinhaça, as características dos animais a ela expostos, importantes fatores devem ser considerados. Minhocas apresentam diferentes vias de absorção do solo, podendo ser por meio da absorção pela cutícula ou pela ingestão (HUND-RINKE et al., 2003), enquanto que os colêmbolos apresentam um exoesqueleto resistente e absorvem os contaminantes da solução do solo por meio de órgãos especializados (PEIJNENBURG et al., 2012). Os enquitreídeos, assim como as

minhocas, de um modo geral interagem diretamente com as partículas e soluções do solo, que em contato com seu corpo mole e permeável, fazem desse grupo representantes sensíveis da contaminação do ambiente do solo (OWOJORI et al., 2009). Além disso, os enquitreídeos são altamente sensíveis à acidez dos solos, em alguns casos, a toxicidade para estes organismos pode ser mais influenciada pelos baixos valores de pH do solo do que pelas altas concentrações dos contaminantes (AMORIM et al., 2005; CHELINHO et al., 2014; LUO; VERWEIJ; VAN GESTEL, 2014).

De um modo geral, tanto a vinhaça bruta, quanto a vinhaça tratada apresentaram variadas respostas dos bioindicadores, pois concentrações específicas promoveram diferentes reações de acordo com a sensibilidade de cada uma das espécies utilizadas. Há que se considerar que inúmeros fatores podem influenciar o comportamento dos animais, como por exemplo, a origem da vinhaça e suas características físico-químicas, bem como a interação da mesma com as características e propriedades do solo. Sendo assim, de um modo geral, observou-se que as espécies *E. crypticus* e *F. candida* não tiveram seus comportamentos influenciados, nem pela vinhaça bruta, nem pela vinhaça tratada, mas a espécie *E. andrei* apresentou-se mais sensível a presença da vinhaça no solo demonstrando comportamento de fuga em concentrações mais elevadas de vinhaça bruta e, no teste de reprodução, respondeu a exposição à vinhaça tratada, com aumento no número de juvenis em relação a vinhaça bruta

5. Conclusão

Face ao exposto é possível concluir que a neutralização do pH da vinhaça, refletiu em comportamentos distintos entre as espécies bioindicadoras utilizadas. Enquanto as espécies *E. crypticus* e *F. candida* foram menos sensíveis à exposição à vinhaça, tanto bruta, quanto tratada, a espécie *E. andrei* demonstrou, tanto no comportamento de fuga, quanto no de reprodução uma maior influência de ambas as vinhaça. Deste modo, os resultados positivos encontrados, sutis e pontuais, necessitam de maiores investigações.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES, ao PDSE pelo apoio financeiro e ao Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra, PT pela oportunidade de realização dos experimentos.

7. Referências

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

AMORIM, M. J. B.; ROMBKE, J.; SCHEFFCZYK, A.; SOARES, A. M. V. M. Effect of different soil types on the enchytraeids *Enchytraeus albidus* and *Enchytraeus luxuriosus* using the herbicide Phenmedipham. **Chemosphere**, v.61, p.1102-1114, 2005.

ANDRÉA, M. M. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. **Acta Zoológica Mexicana**, n 2, p. 95-107, 2010.

BARETTA, D.; FERREIRA, C. S.; SOUSA, J. P.; CARDOSO, E. J. B. N. Colêmbolos (Hexapoda: Collembola) como bioindicadores de qualidade do solo em áreas com *Araucaria angustifolia*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p. 2693-2699, 2008,

BARROS, R. P.; VIÉGAS, P. R. A.; SILVA, T. L.; SOUZA, R. M.; BARBOSA, L.; VIÉGAS, R. A.; BARRETO, M. C. V.; MELO, A. S. Alterações em atributos químicos de solo cultivado com cana-de-açúcar e adição de vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 3, p. 341-346, 2010.

BEBÉ, F. V.; ROLIM, M. M.; PEDROSA, E. M. R.; SILVA, G. B.; OLIVEIRA, V. S. Avaliação de solos sob diferentes períodos de aplicação com vinhaça. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 6, p. 781-787, 2009.

BELLINI, B. C.; ZEPPELINI, D. Registro da fauna de Collembola (Arthropoda, Hexapoda) no Estado da Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 3, p. 386-390, 2009.

BIANCHI, M. O. **A importância de estudos ecotoxicológicos com invertebrados do solo**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, (Embrapa Agrobiologia. Série Documentos, 266), 32p, 2010.

BROWN, G. G.; DOMÍNGUEZ, J. Uso das minhocas como bioindicadoras ambientais: princípios e práticas – o 3º encontro latino americano de ecologia e taxonomia de oligoquetas (elaetao3). **Acta Zoológica Mexicana**, p. 18, 2010.

CANTELLI, K et al. Efeito do tebuconazol no comportamento de fuga de *Eisenia andrei* em ensaio de laboratório com solo natural. In: XXIX REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS.; XIII REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS.; XI SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO.; VIII REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 2010, Guarapari, ES. **Anais: Fontes de nutrientes e produção agrícola: modelando o futuro**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2010.

CASSAGNE, N.; BAL-SERIN, M. C.; GERS, C.; GAUQUELIN, T. Changes in humus properties and collembolan communities following the replanting of beech forests with spruce. **Pedobiologia**, v. 48, p. 267-276, 2004.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – **Norma Técnica P4.231: Vinhaça: Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola**, 3ed, 2ª versão, pp15, 2015.

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

CHRISTOFOLETTI, C. A.; MOREIRA-DE-SOUSA, C.; SOUZA, R. B.; FRANCISCO, A.; GASTALDI, V. D. O emprego de diferentes resíduos utilizados como fertilizantes na cultura de cana-de-açúcar. . In: FONTANETTI, C.S.; BUENO,

O.C. (Org.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. 1ed. Bauru, SP: Canal 6, v. 1, p. 63-86, 2017.

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

CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C.S. Assessment of the Genotoxicity of Two Agricultural Residues After Processing by Diplopods Using the *Allium cepa* Assay. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 224, p. 1523, 2013b.

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

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

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

CROMMENTUIJN, T.; BRILS, J.; VAN STRAALLEN, N. M. Influence of cadmium on life-history characteristics of *Folsomia candida* (Willem). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 26, p. 216-227, 1993.

DÖLL, M. M. R.; FORESTI, E. Efeito do bicarbonato de sódio no tratamento de vinhaça em AnSBBR operado a 55 e 35°C. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 15, n. 3, p. 275-282, 2010.

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

FEIGIN, A.; RAVINA, I.; SHALHEVET, J. **Irrigation with treated sewage effluent: management for environmental protection**. Berlin: Springer-Verlag, pp. 224, 1991.

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

FOUNTAIN, M.T.; HOPKIN, S.P. *Folsomia candida* (Collembola): A “Standard” Soil Arthropod. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 201–222, 2005.

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

GREENSLADE, P.; VAUGHAN, G. A comparison of Collembola species for toxicity testing of Australian soils. **Pedobiologia**, v. 47, p. 171–179, 2003.

GUARATIN, T. et al. Ecotoxicologia. In: OGA,S.; CAMARGO, M. M.A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008. p.125 -142.

HUND-RINKE, K.; ACHAZI, R.; RÖMBKE, J.; WARNECKE, D. Avoidance Test with *Eisenia fetida* as Indicator for the Habitat Function of Soils: Results of a Laboratory Comparison Test. **Journal of Soils and Sediments**, v. 3, p. 7-12, 2003.

HUND-RINKE, K.; WIECHERING, H. Earthworm avoidance test for soil assessment. **Journal of Soils and Sediments**, v. 1, p. 15–20, 2001.

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

ISO- International Organization for Standardization. **(ISO 17512-1:2008) Soil Quality: Avoidance Test for Determining the Quality of Soils and Effects of Chemicals on Behavior. Part 1: Test with Earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*)**. ISO, Geneva (ISO 17512 1), 2008.

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

ISO- International Organization for Standardization. **(ISO 11268-2:2011) Soil quality- Effects of pollutants on earthworms — Part 2: Determination of effects on reproduction to *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei***. ISO, Geneva (ISO 11268 2), 2011.

ISO- International Organization for Standardization. **(ISO 16387:2013) Soil quality: effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.)-determination of effects on reproduction and survival**. ISO, Geneva (ISO 16387), 2013.

KHALIL, M. A.; ABDEL-LATEIF, H. M.; BAYOUMI, B.M.; VAN STRAALLEN, N. M.; VAN GESTEL, C.A.M. Effects of metals and metal mixtures on survival and cocoon production of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. **Pedobiologia**, v. 40, p. 548-556, 1996.

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.

LUO, W.; VERWEIJ, R. A.; VAN GESTEL, C. A. M. Assessment of the bioavailability and toxicity of lead polluted soils using a combination of chemical approaches and bioassays with the collembolan *Folsomia candida*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 280, p.524-530, 2014.

LYRA, M. R. C. C. **Estudo comparativo da aplicação da vinhaça tratada e in natura em solos sob o cultivo de cana-de-açúcar**. 140p. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Departamento de Engenharia Civil, Recife, PE, 140p, 2008.

MABOETA, M.; FOUCHÉ, T. Utilizing an Earthworm Bioassay (*Eisenia andrei*) to Assess a South African Soil Screening Value with Regards to Effects from a Copper Manufacturing Industry. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, n. 3, p. 322-326, 2014.

MACHADO, H. M. **Efeitos da aplicação de resíduos da perfuração de poço de petróleo no solo, no desenvolvimento de plantas de arroz e no comportamento de *Eisenia andrei***. 2012. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Ciência do Solo, RJ, 2012.

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

MEDEIROS, S. C. L.; RIBEIRO, S. R.; CONEGLIAN, C. M. R.; BARROS, R. M.; BRITO, N. N.; DRAGONI SOBRINHO, G.; TONSO, S.; PELEGRINI, R. Impactos da

agroindústria canavieira sobre o meio ambiente. **In: Fórum de Estudos Contábeis**, 3, 2003, Rio Claro, Anais. Rio Claro: UNICAMP, 2003.

MORINI, M. S. C.; SILVA, O. G. M.; ZAMBON, V.; NOCELLI, R. N. F. Cultura de cana-de-açúcar no brasil: manejo, impactos econômicos, sociais e ambientais. . In: FONTANETTI, C.S.; BUENO, O.C. (Org.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. 1ed. Bauru, SP: Canal 6, v. 1, p. 31-50, 2017.

MUSSURY, R. M.; SCALON, S. P. Q.; GOMES, A. A.; BATISTA, M. R.; SCALON FILHO, H. Flutuação populacional da mesofauna em fragmentos de mata na região de Dourados, MS. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 645-650, 2008.

NATAL-DA-LUZ, T.; AMORIM, M. J. B.; RÖMBKE, J.; PAULO SOUSA, J. Avoidance tests with earthworms and springtails: Defining the minimum exposure time to observe a significant response. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 2, p. 545-551, 2008.

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

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). Guideline for Testing of Chemicals No. 207: Earthworm Acute Toxicity Test. Paris, 9p, 1984.

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). **Guideline for the testing of chemicals: earthworm reproduction test**, 2004.

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). **Guidelines for the testing of chemicals. Test n. 220: Enchytraeid reproduction test**, 2004.

OWOJORI, O. J.; REINECKE, A. J.; ROZANOV, A. B. The combined stress effects of salinity and copper on the earthworm *Eisenia fetida*. **Applied Soil Ecology**, v. 41, p. 277-285, 2009.

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

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

PEIJNENBURG, W.; CAPRI, E.; KULA, C.; LIESS, M.; LUTTIK, R.; MONTFORTS, M.; NIENSTEDT, K.; RÖMBKE, J.; SOUSA, J.P.; JENSEN, J. Evaluation of exposure metrics for effect assessment of soil invertebrates. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 42, p. 1862-1893, 2012.

PHILLIPS, D. R.; BOLGER, T. Sublethal toxic effects of aluminium on the earthworm *Eisenia fetida*, **Pedobiologia**, v. 42, p. 125–130, 1998.

SIEKIERSKA, E; URBANSKA-JASIK, D. Cadmium effect on the ovarian structure in earthworm *Dendrobaena veneta* (Rosa). **Environmental Pollution**, v. 120, p. 289-297, 2002.

SOUZA, R. B., MOREIRA-DE-SOUSA, C.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; SOUZA, C. P.; FONTANETTI, C. S. Impacto de resíduos (vinhaça e biossólido) lançados no cultivo de cana-de-açúcar em representantes da fauna edáfica. In: FONTANETTI, C.S.; BUENO, O.C. (Org.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. 1ed. Bauru, SP: Canal 6, v. 1, p. 197-214, 2017.

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

Tabela 1: Análises físico-químicas e de metais da vinhaça bruta.

Parâmetro	Vinhaça (mg/L)	VPM	Método
Arsênio	<0,005	NA	USEPA 7062
Bário	0,201	NA	SMEWW 3030E
Cádmio	<0,001	NA	SMEWW 3030E
Cálcio	992	NA	SMEWW 3030E
	(Diluição: 50)		
Carbono orgânico total ²	7820	NA	SMEWW 5310B
Chumbo	<0,005	NA	SMEWW 3030E
Cobre	0,119	NA	SMEWW 3030E
Alumínio ³ /Alumínio	2,18	NA	SMEWW 3030E
Ferro	6,33	NA	SMEWW 3030E
Manganês	3,357	NA	SMEWW 3030E
	(Diluição: 10)		
Condutividade eletrolítica	10740	NA	SMEWW 2510B
(µs/cm)			
Cromo	0,025	NA	SMEWW 3030E
Cloreto	1443	250	USEPA 300.1
	(Diluição: 100)		
Enxofre total	-	NA	-
Fósforo total	49,3	NA	USEPA 300.1
	(Diluição: 50)		
Magnésio	307	NA	SMEWW 3030E
	(Diluição: 10)		
Mercurio	<0,0002	NA	USEPA 7470
Molibdênio	0,010	NA	SMEWW 3030E
Níquel	0,024	NA	SMEWW 3030E
Nitrogênio nítrico	<11,400 (Diluição: 100)	NA	USEPA 300.1
Nitrogênio nitroso	<0,300	NA	USEPA 300.1
	(Diluição: 100)		
Nitrogênio amoniacal	10,77	NA	SMEWW 4500-NH3D
	(Diluição: 10)		
Nitrogênio kjedahl	278,9	NA	SMEWW 4500-NorgB
pH	4,23	NA	USEPA 9045
Potássio	3210	NA	SMEWW 3030E
	(Diluição: 50)		
Selênio	<0,005	NA	SMEWW 3030E
Sódio total	12,4	NA	SMEWW 3030E
Conteúdo sólido	3860	NA	SMEWW 2540D
Umidade	-	NA	-
Zinco	0,754	NA	SMEWW 3030E
Prata	<0,005	0,01	SMEWW 3030E
Dureza calculada	1457,0	NA	SMEWW 2340B
DBO	16586	NA	SMEWW 5210B
(incubação de 5 dias)			
DQO	31257	NA	SMEWW 5220D
(Diluição: 50)			

VMP: valor máximo permitido, segundo a CETESB (195/2005-E); **SMEWW:** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22th Edition, 2012; **USEPA:** United States Environmental Protection Agency; **NA:** não aplicável.

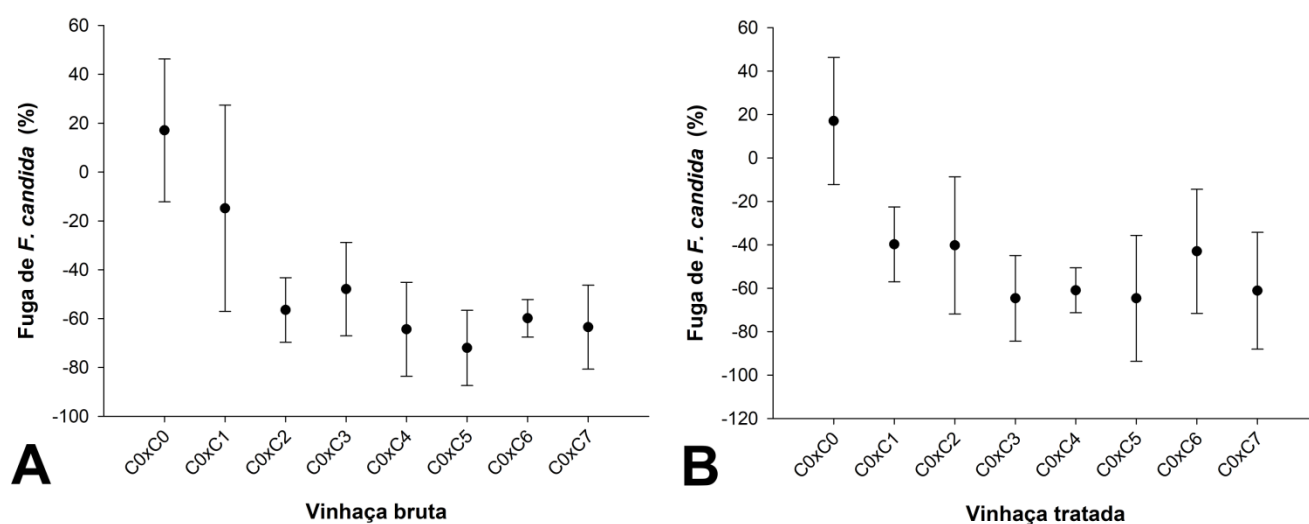


Figura 1: Teste de fuga de *F. candida*. **A.** Exposição à vinhaça bruta; **B.** Exposição à vinhaça tratada.

C0: solo controle; C1 - Solo com 1% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C2 – Solo com 5% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C3 - Solo com 10% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C4 - Solo com 20% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C5 - Solo com 30% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C6 - Solo com 40% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C7- Solo com 60% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada.

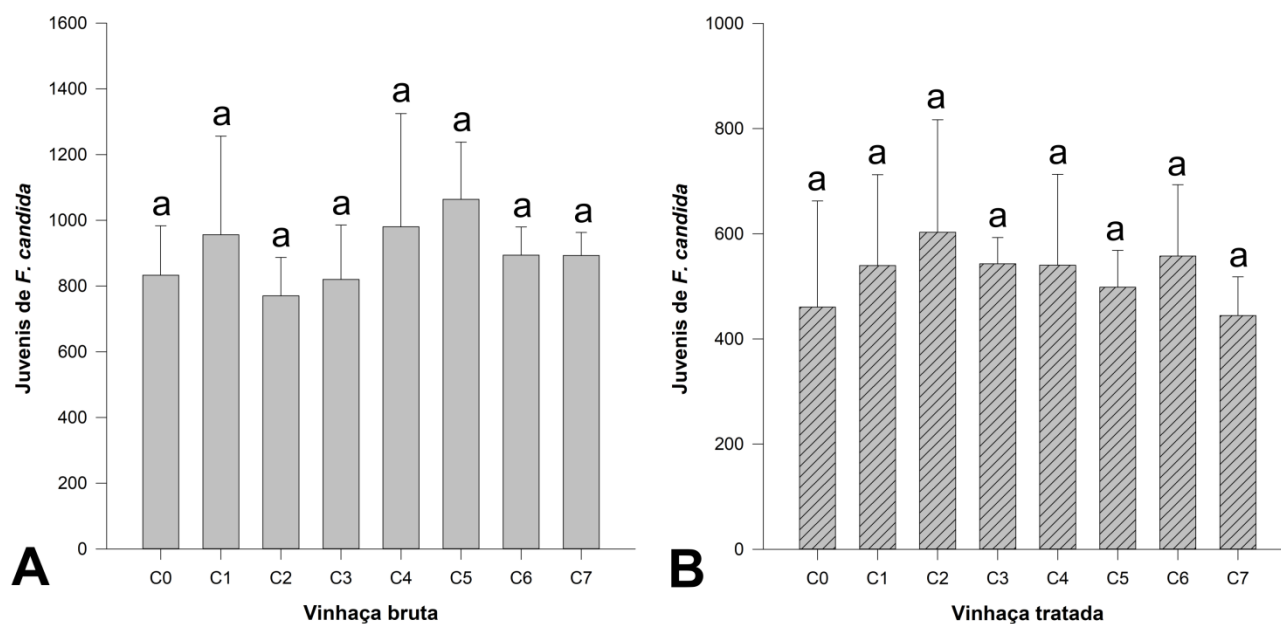


Figura 2: Reprodução de *F. candida*. **A.** Exposição à vinhaça bruta; **B.** Exposição à vinhaça tratada.

As letras minúsculas e iguais no topo das barras indicam ausência de significância estatística ($p > 0,05$).

C0: solo controle; C1 - Solo com 1% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C2 – Solo com 5% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C3 - Solo com 10% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C4 - Solo com 20% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C5 - Solo com 30% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C6 - Solo com 40% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C7- Solo com 60% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada.

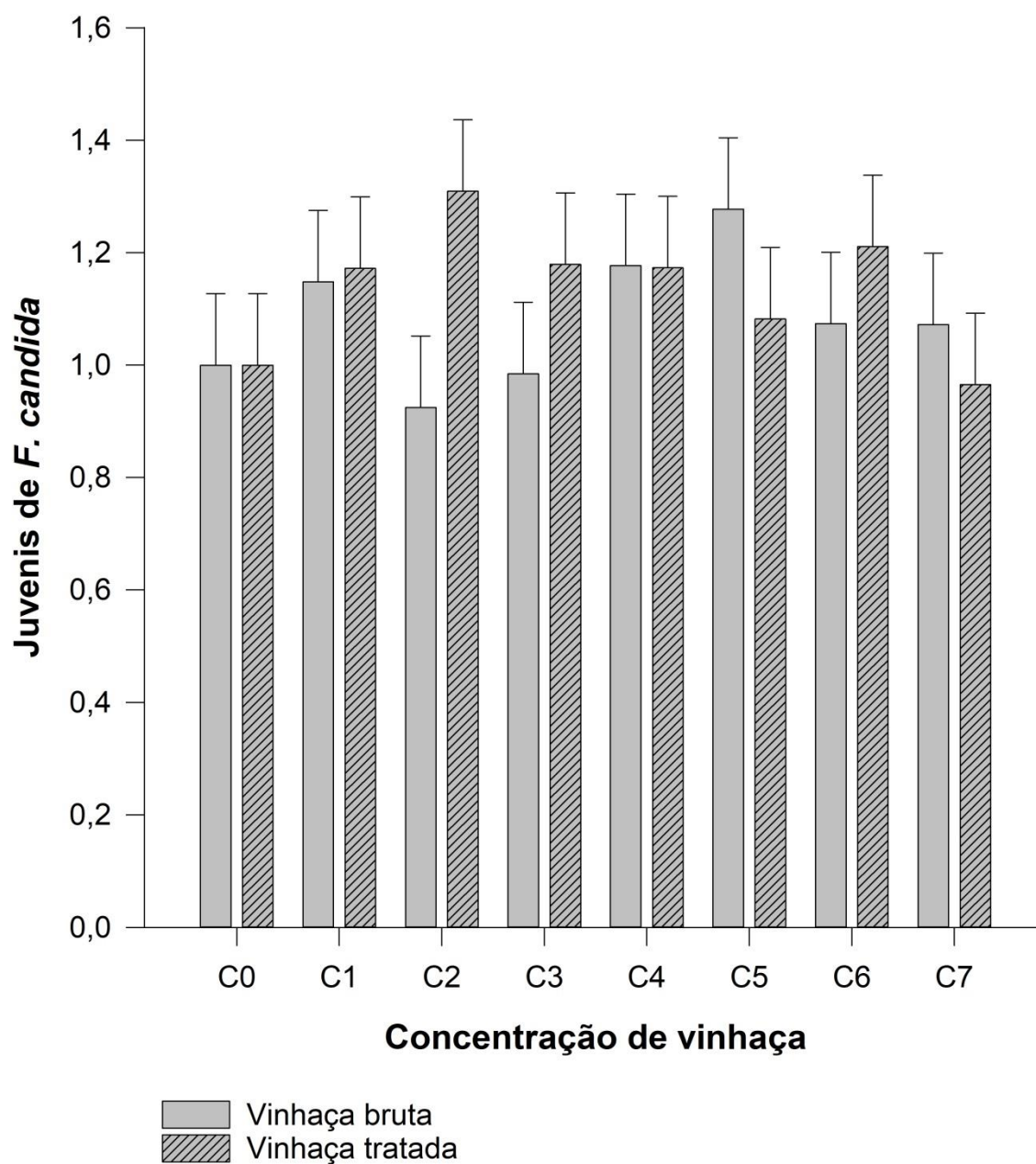


Figura 3: Reprodução de *F. candida* mostrando a sensibilidade dos animais aos diferentes tipos de vinhaça.

C0: solo controle; C1 - Solo com 1% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C2 – Solo com 5% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C3 - Solo com 10% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C4 - Solo com 20% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C5 - Solo com 30% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C6 - Solo com 40% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C7- Solo com 60% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada.

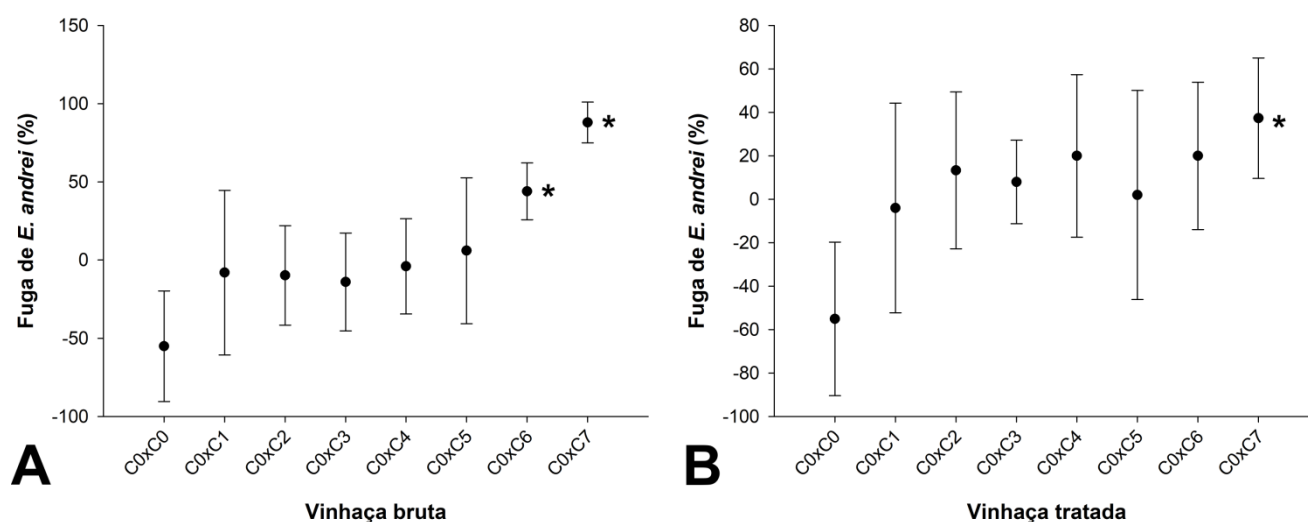


Figura 4: Teste de fuga de *E. andrei*. Os asteriscos representam a ocorrência de significância estatística ($p < 0,05$). **A.** Exposição à vinhaça bruta; **B.** Exposição à vinhaça tratada.

C0: solo controle; C1 - Solo com 1% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C2 – Solo com 5% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C3 - Solo com 10% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C4 - Solo com 20% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C5 - Solo com 30% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C6 - Solo com 40% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C7- Solo com 60% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada.

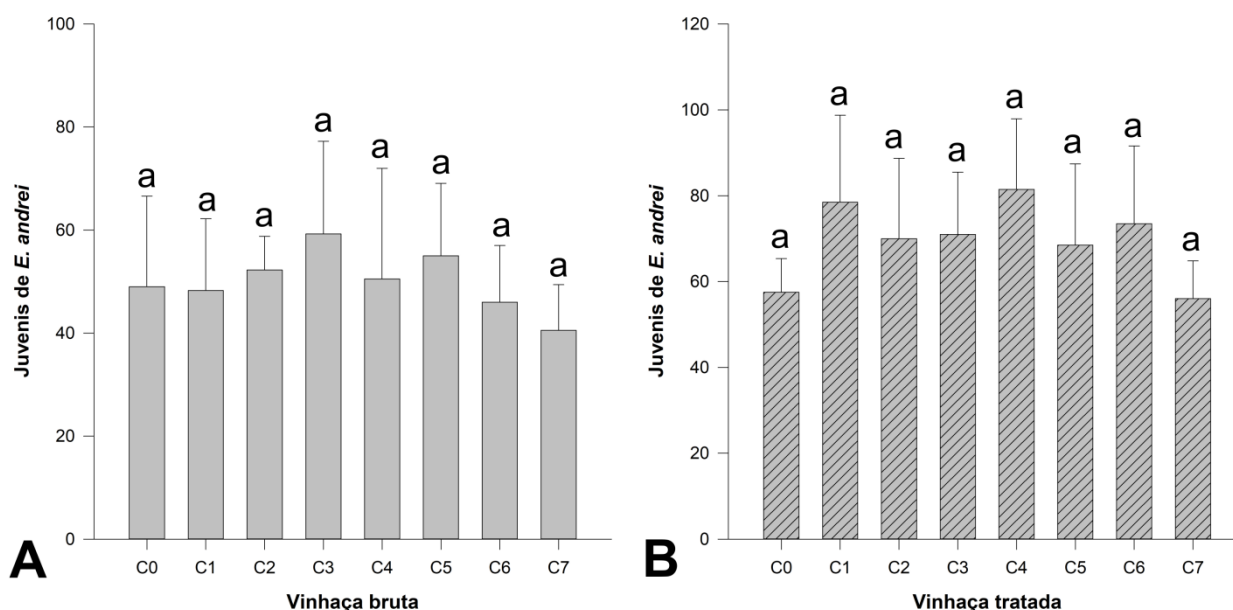


Figura 5: Reprodução de *E. andrei*. **A.** Exposição à vinhaça bruta; **B.** exposição à vinhaça tratada.

As letras minúsculas e iguais no topo das barras indicam ausência de significância estatística ANOVA one way/TUKEY ($p > 0,05$).

C0: solo controle; C1 - Solo com 1% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C2 – Solo com 5% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C3 - Solo com 10% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C4 - Solo com 20% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C5 - Solo com 30% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C6 - Solo com 40% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C7- Solo com 60% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada.

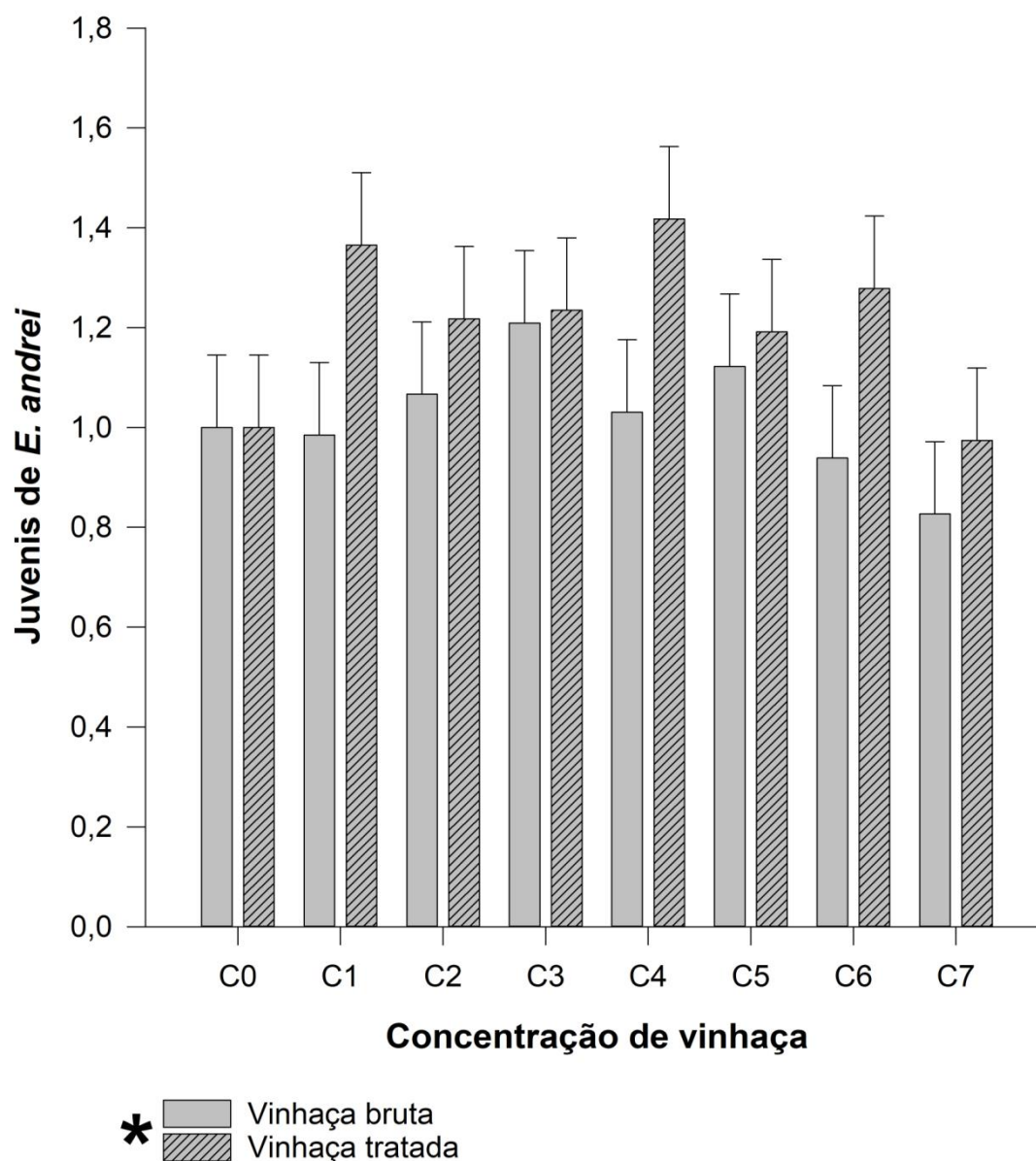


Figura 6: Reprodução de *E. andrei* mostrando a sensibilidade dos animais aos diferentes tipos de vinhaça.

O asterisco representa que houve diferença estatística entre os tipos de vinhaça, independente da concentração ($p < 0,05$).

C0: solo controle; C1 - Solo com 1% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C2 – Solo com 5% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C3 - Solo com 10% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C4 - Solo com 20% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C5 - Solo com 30% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C6 - Solo com 40% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C7- Solo com 60% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada.

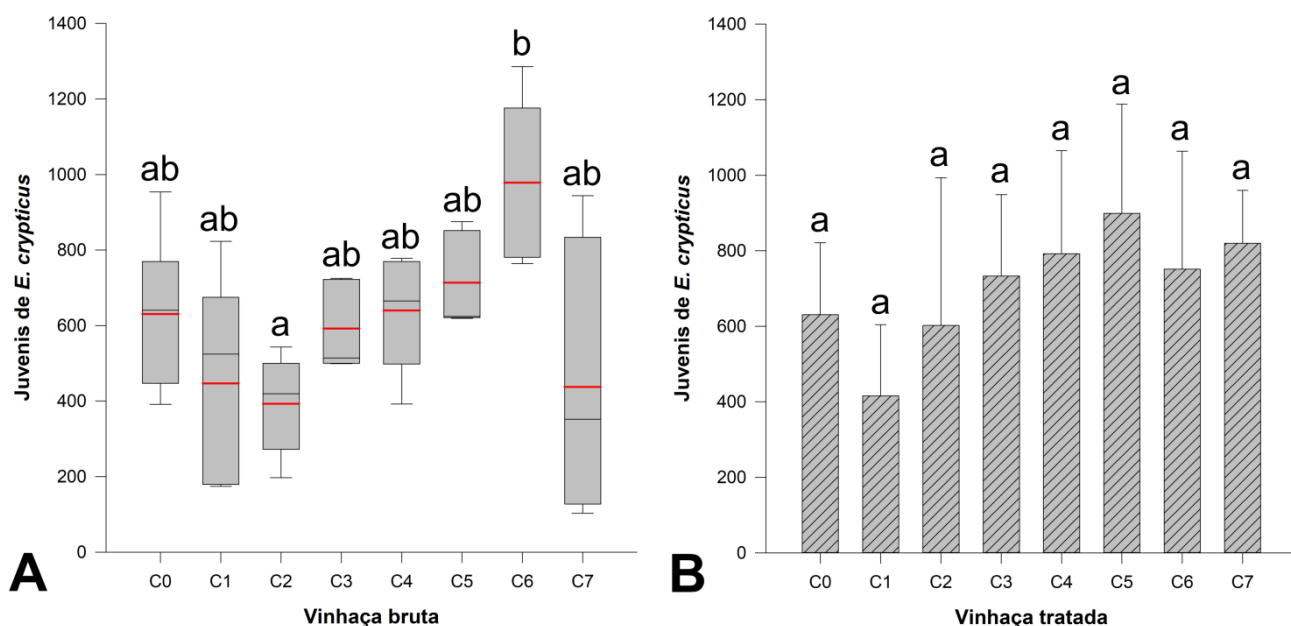


Figura 7: Reprodução de *E. crypticus*. A. Exposição à vinhaça bruta; B. Exposição à vinhaça tratada.

As letras minúsculas no topo dos box plots ou das barras representam os resultados estatísticos, sendo que letras diferentes indicam significância ($p < 0,05$).

C0: solo controle; C1 - Solo com 1% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C2 – Solo com 5% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C3 - Solo com 10% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C4 - Solo com 20% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C5 - Solo com 30% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C6 - Solo com 40% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C7- Solo com 60% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada.

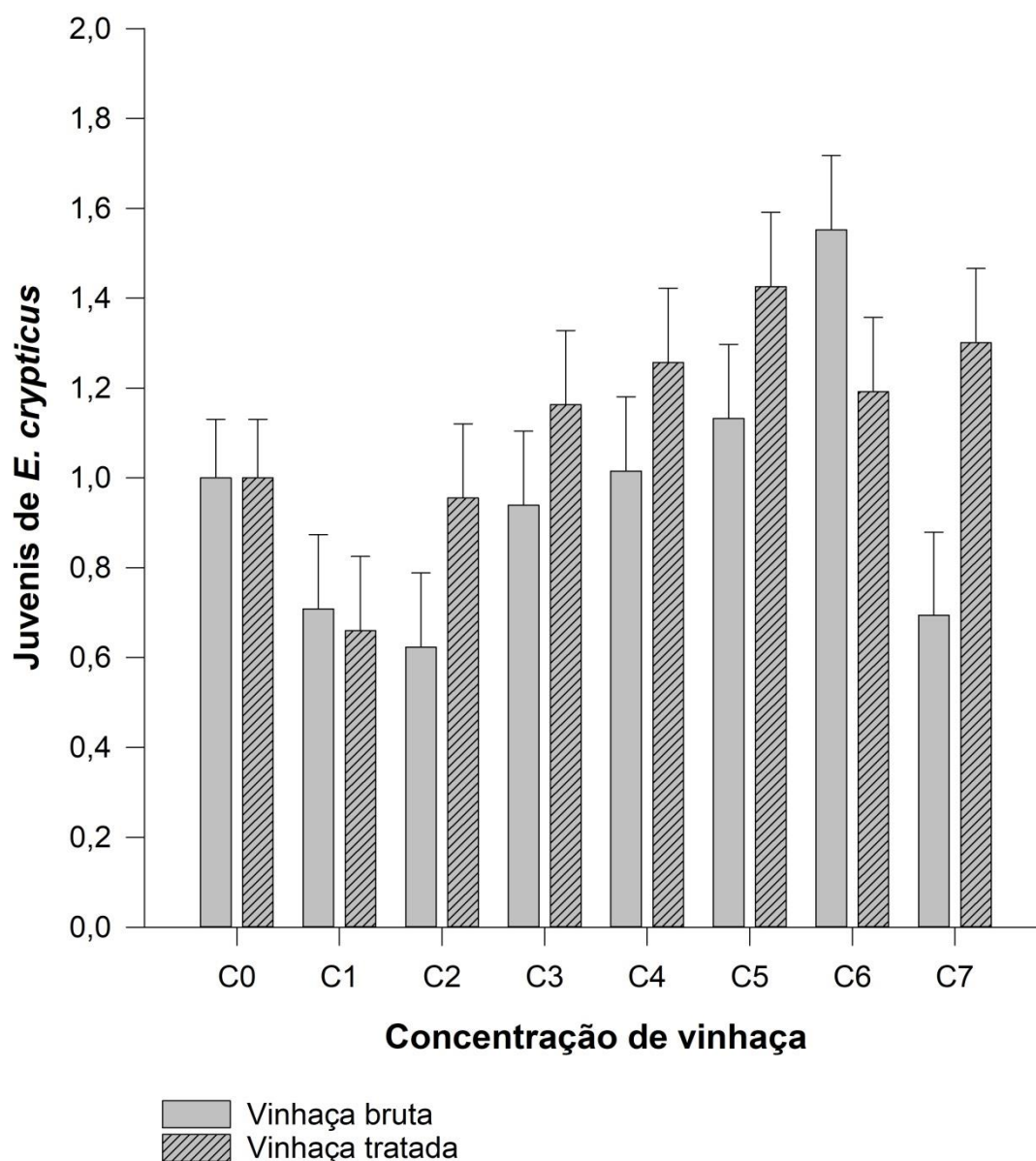


Figura 8: Reprodução de *E. crypticus* mostrando a sensibilidade dos animais aos diferentes tipos de vinhaça.

C0: solo controle; C1 - Solo com 1% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C2 – Solo com 5% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C3 - Solo com 10% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C4 - Solo com 20% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C5 - Solo com 30% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C6 - Solo com 40% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada; C7- Solo com 60% concentração de vinhaça bruta ou vinhaça tratada.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da extensa prática de fertirrigação com a vinhaça de cana-de-açúcar e seus diversos impactos no meio ambiente, a preocupação de pesquisadores com o rumo que esta situação pode tomar ainda persiste. O presente trabalho trouxe uma proposta de tratamento para vinhaça, neutralizando seu pH, e observando como organismos bioindicadores de solo reagiriam diante dessa alteração do resíduo. As conclusões foram:

- Por meio das análises ultraestruturais do intestino médio dos diplópodos expostos à vinhaça bruta e tratada, em concentração estabelecida por lei e também ao dobro dessa concentração, pode-se observar que a vinhaça bruta, em ambas as concentrações, provocou alterações celulares consideráveis, sendo algumas delas irreversíveis e estatisticamente significativas. A exposição à vinhaça tratada não alterou a morfologia celular, sendo o observado muito próximo dos animais pertencentes ao grupo controle. Estes resultados atestaram que a neutralização do pH da vinhaça foi uma alternativa viável na diminuição de sua toxicidade.

- As análises de imunomarcção da proteína de estresse celular HSP70 e a marcação de morte celular pelo método de TUNEL demonstraram que a proteína de estresse apresentou maiores imunomarcações nos tecidos expostos à vinhaça bruta, tanto na concentração estabelecida por lei quanto ao dobro dessa concentração quando comparado ao controle, na medida em que os processos de morte celular também ocorreram com maiores frequências nestas mesmas exposições. Na vinhaça tratada as imunomarcações de HSP70 apresentaram-se com menor frequência e intensidade quando comparadas às observadas na exposição à vinhaça bruta (nas duas concentrações) e ao grupo controle. Do mesmo modo as marcações de morte celular foram menos frequentes nos grupos expostos à vinhaça tratada em ambas as concentrações. Embora estes resultados não tenham tido relevância estatística, possibilitaram inferir que o tratamento da vinhaça representou menores danos celulares para os animais expostos e ainda demonstrou uma interação do processo de estresse celular com as vias de morte celular.

- Por meio dos testes ecotoxicológicos de fuga e reprodução os bioindicadores da espécie *E. crypticus* e *F. candida*, de um modo geral, não se apresentaram influenciados pela presença da vinhaça no solo, tanto a bruta, quanto a tratada em diferentes

concentrações, porém a espécie *E. andrei* apresentou comportamento de fuga na presença de concentrações mais elevadas de vinhaça bruta e, no teste de reprodução apresentou maior número de juvenis na exposição à vinhaça tratada em relação à vinhaça bruta. Apesar das análises estatísticas não terem sido significativas em alguns dos tratamentos e testes, alterações sutis puderam ser observadas nos comportamentos dos animais.

- A utilização de diferentes bioindicadores permitiu uma visão mais ampla e ao mesmo tempo precisa do quanto a vinhaça de cana-de-açúcar, bruta e com pH neutro poderia influenciar estes animais nas diferentes camadas de solo. O uso de diferentes técnicas associadas ao uso dos bioindicadores enriqueceu os resultados obtidos.

- É importante ressaltar que, embora os resultados sinalizem que a neutralização do pH confere uma melhora na vinhaça, isto é, uma diminuição em seu potencial tóxico, o uso de cal nos solos (produto usado no presente estudo para alcance de pH neutro) merece cuidado, uma vez que a alta carga orgânica da vinhaça associada a esse composto pode provocar salinização.

7. REFERÊNCIAS

ALFARO-SOTO, M.; BASSO, J. B.; KLANG, C. H. Impacto da fertirrigação da cana-de-açúcar por vinhaça nas propriedades físicas, químicas e hidráulicas do solo. In: FONTANETTI, C.S.; BUENO, O.C. (Org.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. 1ed. Bauru, SP: Canal 6, v. 1, p. 103-124, 2017.

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

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

ANDRÉA, M. M. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. **Acta Zoológica Mexicana**, n. 2, p. 95-107, 2010.

ARAUJO, G. J. F.; OLIVEIRA, S. V. W. B. Vinhaça - conceito, desafios e oportunidades: uma revisão bibliográfica. In: **XXIII Simpósio de Engenharia de Produção, Gestão de Operações em Serviços e seus Impactos Sociais**, Bauru, SP, p. 1-14, 2016.

ARBOIT, J. P. C.; CARVALHO, C. A.; GABRIEL, G. E. M.; KERKHOFF, J. T.; CLASEN, B. Respostas ecotoxicológicas de *Eisenia andrei* expostas ao cobre. In: XXIV Seminário de Iniciação Científica, Salão do Conhecimento, 2016. Disponível em: <https://publicacoeseventos.unijui.edu.br/index.php/salaconhecimento/article/view/6358> Acessado em 15 de Maio de 2018.

BAGLIANO, R. V. Principais organismos utilizados como bioindicadores relatados com uso de avaliadores de danos ambientais. **Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 2, n. 1, p. 24-40, 2012.

BARRETA, D.; FERREIRA, C. S.; SOUSA, J. P.; CARDOSO, E. J. B. Colêmbolos (Hexapoda: Collembola) como bioindicadores de qualidade de solo em áreas com *Araucaria angustifolia*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 2693-2699, 2008.

BARROS, R. P.; VIÉGAS, P. R. A.; SILVA, T. L.; SOUZA, R. M.; BARBOSA, L.; VIÉGAS, R. A.; BARRETO, M. C. V.; MELO, A. S. Alterações em atributos químicos de solo cultivado com cana-de-açúcar e adição de vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 3, p. 341-346, 2010.

BEBÉ, F. V.; ROLIM, M. M.; PEDROSA, E. M. R.; SILVA, G. B.; OLIVEIRA, V. S. Avaliação de solos sob diferentes períodos de aplicação com vinhaça. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 6, p. 781-787, 2009.

BEN-SASSON, S. A.; SHERMAN, Y.; GAVRIELI, Y. Chapter 2 – Identification of dying cells – in situ staining. In: SCHWARTZ, L. M.; OSBORNE, B. A. **Methods in Cell Biology**. v. 46, Academic Press, p. 29-39, 1995.

BOARU DA, DRAGOȘ N, WELKER M, BAUER A, NICOARA A, SCHRIMER K (2006b). Toxic potential of microcystin-containing cyanobacterial extracts from three Romanian freshwaters. **Toxicon**, 47: 925-932

BOT, A.; BENITES, J. The importance of soil organic matter key to drought-resistant soil and sustained crop production. Food and Agriculture Organization of the United Nations - **FAO Soils Bulletin**. pp. 80, 2005.

BOTHA N, GEHRINGER MM, DOWNING TG, VAN DE VENTER M, SHEPHARD EG (2004). The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells. **Toxicon**, 43: 85-92

BROWN, G. G.; DOMÍNGUEZ, J. Uso das minhocas como bioindicadoras ambientais: princípios e práticas – O 3º Encontro Latino Americano de Ecologia e Taxonomia de Oligoquetas (ELAETAO3). **Acta Zoológica Mexicana**, n. 2, p. 1-18, 2010.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. Invertebrados. Segunda edição. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. pp. 968, 2007.

BUENO-VILLEGAS, J.; SIERWALD, P.; BOND, J. E. Diplopoda. IN: Bousquets, J. L., J. J. Morrone, O.Y. Ordóñez & I.V. Fernández (eds), **Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México**, IV, 569-599, 2004.

BURGER, J. Bioindicators: types, development, and use in ecological assessment and research. **Environmental Bioindicators**, v.1, p.22-39, 2006.

CABELLO, P. E.; SCOGNAMIGLIO, F. P.; TERÁN, F. J. C. Tratamento de vinhaça em reator anaeróbio de leito fluidizado. **Engenharia Ambiental**, v. 6, n. 1, p. 321-338, 2009.

CARVALHO, N. L.; PIVOTO, T. S. Ecotoxicologia: conceitos, abrangências e importância. **Revista Eletrônica do PPGAAm-CCR/UFSM**, v. 2, n. 2, p. 176-192, 2011.

CASTRO-FERREIRA, M. P.; ROELOFS, D.; VAN GESTEL, C. A. M.; VERWEIJ, R. A.; SOARES, A. M. V. M.; AMORIM, M. J. B. *Enchytraeus crypticus* as model species in soil ecotoxicology. **Chemosphere**, v. 87, p. 1222-1227, 2012.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – **Norma Técnica P4.231: Vinhaça: Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola**, 3ed, 2ª versão, pp15, 2015.

CHAPMAN, P. M. Emerging substances — Emerging problems? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.25, n.6, p.1445-1447. 2006.

CHELINHO, S. DOMENE, X.; ANDRES, P.; NATAL-DA-LUZ, T.; NORTE, C.; RUFINO, C.; LOPES, I.; CACHADA, A.; ESPINDOLA, E.; RIBEIRO, R.; DUARTE, A.C.; SOUSA, J.P. Soil microarthropod community testing: A new approach to increase

the ecological relevance of effect data for pesticide risk assessment. **Applied Soil Ecology**, v. 83, p. 200-209, 2014.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; FRANCISCO, A.; PEDRO-ESCHER, J.; GASTALDI, V. D.; FONTANETTI, C. S. Diplopods as Soil Bioindicators of Toxicity After Application of Residues From Sewage Treatment Plants and Ethanol Industry. **Microscopy and Microanalysis**, v. 22, p. 1098–1110, 2016.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; MOREIRA-DE-SOUSA, C.; SOUZA, R. B.; FRANCISCO, A.; GASTALDI, V. D. O emprego de diferentes resíduos utilizados como fertilizantes na cultura de cana-de-açúcar. . In: FONTANETTI, C.S.; BUENO, O.C. (Org.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. 1ed. Bauru, SP: Canal 6, v. 1, p. 63-86, 2017.

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

CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C. S. Assessment of the Genotoxicity of Two Agricultural Residues After Processing by Diplopods Using the *Allium cepa* Assay. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 224, p. 1523-1537, 2013b.

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

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

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

CROUAU, Y.; GISCLARD, C.; PEROTTI, P. The use of *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae) in biossays of waste. **Applied Soil Ecology**, v.19, p.65-70, 2002.

DANGERFIELD, J.M. Ingestion of mineral soil/litter mixtures and faecal pellets production in the southern African millipede *Alloporus uncinatus* (Attems). **Pedobiologia**, v. 37, n.3, p. 159-166, 1993.

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

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

DIDDEN, W.A.M., RÖMBKE, J. Enchytraeids as indicator organisms for chemical stress in terrestrial ecosystems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 50, p. 25–43, 2001.

DÖLL, M. M. R.; FORESTI, E. Efeito do bicarbonato de sódio no tratamento de vinhaça em AnSBBR operado a 55 e 35°C. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 15, n. 3, p. 275-282, 2010.

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

ELMORE, S. A.; DIXON, D.; HAILEY, J. R.; HARADA, T.; HEBERT, R. A.; MARONPOT, R. R.; NOLTE, T.; REHG, J. E.; RITTINGHAUSEN, S.; ROSOL, T. J.; SATOH, H.; VIDAL, J. D.; WILLARD-MACK, C. L.; CREASY, D. M. Recommendations from the INHAND Apoptosis/Necrosis Working Group. **Toxicologic Pathology**, v. 44, n. 2, p. 173-188, 2016.

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

FARFAN, M. A. **Some aspects of the ecology of millipedes (Diplopoda)**. Thesis, Graduate Program in Evolution, Ecology and Organismal Biology, The Ohio State University, 113p, 2010.

FEIGIN, A.; RAVINA, I.; SHALHEVET, J. **Irrigation with treated sewage effluent: management for environmental protection**. Berlin: Springer-Verlag, pp. 224, 1991.

FIGUEIREDO, P. Breve histórico da cana-de-açúcar e o papel do Instituto Agronômico no seu estabelecimento no Brasil. In: DINARO-MIRANDO, L.L.; VASCONCELOS, A. C. M. **Cana-de-açúcar**. 2ed. Campinas: IAC, v. 1, p. 31-44, 2010.

FONTANETTI, C. S.; NOGAROL, L. R.; SOUZA, R. B.; PEREZ, D. G.; MAZIVIERO, G. Bioindicators and Biomarkers in the Assessment of Soil Toxicity. In: Simone Pascucci. (Org.). **Soil Contamination**. 1ªed. Rijeka, Croácia: InTech, p. 143-168, 2011.

FONTANETTI, C. S.; PINHEIRO, T. G.; SOUZA, R. B.; MARCATO, A. C. C.; MOREIRA-DE-SOUSA, C. M. Electron microscopy and the responses of terrestrial invertebrates against contaminants of soil. In: Antonio Méndez-Vilas. (Org.) **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**. 1ed.Espanha: FORMATEX, v. 1, p. 335-342, 2012.

FRAGOSO, C.; LAVELLE, P.; BLANCHART, E.; SENAPATI, B. K.; JIMENEZ, J. J.; MARTINEZ, M. A.; DECAËNS, T.; TONDOH, J. Earthworm Communities of Tropical Agroecosystems: Origin, Structure and Influence of Management Practices. In: LAVELLE, P.; BRUSSAARD, L.; HENDRIX, P. F. (Eds). **Earthworm management in tropical agroecosystems**. CABI, Wallingford. pp. 27-55, 1999.

FRANCISCO, A.; FONTANETTI, C. S. Diplopods and Agrochemicals-a Review. **Water, Air and Soil Pollution (Print)**, v. 226, p. 53-65, 2015.

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

GAVRIELI, Y. SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*, v. 119, n. 3, p. 493-501, 1992.

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

HEDLUND K.; AUGUSTSSON, A. Effects of enchytraeid grazing on fungal growth and respiration, *Soil Biology and Biochemistry*, v. 27, p. 905–910, 1995.

HINTON, J. Earthworms as a bioindicator of mercury pollution in an artisanal gold mining community, Cachoeira do Piriá, Brazil. Tese de Doutorado, The University OF British Columbia, 132p, 2002.

HOFFMAN, R. L.; GOLOVATCH, S. I.; ADIS, J.; MORAIS, J. W. Diplopoda. In: ADIS, J. (Ed.). **Amazonian Arachnida and Myriapoda**. Sofia-Moscow: Pensoft Publishers, p.505-533, 2002.

HOPKIN, S.P.; READ, H. J. **The biology of millipedes**. New York: Oxford University Press, 2nd ed., 233pp, 1992.

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

HUND-RINKE, K.; ACHAZI, R.; RÖMBKE, J.; WARNECKE, D. Avoidance Test with *Eisenia fetida* as Indicator for the Habitat Function of Soils: Results of a Laboratory Comparison Test. **Journal of Soils and Sediments**, v. 3, p. 7-12, 2003.

INGHAM, E. R. The Soil Biology Primer. Disponível em: http://soils.usda.gov/sqi/concepts/soil_biology/biology.html Acessado em: 10 de março de 2018.

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

ISO- International Organization for Standardization. **(ISO 17512-1:2008) Soil Quality: Avoidance Test for Determining the Quality of Soils and Effects of Chemicals on Behavior. Part 1: Test with Earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*)**. ISO, Geneva (ISO 17512 1), 2008.

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

ISO- International Organization for Standardization. **(ISO 11268-2:2011) Soil quality — Effects of pollutants on earthworms — Part 2: Determination of effects on reproduction to *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei***. ISO, Geneva (ISO 11268 2), 2011.

ISO- International Organization for Standardization. **(ISO 16387:2013) Soil quality: effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.)—determination of effects on reproduction and survival**. ISO, Geneva (ISO 16387), 2013.

JACOBSON, M. D.; WEIL, M.; RAFF, M. C. Programmed cell death in animal development. *Cell*, v. 88, p. 347-354, 1997.

JÄNSCH, S.; RÖMBKE, J.; DIDDEN, W. The use of enchytraeids in ecological soil classification and assessment concepts. ***Ecotoxicology and Environmental Safety***, v. 62, p. 266-277, 2005.

KIANG, C. H.; BASSO, J. B.; ALFARO-SOTO, M. Impactos da fertirrigação por vinhaça em corpos d'água. In: FONTANETTI, C.S.; BUENO, O.C. (Org.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. 1ed. Bauru, SP: Canal 6, v. 1, p. 215-227, 2017.

KIME, R. K.; GOLOVATCH, S. I. Trends in the ecological strategies and evolution o millipedes (Diplopoda). *Biol. J. of the Lin. Soc., London*, v.63, p.333-349, 2000.

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

KÖHLER, H.R.; HÜTTENRAUCH, K.; BERKUS, M.; GRÄFF, S.; ALBERTI, G. Cellular hepatopancreatic reactions in *Porcellio scaber* (Isopoda) as biomarkers for the evaluation of heavy metal toxicity in soils. ***Applied Soil Ecology***, v.3, p.1-15, 1996.

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

LABAT-MOLEUR, F.; GUILLERMET, C.; LORIMIER, P.; ROBERT, C.; LANTUEJOUL, S.; BRAMILLA, E.; NEGOESCU, A. TUNEL Apoptotic cell

detection in tissue sections: critical evaluation and improvement . **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 46, n. 3, p. 327-334, 1998.

LINTHURST, R. A.; BOURDEAU, P.; TARDIFF, R. G. Methods to assess the effects of chemicals on ecosystems In: SCOPE 53. Methods to study chemical effects. Scientific Committee on Problems of the Environment Report #53. M.S. Swaminathan **Research Foundation, Chennai**, India, pp. 416, 1995.

LEE, H. C.; LU, P. N.; HUANG, H. L.; CHU, C.; LI, H. P.; TSAI, H. J. Zebrafish Transgenic Line huORFZ Is an Effective Living Bioindicator for Detecting Environmental Toxicants. **PLOS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1-12, 2014.

LYRA, M. R. C. C. **Estudo comparativo da aplicação da vinhaça tratada e in natura em solos sob o cultivo de cana-de-açúcar**. 140p. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Departamento de Engenharia Civil, Recife, PE, 140p, 2008.

MACCARI, A. P.; SEGAT, J. C.; CORREA, J. C.; SOUSA, J. P.; BARRETA, D.; KLAUBERG FILHO, O. Reprodução de enquitreídeos em solos contaminados com dejetos líquidos de suínos. In: **Anais do Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**, 2015.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MANGIÉRI JUNIOR, R. Bioindicadores de impacto em sistemas orgânicos. In: HAMMES, V.S. (Org.). **Educação ambiental para o desenvolvimento sustentável**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v. 4, p. 100-101, 2002.

MARION, L. F.; LOBO, E. A.; SCHUCH, M.; KERN, D. I.; NIEMEYER, J. C. Avaliação da toxicidade do solo em culturas olerícolas de bases ecológicas e convencionais, município de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil, através de ensaios ecotoxicológicos. **Caderno de Pesquisa, Série Biologia**, v. 24, n. 1, p. 14-33, 2012.

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

MEDEIROS, S. C. L.; RIBEIRO, S. R.; CONEGLIAN, C. M. R.; BARROS, R. M.; BRITO, N. N.; DRAGONI SOBRINHO, G.; TONSO, S.; PELEGRINI, R. Impactos da agroindústria canavieira sobre o meio ambiente. **In: Fórum de Estudos Contábeis**, 3, 2003, Rio Claro, Anais. Rio Claro: UNICAMP, 2003.

MERLINI, V. V.; NOGAROL, L. R.; MARIN-MORALES, M. A.; FONTANETTI, C. S. Toxicity of trifluralin herbicide in a representative of the edaphic fauna: Histopathology of the midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 1361-1369, 2012.

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

MOREIRA, R.; SOUSA, J. P.; CANHOTO, C. Biological testing of a digested sewage sludge and derived composts. **Bioresource technology**, v. 99, n. 17, p. 8382-8389, 2008.

MORINI, M. S. C.; SILVA, O. G. M.; ZAMBON, V.; NOCELLI, R. N. F. Cultura de cana-de-açúcar no Brasil: manejo, impactos econômicos, sociais e ambientais. . In: FONTANETTI, C.S.; BUENO, O.C. (Org.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. 1ed. Bauru, SP: Canal 6, v. 1, p. 31-50, 2017.

NADEAU, D.; CORNEAU, S.; PLANTE, I.; MORROW, G.; TANGUAY, R.M. Evaluation for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*. **Cell Stress & Chaperones**, v.6, n. 2, p. 153-163, 2001.

NAGOESCU, A.; LORIMIER, P.; LABAT-MOLEUR, F.; DROUET, C.; ROBERT, C.; GUILLERMET, C.; BRAMBILLA, C.; BRAMBILLA, E. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, n. 9, p. 959–968, 1996.

NAHMANI, J.; HODSON, M. E.; BLACK, S. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. **Environmental Pollution**, v. 145, p. 402-424, 2007.

NATAL-DA-LUZ, T.; AMORIM, M. J. B.; RÖMBKE, J.; PAULO SOUSA, J. Avoidance tests with earthworms and springtails: Defining the minimum exposure time to observe a significant response. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 2, p. 545-551, 2008.

NATAL-DA-LUZ, T.; MOREIRA-SANTOS, M.; CLEMENS, R.; CASTILLO, L.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J.P. Ecotoxicological characterization of a tropical soil after diazinon spraying. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 2163-2176, 2012.

NATAL-DA-LUZ, T.; OJEDA, G.; PRATAS, J.; VAN GESTEL, C. A. M.; SOUSA, J. P. Toxicity to *Eisenia andrei* and *Folsomia candida* of a metal mixture applied to soil directly or via an organic matrix. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 6, p. 1715-1720, 2011.

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

NICHOLSON, S.; LAM, P.K.S. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). **Environmental International**, v. 31, p. 212-132, 2005.

NIJIMA, K. The outbreak of the train millipede. **Japanese Journal of Forest Environment**, v. 26, p. 25-32, 1984.

NIVA, C. C.; RÖMBKE, J.; SCHMELZ, RM.; BROWN, G. G. Enquiteídeos (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. (eds.). **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. UFLA, Lavras, Brasil, p. 351-365, 2010.

OBONO, F.; NSANGOU, A. N.; NGAHA, D.; TCHAWOU; KAPSEU, C. Valuation of vinasse as organic fertilizer on the corn field. **American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences**, v. 23, n. 1, p. 185-189, 2016.

PRADO, R. M. **Nutrição de plantas**. Editora UNESP, pp. 407, 2008.

OLIVEIRA FILHO, L. C. I.; BARRETA, D. Por que devemos nos importar com os colêmbolos edáficos? **Revista Scientia Agrária**, v. 17, n. 2, p. 21-40, 2016.

PRADO, R. M. Potássio. In: PRADO, R. M. **Nutrição de plantas**. São Paulo: UNESP, p.161-181, 2008.

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

PEDRO-ESCHER, J.; MAZIVIERO, G.; FONTANETTI, C.S. Mutagenic action of sugarcane vinasse in the *Tradescantia pallida* test system. **Journal of Ecosystem & Ecography**, v. 4, n. 2, p. 1-4, 2014.

PIANO, A.; VALBONESI, P.; FABBRI, E. Expression of cytoprotective proteins, HSP70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell Stress Chaperones*, v. 9, p. 134–142, 2004.

RAMOS, G. A.; SANTO, F. B.; SCHMITT, J.; GUERRA, N.; NIEMEYER, J. C. Ecotoxicidade de fomesafen e metsulfuron-methyl com e sem adjuvantes para a fauna

do solo. In: **Anais do I Simpósio de Agronomia UFSC Curitibanos, III Semana Acadêmica DE Agronomia**, 2018.

READ, H. J.; MARTIN, M. H. A study of millipede communities in woodlands contaminated with heavy metals. **In Proceedings of the 7th International Congress of Myriapodology**, ed. A. Minelli, E. J. Brill, Leiden, p.289-298, 1990.

RIBEIRO, L.R; SALVADORI, D. M. F; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Editora: ULBRA. Canoas-RS. pp. 356, 2003.

RIBEIRO-TROIAN, V. R.; BALDISSERA, R.; HARTZ, S. M. Effects of understory structure on the abundance, richness and diversity of Collembola (Arthropoda) in Southern Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 3, n. 38, p. 340-345, 2009.

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

RODE, H. J.; EISEL D. Chapter 5 – Apoptosis – DNA fragmentation in individual cells. In: RODE, H. J.; EISEL D. (eds). **Apoptosis, Cytotoxicity and cell proliferation**. 4th ed. London: Roche Diagnostics GmbH, p. 70-86, 2008.

ROMBKE, J.; MOSER, T. Validating the enchytraeid reproduction test: organisation and results of an international ringtest. **Chemosphere**, v. 46, p. 1117–1140, 2002.

SÁNCHEZ-TORRES, L. E.; VARGAS, F. D. Apoptosis: the phenomenon and its determination. **Téc Pecu Méx** n. 41, v. 1, p. 49-62, 2003.

SANTANA, L. P.; NIEMEYER, J. C.; SOUSA, J. P ; DA SILVA, E. M. Testes de fuga laboratoriais com *Proistoma minuta* (Colembolla) em solos contaminados com metais e comparação com a sensibilidade de *Folsomia candida* (Colembolla). **Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil**, 2009.

SCHAEFER, M. Behavioural endpoints in earthworm ecotoxicology – evaluation of diferente test systems in soil toxicity assessment. **J. Soils & Sediments**, v. 3, n. 2, p. 79-84, 2003.

SCUDELER, E. L.; SANTOS, D. C. Effects of nem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). **Micron**. n. 44, p. 125-132, 2013.

SHIPITALO, M. J.; LE BAYON, R. C. Quantifying the effects of the earthworms an soil aggregation and porosity. In: EDWARDS, C. A. (ed). **Earthworms Ecology, Second edition**. CRC Press LLC, p. 183-200, 2004.

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

SILVA, D. C. V. R.; POMPÊO, M.; PAIVA, T. C. B.; Aecotoxicologia no contexto atual do Brasil. In: POMPÊO, M.; MOSCHINI-CARLOS, V.; NISHIMURA, P. Y.; SILVA, S. C.; DOVAL, J. C. L. (Orgs). **Ecologia de reservatórios e interfaces**. Instituto de Biociências – IB/USP, p. 340-353, 2015.

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

SILVA-ZACARIN, E.C.M.; GREGORC, A.; SILVA DE MORAES, R.L.M. In situ localization of heat-shock proteins and cell death labelling in the salivary gland of acaricide-treated honeybee larvae. **Apidologie**, v.37, p. 507-516, 2006.

SOCIEDADE NACIONAL DA AGRICULTURA. 2016. Minhocas também são indicadoras da contaminação de solo. Disponível em: <http://www.sna.agr.br/minhocas-tambem-sao-indicadoras-de-contaminacao-dos-solos/> Acessado em: 18 de Abril de 2018.

SOUZA, T. S.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; FONTANETTI, C. S. Ecotoxicological assays applied in soils contaminated by petroleum hydrocarbons. In: Julia E. Visser. (Org.). **Ecotoxicology around the Globe**. 1ªed.Nova Iorque, Estados Unidos: Nova Publishers, Inc., p. 247-262, 2011.

SOUZA, R. B. ; MAZIVIERO, G. ; CHRISTOFOLETTI, C. A. ; PINHEIRO, T.G. ; FONTANETTI, C.S. . Soil Contamination with Heavy Metals and Petroleum Derivates: Impact on Edaphic Fauna and Remediation Strategies. In: Maria C. Hernandez Soriano. (Org.). **Soil Processes and Current Trends in Quality Assessment**. 1ªed.Rijeka: InTech, v. cap 6, p. 175-203, 2013.

SPADOTTO, C. A., M. A. F. GOMES, L. C. LUCHINI & M. M. ANDRÉA. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. 1 ed, Embrapa Meio Ambiente, 29p, 2004.

SRIVASTAVA, N.; SAHAI, R. Effects of distillery waste on the performance of *Cicer arietinum* L. **Environmental Pollution**, n. 43, n. 2, p. 91-102, 1987.

TRAJANO, E.; BICHUETTE, M. E. **Biologia Subterrânea – Introdução**. Redespeleo Brasil, pp. 92, 2006.

TOSZA, E.; DUMNICKA, E.; NIKLIŃSKA, M.; ROŻEN, A. Enchytraeid and earthworm communities along a pollution gradient near Olkusz (Southern Poland). **European Journal of Soil Biology**, v. 46, p. 218-24, 2010.

TOUROULT J.; LE GALL P. 2013. Fruit feeding Cetoniinae community structure in an anthropogenic landscape in West Africa. *Journal of Insect Conservation*. v 17, p 23-34.

UHLIG, V. M. Caracterização da mesofauna edáfica em áreas de regeneração natural da floresta ombrófila densa submontana, no município de Antonina, Paraná. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Universidade Federal do Paraná, 112p, 2005.

UNICA. <http://www.unica.com.br/> Acessado em 14 de fevereiro de 2018.

USEPA - **United States Environmental Protection Agency. A guide to the biosolids risk assessments for the EPA Part 503 rule**, Washington: Office of Wastewater Management, EPA/832-B-93-005, 1995. 195p, 1995.

VAN GESTEL, C.A.M. Soil ecotoxicology: state of the art and future directions. **ZooKeys**, Sofia, v. 176, p. 275-296, 2012.

VAN STRAALLEN, N. M. Assessment of soil contamination - a functional perspective. **Biodegradation**, v. 13, p. 41-52, 2002.

VAN VLIET, P. C. J.; BEARE, M. H.; COLEMAN, D. C.; HENDRIX, P. F. Effects of enchytraeids (Annelida: Oligochaeta) on soil carbon and nitrogen dynamics in laboratory incubations. **Applied Soil Ecology**, v. 25, p. 147-160, 2004.

VASSEUR, P.; COSSU-LEGUILLE, C. Linking molecular interactions to consequent effects of persistent organic pollutants (POPs) upon populations. **Chemosphere**, v. 62, n. 7, p. 1033-1042, 2006.

VIEIRA, M. S. G.; FERREIRA, R. L.; OLIVATI, F. N. A utilização de bioindicadores como instrumento de perícia ambiental. **Caderno Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 5, n. 3, p. 36-49, 2014.

WALKER, C. H.; SIBLY, R. M.; HOPKIN, S. P.; PEAKALL, D. B. **Principles of ecotoxicology**. 4th ed. New York: CRC Press, 386p, 2012.

WILLINGHAM, M. C. Cytochemical Methods for the detection of apoptosis. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 47, n. 9, p. 1101-1109, 1999.

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

ZEPPELINI, D.; BELLINI, B. **Introdução ao estudo dos Collembola**. Ed. Universitária, UFPB, 82 p., 2004.

ZHANG G, OLDROYD SD, HUANG LH, YANG BH, LI Y, YE R, EL NAHAS AM. Role of apoptosis and Bcl-2/Bax in development of tubulo interstitial fibrosis during experimental obstructive nephropathy. **Experimental Nephrology**, v. 9, p. 71-80, 2001.

ZORTÉA, T.; BARETTA, D.; MACCARI, A. P.; et al. Influence of cypermethrin on avoidance behavior, survival and reproduction of *Folsomia candida* in soil. **Chemosphere**, v. 122, p. 94-98, 2015.