

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E  
CONSERVAÇÃO**

**EFEITOS DA VINHAÇA DA CANA-DE-AÇÚCAR NA  
MORFOLOGIA TESTICULAR DE ANUROS**

Autora: Cirley Gomes Araújo dos Santos  
Orientadora: Dra. Lia Raquel de Souza Santos  
Coorientador: Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho

RIO VERDE – GO  
Dezembro - 2021

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E  
CONSERVAÇÃO**

**EFEITOS DA VINHAÇA DA CANA-DE-AÇÚCAR NA  
MORFOLOGIA TESTICULAR DE ANUROS**

Autora: Cirley Gomes Araújo dos Santos  
Orientadora: Dra. Lia Raquel de Souza Santos  
Coorientador: Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde - Área de Concentração: Conservação dos Recursos Naturais.

RIO VERDE – GO  
Dezembro - 2021

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E  
CONSERVAÇÃO**

**EFEITOS DA VINHAÇA DA CANA-DE-AÇÚCAR NA  
MORFOLOGIA TESTICULAR DE ANUROS**

Autora: Cirley Gomes Araújo dos Santos  
Orientadora: Dra. Lia Raquel de Souza Santos

*TITULAÇÃO*: Mestre em Biodiversidade e Conservação –  
Área de Concentração Conservação dos Recursos Naturais

RIO VERDE – GO  
Dezembro - 2021

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP  
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano**

SC578e Santos, Cirley Gomes Araújo dos  
EFEITOS DA VINHAÇA DA CANA-DE-AÇÚCAR NA MORFOLOGIA  
TESTICULAR DE ANUROS / Cirley Gomes Araújo dos  
Santos; orientadora Lia Raquel de Sousa Santos; co-  
orientador Sebastião Carvalho Vasconcelos-Filho. --  
Rio Verde, 2021.  
42 p.

Dissertação (Mestrado em Mestrado em  
Biodiversidade e Conservação) -- Instituto Federal  
Goiano, Campus Rio Verde, 2021.

1. Anfíbios. 2. Espermatogênese. 3.  
Ecotoxicologia. 4. Vinhaça. I. Santos, Lia Raquel de  
Sousa, orient. II. Vasconcelos-Filho, Sebastião  
Carvalho, co-orient. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA  
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Documentos 113/2021 - NREPG-RV/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

**AValiação DOS EFEITOS DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR NA MORFOLOGIA TESTICULAR DE ANUROS**

Autora: Cirley Gomes Araújo dos Santos  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lia Raquel de Souza Santos Borges

TITULAÇÃO: Mestre em Biodiversidade e Conservação - Área de Concentração Conservação dos Recursos Naturais

APROVADA em 07 de dezembro de 2021.

Prof. Dr. Rodrigo Zieri  
Avaliador externo - IFSP / Barretos

Prof. Dr. Jânio Cordeiro Moreira  
Avaliador interno - IF Goiano / Rio Verde

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lia Raquel de Souza Santos Borges  
Presidente da Banca - IF Goiano / Rio Verde

Documento assinado eletronicamente por:

- Janio Cordeiro Moreira, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 07/12/2021 17:23:25.
- Rodrigo Zieri, Rodrigo Zieri - Professor Avaliador de Banca - Ifsp (10882594000165), em 07/12/2021 17:22:59.
- Lia Raquel de Souza Santos Borges, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 07/12/2021 17:05:01.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 02/12/2021. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 336945  
Código de Autenticação: c544a765ed



INSTITUTO FEDERAL GOIANO  
Campus Rio Verde  
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, None, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970  
(64) 3620-5600

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

### IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese (doutorado)                  | <input type="checkbox"/> Artigo científico              |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação (mestrado) | <input type="checkbox"/> Capítulo de livro              |
| <input type="checkbox"/> Monografia (especialização)       | <input type="checkbox"/> Livro                          |
| <input type="checkbox"/> TCC (graduação)                   | <input type="checkbox"/> Trabalho apresentado em evento |

Produto técnico e educacional - Tipo:

Nome completo do autor:

Cirley Gomes Araújo dos Santos

Matrícula:

2020102310840047

Título do trabalho:

EFETOS DA VINHAÇA DA CANA-DE-AÇÚCAR NA MORFOLOGIA TESTICULAR DE ANUROS.

### RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial:  Não  Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 26 /04 /2022

O documento está sujeito a registro de patente?  Sim  Não

O documento pode vir a ser publicado como livro?  Sim  Não

### DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O(a) referido(a) autor(a) declara:

- Que o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;

• Que obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autoria, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;

• Que cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde, Goiás

Local

26 /04 /2022

Data

*Cirley Gomes Araújo dos Santos*

Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais

Ciente e de acordo:

*Sia Borges*

Assinatura do(a) orientador(a)

*Dedicatória*

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para que eu me dedicasse aos estudos; à minha irmã pelo carinho e companheirismo, e ao meu esposo que sempre me estimulou a continuar nesse caminho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir trilhar esse caminho, dando força, paciência e perseverança.

Aos meus pais, Kênia e Byron, ao meu esposo Alfredo e a minha irmã Bruna, pelo carinho, apoio, incentivo e compreensão. Vocês com certeza participaram de forma decisiva neste trabalho, sem vocês não seria possível que eu chegasse tão longe. Tudo que almejo é pensando em vocês.

As minhas amigas, Ana Paula, Bianca e Lorena, que desde a graduação foram minhas companheiras, em uma caminhada que não foi fácil, mas foi divertida, animada e enriquecedora. Meninas, agradeço por estarem sempre presentes me aconselhando e apoiando sempre que possível.

À minha orientadora, professora Dra. Lia Raquel de Souza Santos, pelas orientações, amizade, confiança e ensinamentos ao longo dessa jornada acadêmica. A gratidão e admiração ao decorrer desses anos só aumentaram, é e sempre será um exemplo, de mulher, mãe, cientista e professora.

Ao meu coorientador Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho, por prontamente aceitar o desafio de me coorientar, pela disponibilidade e auxílio em tudo que precisei.

Ao professor Dr. Rinneu Elias Borges, pelas ricas contribuições de conhecimento, experiência e ajuda nas coletas.

Aos pesquisadores, amigos e doutorandos Me. Marcelino Benvindo-Souza e Me. Rhayane Alves Assis, por toda contribuição neste trabalho, desde as coletas, realização do experimento e escrita. Vocês contribuíram enormemente para que a realização deste trabalho fosse possível.

Aos demais amigos do Laboratório de Ecotoxicologia e Sistemática Animal (ECOTOXSA), em especial, Ana Carolina, Jéssica, Gustavo, José Augusto, Samara e Ellen, pelo companheirismo e momentos de descontração.

Aos meus professores e colegas que fazem parte da comissão de divulgação do PPGBio, em especial, Maria Andréia, Valdneá, Jânio e Alessandro, e a todos os outros professores que contribuíram com a minha formação.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação (PPGBIO) pela oportunidade de cursar o mestrado e por ter fornecido os recursos necessários para a realização deste estudo.



À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa.

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente para a realização deste trabalho!

**MUITO OBRIGADA!**

## **BIOGRAFIA DA AUTORA**

Cirley Gomes Araújo dos Santos, natural de Rio Verde, Goiás, nascida em 1997, filha de Kênia Gomes de Sousa e Byron Araújo dos Santos. Concluiu o ensino médio na zona rural, na EMREF Cabeceira Alta extensão Olynto Pereira de Castro em Rio Verde no ano de 2014. Iniciou sua formação acadêmica no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas no Instituto Federal Goiano na cidade de Rio Verde, Goiás, no ano de 2016. Durante a graduação foi voluntária de iniciação científica (PIVIC) no Laboratório de Biologia Animal e bolsista do programa Residência Pedagógica. Finalizou a graduação no ano de 2019, e logo em seguida ingressou no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, no IFGoiano campus Rio Verde no ano de 2020, o qual concluiu no ano de 2021.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES .....	xi
RESUMO GERAL .....	xii
GENERAL ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	2
2. OBJETIVOS .....	3
<b>Objetivo Geral:</b> .....	3
<b>Objetivos Específicos:</b> .....	3
3. CAPÍTULO I .....	4
<b>3.1 INTRODUÇÃO</b> .....	6
<b>3.2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	7
<b>3.3 RESULTADOS</b> .....	9
<b>3.4 DISCUSSÃO</b> .....	15
<b>3.5 CONCLUSÃO</b> .....	18

<b>3.6 REFERÊNCIAS</b> .....	18
4. CONCLUSÃO GERAL.....	24
Material Suplementar .....	25

## ÍNDICE DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1:</b> Parâmetros físico-químicos da análise da vinhaça. ....	10
<b>Tabela 2:</b> Frequência média da comparação da relação entre a área ocupada por cistos germinativos no interior de lóculos nos diferentes tratamentos.. ....	25
<b>Tabela 3:</b> Frequência média da comparação da relação entre a área locular e diâmetro.....	25
<b>Tabela 4:</b> Resultados da análise química da água no local de coleta dos espécimes.....	25

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1:</b> Área de coleta (A) e apresentação esquemática do desenho experimental estabelecido no estudo (B).....	8
<b>Figura 2:</b> Ilustração histológica representativa da ação de diferentes concentrações de vinhaça no parênquima testicular de <i>L. fuscus</i> ..	12
<b>Figura 3:</b> Histologia do tecido testicular de <i>Leptodactylus fuscus</i> . A: Detalhe da área (círculo tracejado em preto) e diâmetro (linha tracejada escura) dos lóculos seminíferos; B: Diferentes tipos de células da linhagem espermática. s .....	13
<b>Figura 4:</b> Comparação dos parâmetros testiculares entre os animais do grupo GN (animais coletados <i>in situ</i> ), controle (CT), e os grupos de exposição com concentrações a 25%, 50%, 75% e 100% de vinhaça. ....	14

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES

µm: Micrômetros

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

CT: Controle

GN: Grupo Natural

H-E: Hematoxilina-Eosina

ICMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IFGoiano: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano

IUCN: União Internacional para Conservação da Natureza

LQ: Limite de Quantificação

NR: Não Há Recomendação

pH: Potencial Hidrogeniônico

SC1: Espermatócito primário

SC2: Espermatócito secundário

SG1: Espermatogônia primária

SG2: Espermatogônia secundária

SZ: Espermátides e espermatozoides

VMP: Valor Máximo Permitido

## RESUMO GERAL

SANTOS, C. G. A. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde – dezembro de 2021.  
**Efeitos da vinhaça da cana-de-açúcar na morfologia testicular de anuros.**  
Orientadora: Lia Raquel de Souza Santos. Coorientador: Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho.

O Brasil se destaca como maior produtor de cana-de-açúcar no mundo, e acarreta a geração de grandes quantidades de efluentes, como a vinhaça. A vinhaça é o subproduto produzido nas indústrias sucroalcooleiras, com coloração escura e forte odor, sendo muito usada na adubação do solo pela grande quantidade de matéria orgânica e nutrientes. No entanto, as dosagens de aplicação da vinhaça devem ser mensuradas de acordo com as características de cada solo, por suas características poluentes. Nesse contexto, avaliou-se a influência de diferentes concentrações (GN, 25%, 50%, 75% e 100%) da vinhaça de cana-de-açúcar a nível morfológico e histológico testicular de anuros da espécie *Leptodactylus fuscus*, através da análise do peso e comprimento dos testículos, área e diâmetro locular, e área dos cistos espermatogênicos (espermatogônias, espermatócitos e espermatozoides) em diferentes condições experimentais. Em relação à área locular não houve diferença entre GN (grupo natural), CT (controle), 25 e 50%. Em contraste, essas áreas foram ambas diferentes de 75 e 100%. Já para o diâmetro desses lóculos, a diferença foi entre o GN, 50, 75 e 100% e entre CT e 75%. Considerando os cistos espermatogênicos individualmente, para área dos cistos de espermatogônias primárias, GN, CT e 50% foram semelhantes, porém diferentes de 75%. Já para os cistos de espermatogônias secundárias a diferença foi entre o GN, CT e 25% e entre o CT e 100%. Para espermatócitos primários, houve diferença entre CT, 50 e 75% de vinhaça. Para espermatócitos secundários, tanto o GN como o CT apresentaram diferença significativa em relação aos grupos de exposição, 25, 50, 75 e 100%. E, finalmente, em relação aos espermatozoides, houve diferença significativa entre o grupo controle, 75 e 100% de vinhaça. As respostas evidenciadas indicam alteração nos padrões testiculares, quanto a área ocupada pelas células da linhagem germinativa quando os animais são submetidos à vinhaça, permitindo concluir que a exposição de *L. fuscus* a este contaminante, pode comprometer os processos reprodutivos dos anuros.

**PALAVRAS-CHAVE:** Anfíbios, espermatogênese, ecotoxicologia, vinhaça.



## GENERAL ABSTRACT

SANTOS, C. G. A. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde- December 2021. Effects of sugarcane vinasse on testicular morphology of anurans. Advisor: Lia Raquel de Souza Santos. Co-advisor: Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho.

Brazil stands out as the largest producer of sugarcane in the world, which leads to the generation of large amounts of effluents, such as vinasse. Vinasse is the by-product produced in the sugar-alcohol industries, with a dark color and strong odor, being widely used in soil fertilization due to the large amount of organic matter and nutrients. However, vinasse application dosages must be measured according to the characteristics of each soil, due to its polluting characteristics. In this context, we evaluated the influence of different concentrations (GN, 25%, 50%, 75% and 100%) of sugarcane vinasse on testicular morphological and histological level of anurans of the species *Leptodactylus fuscus*, through the analysis of the weight and testis length, locular area and diameter, and area of spermatogenic cysts (spermatogonia, spermatocytes and spermatozoa) under different experimental conditions. Regarding the locular area, there was no difference between GN (natural group), CT (control), 25 and 50%. In contrast, these areas were both different by 75 and 100%. As for the diameter of these locules, the difference was between GN, 50, 75 and 100% and between CT and 75%. Considering the spermatogenic cysts individually, for the area of the primary spermatogonial cysts, GN, CT and 50% were similar, but different from 75%. As for the secondary spermatogonial cysts, the difference was between GN, CT and 25% and between CT and 100%. For primary spermatocytes, there was a difference between CT, 50 and 75% of vinasse. For secondary spermatocytes, both GN and CT showed a significant difference in relation to the exposure groups, 25, 50, 75 and 100%. And finally, in relation to sperm, there was a significant difference between the control group, 75 and 100% of vinasse. The observed responses indicate changes in testicular patterns, regarding the area occupied by the cells of the germ line when the animals are submitted to vinasse, allowing the conclusion that the exposure of *L. fuscus* to this contaminant can compromise the reproductive processes of anurans.

**KEYWORDS:** Amphibians, spermatogenesis, ecotoxicology, vinasse.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O grupo dos anfíbios é considerado um dos táxons mais ameaçados, com quase metade de todas as espécies em risco de extinção (IUCN., 2021). As causas para o declínio populacional dos anfíbios são muitas e complexas, incluindo a destruição e perda de habitat, mudanças climáticas, introdução de espécies exóticas e doenças (Ficetola et al., 2014; Orton et al., 2018; Karlsson et al., 2021). Entre outras ameaças estão o uso exacerbado de compostos químicos, a grande geração de resíduos industriais, e a possibilidade dessas substâncias agirem em sinergia, causando consequências graves (Ficetola et al., 2014).

Muitos produtos químicos utilizados na agricultura juntamente com a descarga de efluentes, têm causado impactos prejudiciais na saúde dos animais (Mann et al., 2009), por atuar como desreguladores endócrinos, os quais são conhecidos por causar redução da fertilidade e reversão sexual (Orton et al., 2018) em muitos grupos animais, em especial aos anuros (Moresco et al., 2014; Gregório et al., 2016). Esse potencial em reduzir a aptidão reprodutiva nas próximas gerações pode ter graves implicações biológicas, ecológicas e evolutivas (Orton et al., 2018).

O Brasil é grande produtor de cana-de-açúcar, gerando como consequência a vinhaça. A vinhaça é um resíduo líquido remanescente das indústrias sucroalcooleiras após a destilação do etanol, e, para cada litro de etanol produzido, são gerados em média 13 litros de vinhaça (Bordonal et al., 2018). O principal uso da vinhaça, atualmente é como adubo na fertirrigação, pois é uma fonte de potássio e nutrientes (Resende et al., 2006; Bordonal et al., 2018). No entanto, a aplicação deve ser feita de acordo com as características físicas do solo, altas concentrações podem levar ao acúmulo de potássio e a lixiviação desses produtos para águas subterrâneas (Bordonal et al., 2018), podendo afetar os organismos não alvos, tal como os anfíbios.

Neste contexto, ao se considerar a perda exponencial de populações de anfíbios (Carrasco et al., 2021) e que os anuros vivem associados aos ambientes aquáticos, cujos corpos d'água estão muitas vezes circundados por matrizes agrícolas, este estudo se propôs avaliar os atributos reprodutivos de uma espécie de anuro nativa, *Leptodactylus fuscus* (rã-assoviadora), para entender as potencialidades dos efeitos da vinhaça na reprodução dos anfíbios. *Leptodactylus fuscus* (Schneider. 1799) é uma espécie amplamente distribuída no Panamá, leste dos Andes e em toda a América do Sul (Frost,

2021). Possui hábitos noturnos, vive em ambientes abertos, e embora seja considerada bem adaptada a ambientes degradados (Sugai et al., 2014; Santana et al., 2019; IUCN., 2021), torna-se importante avaliar os impactos do uso da vinhaça no processo de fertirrigação e suas consequências na reprodução de anuros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bordonal, R. O., Carvalho, J. L. N., Lal, R., de Figueiredo, E. B., de Oliveira, B. G., & La Scala, N. (2018). Sustainability of sugarcane production in Brazil. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 38(2), 1-23.

Carrasco, G. H., Benvindo-Souza, M., Santos, L. R. S. (2021). Effect of multiple stressors and population decline of frogs. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-9.

Ficetola, G. F., Rondinini, C., Bonardi, A., Baisero, D., & Padoa-Schioppa, E. (2015). Habitat availability for amphibians and extinction threat: a global analysis. *Diversity and Distributions*, 21(3), 302-311.

Frost, D.R. Amphibian Species of the world: an online reference. Version 6.0 (Date of access). Electronic Database accessible at American Museum of Natural History, New York, USA (2020). Disponível em: <<https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>>

International Union for Conservation of Nature (IUCN). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-3. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T57129A11588348.en>> Acesso em 18 Nov. 2021.

Karlsson, O., Svanholm, S., Eriksson, A., Chidiac, J., Eriksson, J., Jernerén, F., & Berg, C. (2021). Pesticide-induced multigenerational effects on amphibian reproduction and metabolism. *Science of the Total Environment*, 775, 145771.

Mann, R. M., Hyne, R. V., Choung, C. B., & Wilson, S. P. (2009). Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental pollution*, 157(11), 2903-2927.

Orton, F., & Routledge, E. (2011). Agricultural intensity in ovo affects growth, metamorphic development and sexual differentiation in the Common toad (*Bufo bufo*). *Ecotoxicology*, 20(4), 901-911.

Orton, F., & Tyler, C. R. (2015). Do hormone-modulating chemicals impact on reproduction and development of wild amphibians?. *Biological Reviews*, 90(4), 1100-1117.

Resende, A. S., Xavier, R. P., de Oliveira, O. C., Urquiaga, S., Alves, B. J., & Boddey, R. M. (2006). Long-term effects of pre-harvest burning and nitrogen and vinasse applications on yield of sugar cane and soil carbon and nitrogen stocks on a plantation in Pernambuco, NE Brazil. *Plant and soil*, 281(1), 339-351.

Santana, D. J., Ferreira, V. G., Crestani, G. N., & Neves, M. O. (2019). Diet of the Rufous Frog *Leptodactylus fuscus* (Anura, Leptodactylidae) from two contrasting environments. *Herpetozoa*, 32, 1.

Sugai, J. L. M. M., Terra, J. D. S., Ferreira, V. L. (2012). Diet of *Leptodactylus fuscus* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) in the Pantanal of Miranda river, Brazil. *Biota Neotropica*, 12, 99-104.

## 2. OBJETIVOS

### **Objetivo Geral:**

Analisar os efeitos da exposição da vinhaça nos parâmetros reprodutivos de *Leptodactylus fuscus*.

### **Objetivos Específicos:**

- Avaliar se há diferença quanto aos parâmetros morfológicos testiculares de *L. fuscus* expostos a diferentes concentrações de vinhaça quando comparados aos organismos sem exposição desta substância;
- Avaliar a morfologia gonadal externa dos animais através de análises biométricas;
- Avaliar o parênquima testicular e quantificar as células da linhagem germinativa (espermatogônias, espermatócitos e espermatozoides) em diferentes condições experimentais.

### **3. CAPÍTULO I**

**(Artigo formatado nas normas da revista Environmental Pollution)**

## **EFEITOS DA VINHAÇA DA CANA-DE-AÇÚCAR NA MORFOLOGIA TESTICULAR DE ANUROS**

## Efeitos da vinhaça da cana-de-açúcar na morfologia testicular de anuros

**Cirley Gomes Araújo dos Santos<sup>1</sup>, Marcelino Benvindo-Souza<sup>1,2</sup>, Rhayane Alves Assis<sup>1,3</sup>, Wadson Rodrigues Rezende<sup>3</sup>, Rinneu Elias Borges<sup>1,4</sup>, Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho<sup>5</sup>; Lia Raquel de Souza Santos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Ecotoxicologia e Sistemática Animal, Instituto Federal Goiano, IF Goiano, campus Rio Verde, Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, Rio Verde, Goiás. CEP 75.901-970, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Mutagênese, Instituto de Ciências Biológicas, ICB I - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás. CEP 74690-900, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho, UNESP, campus São José do Rio Preto, R. Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP. CEP 15.054-000, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Biologia, Universidade de Rio Verde, UniRV, Fazenda Fontes do Saber, Rio Verde, GO. CEP 75.901-970, Brasil

<sup>5</sup>Laboratório de Anatomia Vegetal, Instituto Federal Goiano, IF Goiano, campus Rio Verde, Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, Rio Verde, Goiás. CEP 75.901-970, Brasil

\*Autor correspondente:

Lia Raquel de Souza Santos, [lia.santos@ifgoiano.edu.br](mailto:lia.santos@ifgoiano.edu.br)

### Resumo

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar e, como consequência são geradas grandes quantidades de efluentes, como a vinhaça. A vinhaça é o resíduo final produzido nas indústrias sucroalcooleiras e pode ser utilizada na adubação do solo por sua grande quantidade de matéria orgânica. Assim, o presente estudo avaliou a influência da vinhaça de cana-de-açúcar a nível anatômico e histológico testicular de anuros da espécie *Leptodactylus fuscus*. Para estas análises, foram avaliados o peso e comprimento dos testículos, bem como a área e diâmetro loculares, e área dos cistos espermatogênicos (espermatogônias, espermátocitos e espermatozoides) nas diferentes condições experimentais. Em relação à área locular não houve diferença entre o controle (CT), grupo natural (GN), 25 e 50%. No entanto, esses grupos foram diferentes de 75 e 100%. Já para o diâmetro desses lóculos, a diferença foi entre o GN, 50%, 75% e 100% e entre CT e 75%. Considerando os cistos espermatogênicos individualmente, para área dos cistos de espermatogônias primárias, GN, CT e 50% foram semelhantes, porém diferentes de 75%. Já para os cistos de espermatogônias secundárias a diferença foi entre o GN, CT e 25% e entre o CT e 100%. Para espermátocitos primários, houve diferença entre CT, 50% e 75% de vinhaça. Já para os espermátocitos secundários, tanto o GN como o CT apresentaram diferença significativa em relação aos grupos de exposição, 25%, 50%, 75% e 100%. E, finalmente, em relação aos espermatozoides, houve diferença significativa entre o grupo controle, 75% e 100%. As respostas evidenciadas indicam alteração nos padrões testiculares, quanto a área ocupada pelas células da linhagem germinativa quando os animais são submetidos vinhaça, permitindo concluir que a exposição de *L. fuscus* a este contaminante, pode comprometer os processos reprodutivos dos anuros.

**Palavras-chave:** Anfíbios, Reprodução, Células germinativas, Vinhaça, Cana-de-açúcar, Qualidade ambiental.

### 3.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, as áreas agrícolas estão em constante expansão e, culturas como soja, milho e cana-de-açúcar são as que requerem maiores extensões de terra e grande quantidade de pesticidas, e como consequência, esses cultivos geram resíduos potencialmente poluidores (Correia et al., 2017). O Brasil atualmente é considerado o maior produtor mundial de cana-de-açúcar utilizando mais de 8 milhões de hectares plantados (CONAB., 2020), e, destaca-se pelo uso do etanol, que ambientalmente seria boa opção para diminuir o uso de combustíveis fósseis reduzindo a liberação de gases de efeito estufa (Moraes et al., 2015; Carvalho et al., 2017). Porém, a produção industrial gera grandes quantidades de resíduos, principalmente a vinhaça, que pode ser prejudicial ao meio ambiente (Moraes et al., 2015).

A vinhaça é um composto que possui grande quantidade de matéria orgânica, pH ácido, sulfato e potássio, além de possuir características corrosivas (Fuess e Garcia, 2014; Correia et al., 2017). Por volta de 1985, a indústria de etanol no Brasil regulamentou o descarte da vinhaça para ser reutilizada nos canaviais (Filoso et al., 2015) por seu potencial de adubação. Esse processo, conhecido como fertirrigação melhora o rendimento da cultura devido a vinhaça atuar como fertilizante (Correia et al., 2017), que para além de auxiliar na adubação do solo, diminui o uso de produtos químicos; porém, as dosagens variam para cada tipo de solo (Silva et al., 2007). Quando aplicada no solo, as altas concentrações de vinhaça podem comprometer sua estrutura e contaminar corpos d'água (Fuess e Garcia, 2014), causando eutrofização do ambiente aquático (España Gamboa et al., 2011) devido ao desequilíbrio dos elementos minerais e orgânicos. Também pode ocorrer lixiviação de íons (Christofolletti et al., 2013) alterando o funcionamento desse ecossistema. Outra preocupação é de que a exposição a esse escoamento possa levar a prejuízos no desenvolvimento sexual das larvas ou até mesmo na atividade reprodutiva de anfíbios adultos por meio da exposição a compostos conhecidos como desreguladores endócrinos (Orton e Tyler., 2015).

Ainda no que tange à cana-de-açúcar, a produção de etanol vem aumentando significativamente, podendo acarretar o incremento do volume da vinhaça (Dias et al., 2015) e a preocupação quanto ao destino da descarga desse efluente. Grande parte das usinas não dispõem de um sistema correto para a distribuição da vinhaça, o que pode acarretar a poluição de águas subterrâneas (Dias et al., 2015), gerando sério problema ambiental, com possíveis impactos aos organismos não alvos. Além disso, a vinhaça tem em sua composição uma variedade de metais pesados, que pode acarretar a adição de metais no solo (Colin et al., 2016). E, mesmo em concentrações baixas, os metais pesados podem ser tóxicos para os animais e plantas (Mohan e Singh., 2002).

Segundo a União Internacional para Conservação da Natureza, cerca de 40% das espécies de anfíbios do mundo encontram-se ameaçadas, número este maior que o de mamíferos (26%) e aves (14%) (IUCN, 2021). Dentre as causas dessa ameaça, estão, não somente as atividades industriais, mas, também a grande expansão da agricultura, cujos resíduos químicos potencialmente atingem os cursos hídricos e afetam negativamente os organismos que vivem nesse ambiente (Moresco et al., 2014). Assim, ao se considerar que os anuros se reproduzem em ambiente aquático, torna-se evidente a sua vulnerabilidade à contaminação ambiental (Santos e Oliveira, 2008).

O aparelho reprodutor dos anuros é constituído de testículos pares com formato oval ou esférico, localizados na região ventral da cavidade corporal (Santos e Oliveira, 2007). A arquitetura testicular é apresentada por lóculos seminíferos dentro os quais se desenvolvem as diferentes células da linhagem germinativa. Estas células apresentam-se organizadas em cistos germinativos, os quais são formados pelos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli (Santos e Oliveira, 2008; Rezende et al., 2021). Cada cisto contém células no mesmo estágio espermatogênico, estabelecendo dessa forma uma sincronia em seu desenvolvimento; uma característica comum dos anfíbios (Santos e Oliveira, 2008; Leite et al., 2015). Neste arranjo celular, é possível observar que as espermatogônias primárias e secundárias, que compõem o estágio inicial da espermatogênese se localizam próximas à parede do lóculo, e conforme acontece o processo de diferenciação celular dão origem aos espermatócitos primários, os quais se dividem e formam os espermatócitos secundários. Esses, por sua vez sofrem outra divisão e formam as espermatídes, que se alongam e formam os feixes de espermatozoides (Santos et al., 2011). Conforme se desenvolve o processo de diferenciação celular, as células vão sendo direcionadas ao lúmen do lóculo, em que são encontrados os espermatozoides livres.

Nesse sentido, foi proposto, neste trabalho, avaliar os parâmetros morfológicos reprodutivos de uma espécie de anuro nativa do Brasil, *Leptodactylus fuscus* (rã-assoviadora), para entender as potencialidades dos efeitos da vinhaça na reprodução de anuros presentes em ambientes em que a vinhaça é descartada ou usada como fertilizante natural. Este estudo é pioneiro na tentativa de compreender os efeitos da vinhaça em órgão reprodutivo desses animais. Assim, este trabalho expande a discussão sobre o descarte desse resíduo, gerando alerta às indústrias sucroalcooleiras para os impactos adversos ao meio ambiente.

### 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

#### *A espécie e coleta dos animais*

A espécie *Leptodactylus fuscus* (Schneider, 1799), conhecida popularmente como rã-assoviadora (Vaz-Silva et al., 2020) é típica de áreas abertas e considerada bem adaptada a ambientes degradados (Sugai et al., 2012; IUCN, 2021). Seu período reprodutivo começa com o início das primeiras chuvas e permanece durante toda a estação chuvosa (Sugai et al., 2012; Vaz-Silva et al., 2020), e a reprodução ocorre em pequenas tocas nas margens de lagoas temporárias e permanentes e nas margens de pântanos rasos (Sugai et al., 2012; IUCN, 2021).

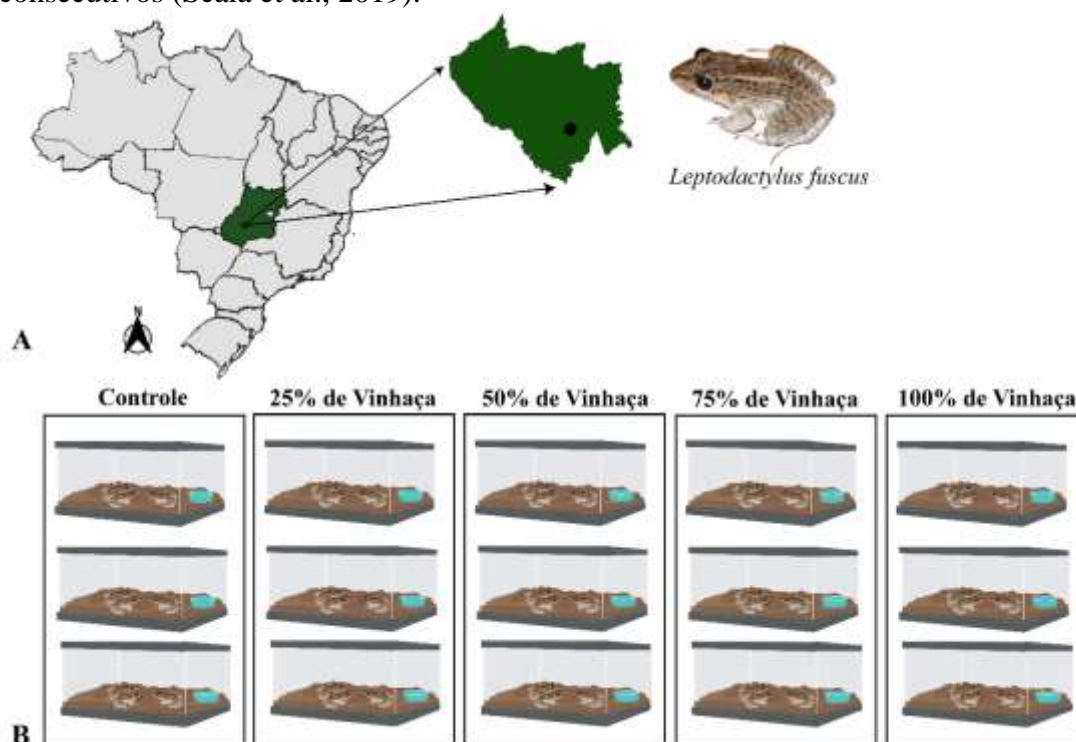
Para o estudo, 54 (cinquenta e quatro) indivíduos machos de *Leptodactylus fuscus*, foram capturados na região de cultivo agrícola de cana-de-açúcar, município de Paraúna, estado de Goiás, Brasil, para a avaliação (-17.307062S; -50.530202E) (Fig. 1A). As capturas foram feitas em ambiente natural, através de busca ativa por identificação da vocalização dos animais.

#### *Delineamento experimental*

Após a coleta, os animais foram encaminhados para o Laboratório de Ecotoxicologia e Sistemática Animal (EcotoxSA) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde. Os animais (n=9) do grupo natural (GN) foram eutanasiados imediatamente após a coleta para uma análise *in situ* da



condição ambiental e natural nos quais estavam inseridos. Os demais indivíduos, foram aclimatados em laboratório por sete dias (Pérez-Iglesias et al., 2016) antes do início dos experimentos. Após este período os espécimes foram divididos aleatoriamente em cinco grupos (Fig. 1B): Grupo controle (CT), grupo concentração 1 (Vinhaça a 25%), grupo concentração 2 (Vinhaça a 50%), grupo concentração 3 (Vinhaça a 75%) e grupo concentração 4 (Vinhaça a 100%), totalizando 9 (nove) indivíduos por grupo. Cada grupo foi constituído por 3 réplicas, com 3 animais em cada terrário experimental. Os animais foram expostos a diferentes concentrações de vinhaça com auxílio de borrifadores manuais em dias alternados, e o volume de vinhaça usado foi estabelecido a partir do empregado por Silva et al. (2006), cuja aplicação foi de 500 m<sup>3</sup>/ha/ano. A partir dessa orientação, foi considerada a superfície dos terrários experimentais (0,0736 m<sup>2</sup>) como a área de aplicação e foram utilizados 2 kg de solo limpo (isento de contaminação), obtido em um fragmento florestal preservado. O período experimental foi de 14 dias consecutivos (Scaia et al., 2019).



**Figura 1.** Área de coleta (A) e apresentação esquemática do desenho experimental estabelecido no estudo (B).

#### *Análise de água*

Foram coletadas amostras de água no local de captura dos animais para realização das análises físico-químicas. A amostra foi encaminhada para um laboratório privado no município de Rio Verde, Goiás, Brasil. Os parâmetros foram avaliados com base nos padrões definidos pela Resolução CONAMA n° 357/2005 - Classe II e decreto 1.745 / 1979.

#### *Avaliação morfológica e histológica dos testículos*

Para as análises morfológicas, os animais foram anestesiados e mortos por excesso de benzocaína (5mg/L). Os testículos foram retirados, pesados, medidos e fixados em metacarn por 3 horas. Os animais foram fixados em formol e depositados no Laboratório de Ecotoxicologia e Sistemática Animal (EcotoxSA) como material testemunho. Medidas do comprimento dos testículos foram feitas para cada indivíduo por meio de paquímetro digital com precisão de 0,1mm e o peso foi obtido através de balança analítica de precisão (0,001g). Após a retirada dos testículos dos animais, medidas do índice gonadossomático foram registradas. Este índice consiste na massa dos testículos (direito e esquerdo somados) dividida pela massa total do animal (Santos e Oliveira, 2008; Rezende et. al., 2021).

Posteriormente a obtenção dos dados morfológicos, os testículos foram encaminhados à rotina histológica, para desidratação em série crescente de álcool e a inclusão em resina (Leica Historesin embedding Kit). Com o auxílio do micrótomo rotativo, 25 cortes transversais de 5 µm foram depositados sobre as lâminas e coradas em hematoxilina e eosina (H-E). Após a montagem, as lâminas foram levadas ao microscópio óptico de luz acoplado à câmera digital para análise e fotodocumentação. Foram selecionados 25 lóculos seminíferos inteiros, de forma aleatória para avaliação dos parâmetros: área e maior diâmetro locular e área dos cistos espermatogênicos (espermatogônias primárias, espermatogônias secundárias, espermatócitos primários, espermatócitos secundários e espermatozoides) categorizados de acordo com Santos e Oliveira (2008) e Rezende et al. (2021). As análises morfométricas foram conduzidas com auxílio do software ImagePro-Plus 6.0.

#### *Análise estatística*

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e de homogeneidade das variâncias de Levene. Foram realizadas comparações entre as 4 concentrações, o grupo controle (CT) e o grupo natural (GR) para todos os parâmetros. Para comparar as diferentes concentrações testadas em relação a medidas biométricas, índice gonadossomático, área locular e área dos cistos espermatogênicos, uma análise de variância (teste ANOVA one-way) foi executada, seguida pelo teste post hoc de Tukey. Quanto aos dados não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post hoc de Dunn foi aplicado. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo em todas as análises.

#### *Obtenção e Análise da vinhaça*

A vinhaça foi obtida em usina de cana-de-açúcar no município de Paraúna, Goiás (-17.307062S; -50.530202E) e encaminhada para um laboratório privado em Rio Verde, Goiás, onde foram realizadas análises do composto como ph, dureza, condutividade, amônia, cálcio, enxofre, potássio, sódio, nitrogênio, fósforo e metais (Correia et al., 2017).

#### *Nota Ética*

Todos os procedimentos realizados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do IF Goiano (CEUA nº 9065120820) sob licença do SISBIO/ICMBIO (n. 34485).

### 3.3 RESULTADOS

#### *Análise da vinhaça*

As análises físico-químicas da vinhaça são apresentadas na tabela 1. Foram observados pH ácido e presença de metais, como alumínio, bário, cobre, cromo, ferro, manganês, níquel e zinco. As concentrações de nitrogênio, ferro e manganês estavam acima do preconizado pela legislação CONAMA 430/11 que trata dos critérios para a descarga de águas residuais em corpos d'água. Já o zinco, cobre, níquel, bário, arsênio, chumbo, cádmio, mercúrio e estanho se mostraram inferiores ao permitido. Referente a fósforo, potássio, sódio, magnésio, alumínio, titânio, cobalto e enxofre não se pode fazer inferências, pois a resolução CONAMA 430/11 não estabelece valor para estes parâmetros.

**Tabela 1.** Parâmetros físico-químicos da análise da vinhaça.

<b>Parâmetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidade</b>	<b>LQ</b>	<b>CONAMA 430/2011</b>
pH	<b>5,69</b>	-	1a14	5 a 9
Dureza	<b>1091,6</b>	mg/LCaCO <sub>3</sub>	25	NR
Condutividade	<b>5241,000</b>	µS/cm	5	NR
Amônia	<b>298,657</b>	mg/LN-NH <sub>3</sub>	2	NR
Cálcio	<b>171,082</b>	mg/LCaCO <sub>3</sub>	10,0000	NR
Potássio	<b>619,824</b>	mg/L-K	10,0000	NR
Nitrogênio total	<b>312,5*</b>	mg/L-N	75	20,0
Fósforo total	<b>57,937</b>	mg/L-P	0,0500000	NR
Sódio	<b>170,207</b>	mg/L-Na	10	NR
Ferro	<b>141,2924*</b>	mg/L-Fe	0,05	15,0
Zinco	<b>0,8157</b>	mg/L-Zn	0,005	5,0
Cobre	<b>0,05</b>	mg/L-Cu	0,005	1,0
Níquel	<b>0,021</b>	mg/L-Ni	0,005	2,0
Magnésio	<b>76,3355</b>	mg/LCaCO <sub>3</sub>	1	NR
Manganês	<b>1,8505*</b>	mg/LMn	0,005	1,0
Bário	<b>0,1085</b>	mg/L	0,0050	5,0
Arsênio	<b>&lt;0,0050</b>	mg/L	0,0050	0,5
Chumbo	<b>&lt;0,0050</b>	mg/L	0,0050	0,5
Cádmio	<b>&lt;0,0010</b>	mg/L	0,0010	0,2
Mercúrio	<b>&lt;0,000200</b>	mg/L	0,000200	0,01
Alumínio	<b>11,2296</b>	mg/L	0,0500	NR
Titânio	<b>0,2122</b>	mg/L	0,00500	NR
Estanho	<b>&lt;0,0050</b>	mg/L	0,0050	4,0
Cromo	<b>0,0459</b>	mg/L	0,0050	-
Cobalto	<b>&lt;0,0030</b>	mg/L	0,0030	NR
Enxofre	<b>44,63</b>	mg/L	1,000	NR

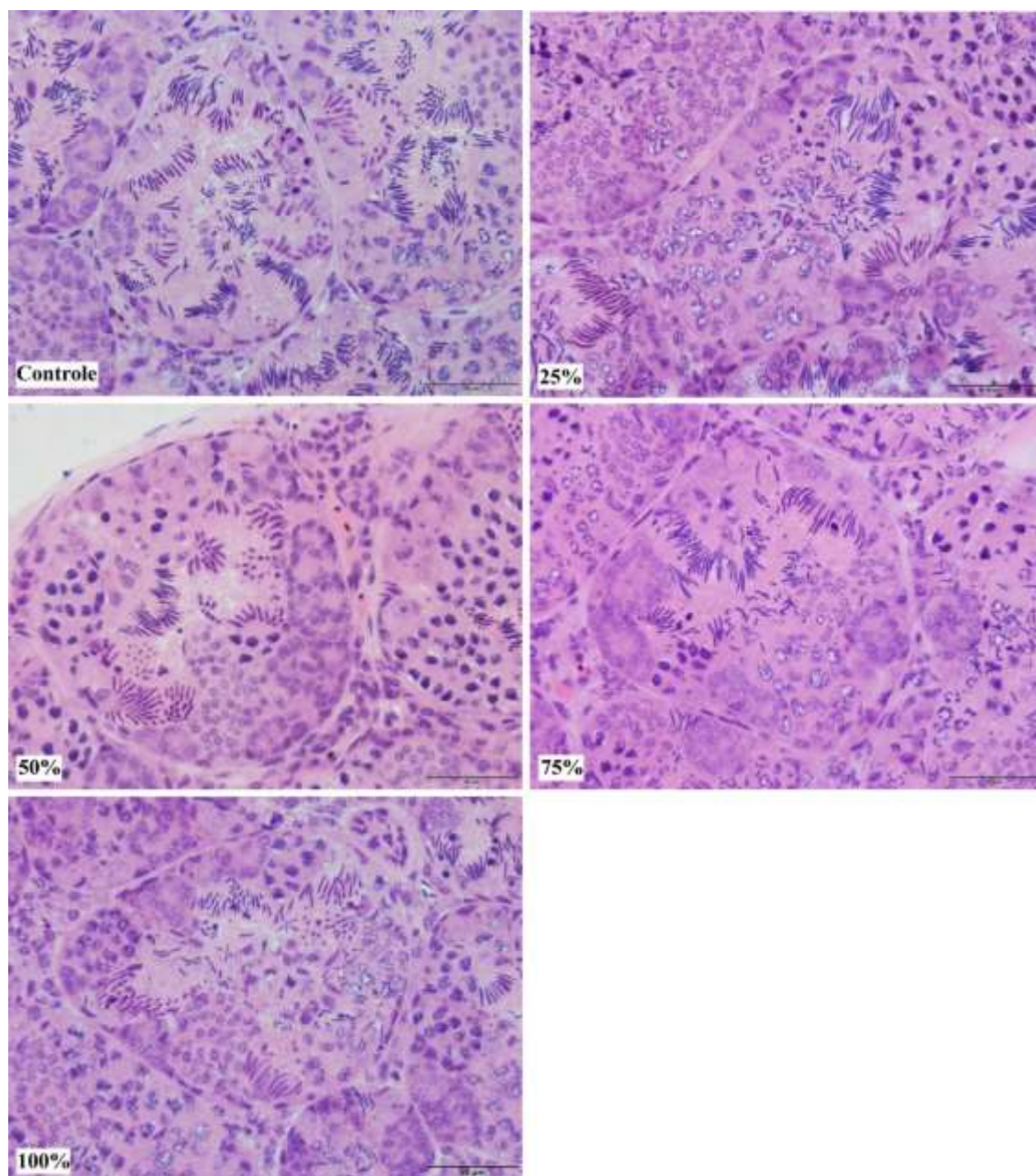
\* indicam valores acima da legislação brasileira (CONAMA). NR: Não há recomendação pela legislação, pH: Potencial hidrogeniônico; LQ: Limite de Quantificação.

### *Parâmetros físico-químico da água*

Na análise físico-química da água não foram identificados pesticidas acima do limite estabelecido pela legislação brasileira (Material Suplementar). O fósforo estava acima do valor permitido pela legislação brasileira (Resolução CONAMA 357/2005). O fósforo é um mineral importante para diversas funções metabólicas e fisiológicas nos organismos, no entanto, em altas concentrações pode causar eutrofização do ambiente aquático (Cagol et al., 2016).

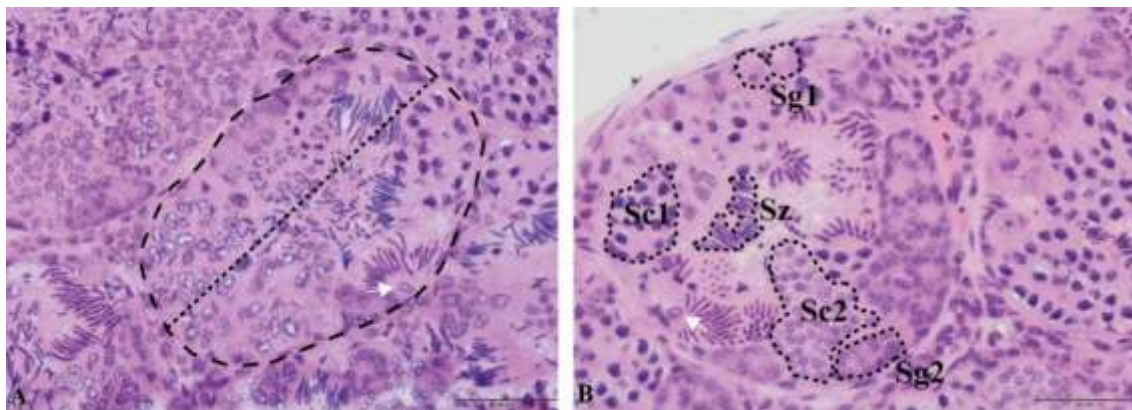
### *Avaliação Morfológica e histológica*

A morfologia testicular apresentou-se semelhante em todos os animais dos diferentes tratamentos (Fig. 2). A Fig. 3 mostra as células de linhagem germinativas, em cistos produzidos pelas células de Sertoli (setas). Todos os tipos celulares da linhagem germinativa foram observados, independente do grupo de exposição. Para as medidas biométricas, não houve diferença significativa para o índice gonadossomático comparando entre os tratamentos da vinhaça ( $p = 0.3083$ ).



**Figura 2.** Ilustração histológica representativa da ação de diferentes concentrações de vinhaça no parênquima testicular de *L. fuscus*. Coloração H-E. Barras: 50 $\mu$ m.

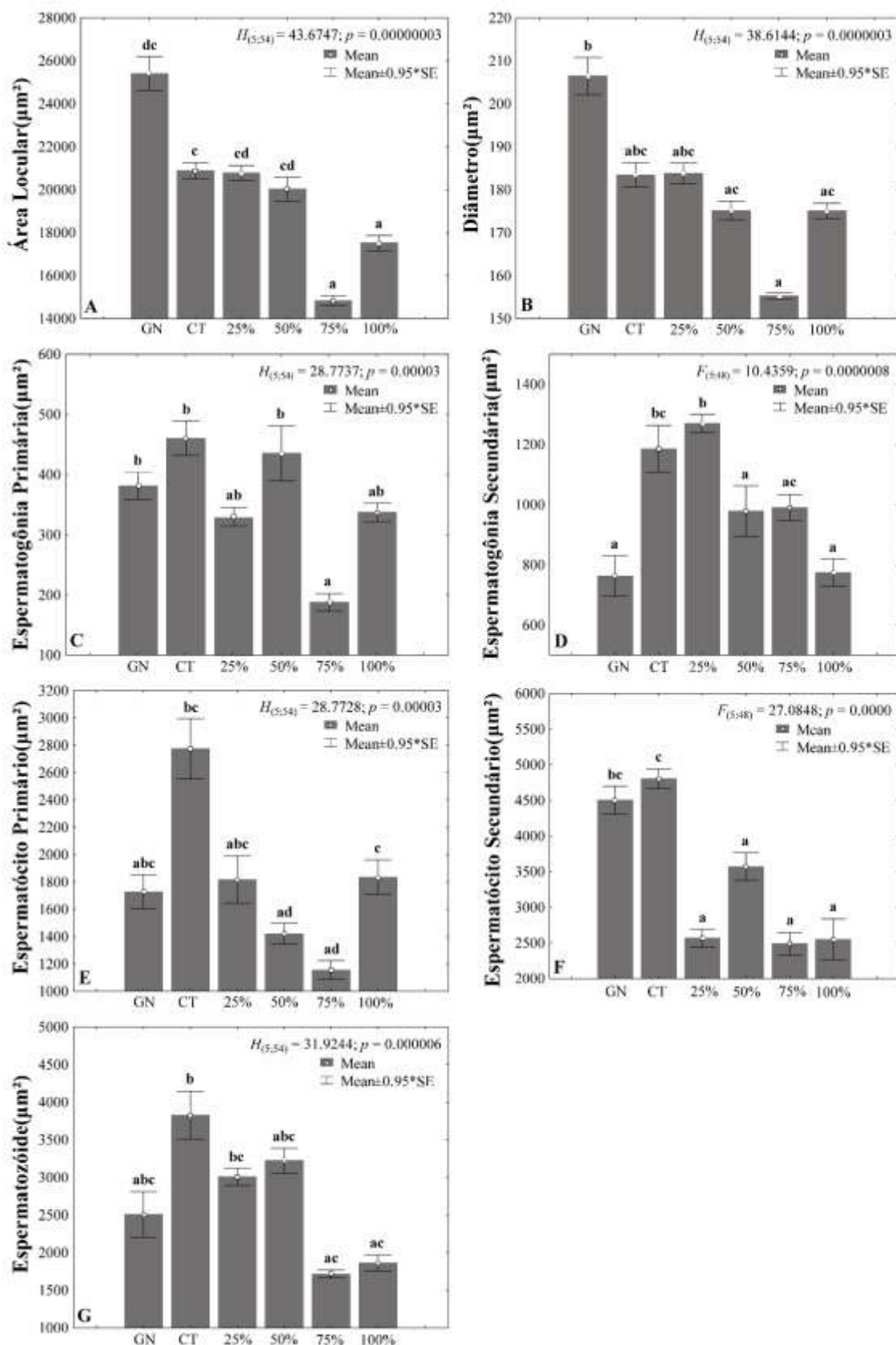




**Figura 3.** Histologia do tecido testicular de *Leptodactylus fuscus*. A: Detalhe da área (círculo tracejado em preto) e diâmetro (linha tracejada escura) dos lóculos seminíferos; B: Diferentes tipos de células da linhagem espermática. Sg1: Espermatogônia primária; Sg2: Espermatogônia secundária; Sc1: Espermatócito Primário; Sc2: Espermatócito Secundário; Sz: Espermátides e Espermatozoides. Coloração H-E. Barras: 50 $\mu$ m.

Em relação à área locular, não houve diferença entre o GN, CT, 25 e 50%. Em contraste, essas áreas foram diferentes de 75 e 100% (Fig. 4A). O diâmetro desses lóculos, no caso do GN foi significativamente diferente em relação a 50, 75 e 100% (Fig. 4B). Considerando os componentes germinativos analisados individualmente, os resultados foram os seguintes: para área dos cistos de espermatogônias primárias o GN, CT, 25% e 50% foram semelhantes, porém diferentes de 75% (Fig. 4C), já para os cistos de espermatogônias secundárias o controle e 25% foram diferentes do GN, 50 e 100% (Fig. 4D).

Para espermatócitos primários, houve diferença entre o grupo controle em relação a 50 e 75% de vinhaça, e entre 75% e 100% (Fig. 4E). Para espermatócitos secundários não houve diferença significativa entre o GN e CT, no entanto, estes estiveram diferentes em relação a 25%, 50%, 75% e 100% (Fig. 4F). E, finalmente, em relação aos espermatozoides, a diferença esteve entre o grupo controle, 75 e 100% (Fig. 4G).



**Figura 4.** Comparação dos parâmetros testiculares entre os animais do grupo GN (animais coletados *in situ*), controle (CT), e os grupos de exposição com concentrações a 25%, 50%, 75% e 100% de vinhaça. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos. Um  $p < 0.05$  foi considerado significativo.

### 3.4 DISCUSSÃO

Neste estudo foi possível identificar que a exposição à vinhaça pode comprometer a dinâmica de desenvolvimento das células germinativas em machos de *Leptodactylus fuscus*, porém sem alteração no índice gonadossomático.

Ainda no presente estudo, foi investigado a presença de metais e outros elementos químicos na composição da vinhaça, uma vez que essa substância é amplamente usada no processo de fertirrigação do solo (Fuess et al., 2017). Assim, por meio de um processo trivial de lixiviação, os elementos presentes na constituição da vinhaça, podem tornar biodisponíveis para outros sistemas ambientais, tal como o ambiente aquático, de uso muito comum aos anuros por suas características morfofisiológicas. Dessa forma, chama-se a atenção para o impacto direto ou indireto desses elementos para a fauna selvagem, cujos estudos são incipientes, principalmente para o problema aqui investigado.

Nesse contexto, a fertirrigação contínua com vinhaça pode causar fertilização excessiva do solo, pelas concentrações de nitrogênio e fósforo (Fuess et al., 2017), e os elementos como zinco, cobre e níquel, embora sejam importantes para o desenvolvimento vegetal e animal, em níveis elevados, podem ser tóxicos (Fuess et al., 2017). Não obstante, em relação ao nitrogênio, fósforo e potássio, sabe-se que são elementos que podem causar eutrofização em corpos d'água (Camargo e Alonso, 2006; Cagol et al., 2016; Macedo e Tavares., 2018). Entretanto, apenas o nitrogênio é citado na resolução CONAMA 430/11 que trata dos critérios para a descarga de águas residuais em corpos d'água, estando acima do limite permitido na legislação. De acordo com Camargo e Alonso (2006), o nitrogênio é um elemento químico abundante, importante para muitas biomoléculas, no entanto, altos níveis no ambiente podem levar a saturação de nitrogênio, e causar efeitos adversos aos organismos, podendo ser tóxico as plantas, causar eutrofização do ecossistema aquático, acidificação do solo e alterações químicas na água (Randall e Tsui, 2002; Camargo e Alonso, 2006). Além disso, a poluição por nitrogênio, está sendo apontada como uma das causas do declínio de anfíbios no mundo (Shinn et al., 2013).

Aliado a isso, cita-se a descarga de efluentes industriais e esgotos domésticos, os quais inserem metais pesados no ambiente (Ali et al., 2019). Os metais são considerados perigosos pelas características de persistência, bioacumulação e toxicidade. Sabe-se que a toxicidade dos metais pode interferir no funcionamento de diferentes órgãos, tecidos e sistemas, no entanto, os mecanismos pelos quais atuam em diferentes organismos são pouco explorados e muito complexos (Zhang et al., 2018; Ali et al., 2019). O ferro é abundante no meio ambiente e ocorre de forma natural no ambiente aquático, sendo considerado um elemento vital, participando de processos metabólicos, síntese de DNA e transporte de oxigênio (Gurzau et al., 2003). No entanto, a quantidade de ferro encontrada na análise da vinhaça também se mostrou acima do permitido na legislação, podendo acarretar efeitos tóxicos aos organismos, pois o excesso de ferro pode levar a danos nos tecidos, perturbar o metabolismo normal e osmorregulação e causar aumento no estresse oxidativo (Gurzau et al., 2003). Em girinos de *Bufo boreas*, a concentração de 3831 µg/L de ferro causou diminuição na massa e na sobrevivência dos animais (Cadmus et al., 2018).

O manganês por exemplo, presente na análise química da vinhaça e acima do permitido na legislação, causa efeitos negativos em populações expostas a esse metal (Cheng et al., 2003; Hernroth et al., 2004; Adedara et al., 2017). Estudos relataram que concentrações altas de manganês causaram comprometimento da captação e deposição



de cálcio em alevinos de *Salmo trutta* (Reader et al., 1988), afetaram a resposta imune de *Nephrops norvegicus* (Hernroth et al., 2004) e está associado com disfunção reprodutiva em humanos e animais (Adedara et al., 2017). Em mamíferos, esse metal interferiu na fertilidade de ratos machos em exposição crônica (Cheng et al., 2003). Contudo, registros da ação desse metal para os anuros ainda são escassos e, portanto, estudos de natureza ecotoxicológica são importantes para alertar os danos precoces, como observado nas células germinativas nesse estudo.

Cita-se ainda que os metais pesados, através da ação antioxidante podem inibir o crescimento e desenvolvimento de larvas de anfíbios, afetando sua sobrevivência através da interrupção da via do hormônio da tireoide (Wang et al., 2016; Guo et al., 2018). Zhang et al. (2018), indicam que mesmo em baixos níveis, o mecanismo tóxico dos metais pode causar dano oxidativo no DNA, e inibir a reprodução de anfíbios. No entanto, é desconhecido como a poluição por metais pode afetar a estratégia reprodutiva de anfíbios a longo prazo (Zhang et al., 2018).

No bivalve *Anodonta anatina*, o cádmio, mesmo em concentrações baixas e semelhantes ao presente no estudo, afetou a enzima anidrase carbônica nos tecidos testados, essa enzima desempenha papel importante na osmorregulação e no metabolismo (Ngo et al., 2011). Esse metal, mesmo com nível baixo, interferiu no comportamento de vocalização em anfíbios, em espécimes de *Pelophylax nigromaculata* (Huang et al., 2015). O cádmio também atua como um desregulador endócrino e pode prejudicar a reprodução de anfíbios, diminuindo o nível de testosterona e afetando o desenvolvimento laríngeo (Huang et al., 2015; Duan e Huang., 2016), e alterando a espermatogênese de anuros (Hayes et al., 2011).

Além do cádmio, outros metais como, chumbo, mercúrio, arsênio e cromo podem ser tóxicos mesmo em níveis muito baixos (Zhang et al., 2018; Ali et al., 2019), e os anfíbios podem se contaminar por diferentes vias, seja através do ambiente contaminado ou pela ingestão de presas contaminadas (Zhang et al., 2018). Segundo Ali et al. (2019), metais são elementos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos, podendo induzir o estresse oxidativo em organismos, o que pode levar ao desenvolvimento de doenças e anormalidades.

Apesar de não haver recomendação de limite permitido para amônia na legislação, esta é considerada altamente tóxica (Mann et al., 2009). De acordo com Camargo e Alonso (2006), a amônia é tóxica em animais aquáticos, principalmente peixes, e pode levar a redução da atividade alimentar, fecundidade e sobrevivência. Peixes e invertebrados se mostraram mais sensíveis a amônia, tendo os valores de LC50 de 96 horas entre 0,13 e 0,80 mg NH<sub>3</sub>/L (Camargo e Alonso., 2006), concentração bem menor do que foi encontrado na análise da vinhaça do presente estudo. Nesse contexto, embora não se possa traçar relação direta entre excesso de manganês, ferro, fósforo e nitrogênio e de demais elementos presentes na análise da vinhaça às alterações reprodutivas evidenciadas neste estudo para *L. fuscus*, há fortes indicativos que a perturbação ambiental, pelo incremento dessas substâncias tóxicas no ambiente podem ter promovido prejuízo reprodutivo como observado no presente estudo. Contudo, reforça-se ainda que mesmo que os demais elementos tenham valores dentro do permitido em legislação, não há qualquer investigação da ação da vinhaça em anuros, e em especial dos efeitos da subdosagem desse composto para a fauna selvagem.

Não obstante, não se encontrou sinais de anormalidade na arquitetura testicular e alterações nos índices biométricos do testículo. No entanto, foi possível notar que para área e diâmetro locular houve, de modo geral, redução dessas estruturas quando comparadas ao grupo GN e controle. Rezende et al. (2021) encontraram lóculos maiores na região agrícola para a espécie *Physalaemus cuvieri* e *Boana albopunctata* quando

comparada a uma unidade de conservação, no entanto a espécie *Dendropsophus minutus* respondeu de forma inversa, em que a área locular foi menor na região agrícola, em relação à unidade de conservação. Tal resultado foi semelhante a Gregório et al. (2016), que encontrou diminuição da área locular de *Rhinella schneideri* expostos à flutamina. Neste sentido, sugerindo que animais expostos a poluentes ambientais de origem agrícola, podem ter alterações na estrutura testicular em função da exposição.

Quanto ao desenvolvimento dos cistos germinativos, observa-se que houve mudanças significativas nas características morfométricas entre os tratamentos e controle. Em relação à espermatogônias primárias e secundárias, de modo geral, houve diminuição na área ocupada pelos cistos em relação as concentrações de exposição e ao GN. Para espermátócitos primários também é possível observar diminuição da área ocupada quando comparado o controle com o GN e os grupos de exposição. A área ocupada por espermatozoide foi significativamente maior no grupo controle em comparação com as concentrações mais altas de vinhaça. A diminuição de espermatozoides é provável resultado do efeito prejudicial da vinhaça, podendo comprometer a reprodução desses animais. Tais resultados são semelhantes a McCoy et al. (2017), que encontraram para espécie *Rhinella marina*, uma diminuição de espermátócitos primários e secundários e espermátides em ambientes com maiores atividades agrícolas quando comparados a locais não agrícolas.

Gregório et al. (2016) encontraram aumento nas espermatogônias e espermátócitos, e diminuição na área ocupada por espermatozoides de *Rhinella schneideri* expostos à flutamina., o que permite inferir que as espécies respondem de diferentes formas aos poluentes ambientais, e isso depende da suscetibilidade de cada espécie (Rezende et al., 2021). É observado que muitos estudos evidenciam alterações prejudiciais à saúde, uma vez que os contaminantes podem afetar diferentes tecidos e órgãos do corpo e, especialmente, o sistema reprodutivo (Fattahi et al., 2012). Além disso, estes produtos podem afetar o desenvolvimento gonadal e a produção de hormônios em anfíbios, sendo considerados uma das causas das alterações do desenvolvimento sexual na vida selvagem (Bernabò et al., 2011).

Pouco se sabe sobre mecanismos fisiológicos pelos quais a espermatogênese de sapos de ambiente agrícola é alterada (McCoy et al, 2017). Estes resultados demonstram que a função gonadal é alterada em relação aos animais do grupo controle e os animais dos grupos de exposição. Apesar dos resultados serem semelhantes entre o GN e o controle, a área e diâmetro dos lóculos seminíferos dos animais coletado *in situ* são maiores, porém, nota-se que a área ocupada pelos cistos germinativos é menor quando comparado ao controle. Assim, apesar do lóculo ser grande, sua capacidade não é preenchida com os cistos germinativos. Essa alteração pode potencialmente colocar as populações em risco, prejudicando sua capacidade de reprodução e consequente manutenção das espécies.

Não existem estudos anteriores com anfíbios avaliando o efeito direto da vinhaça nas células germinativas. No entanto, foi observado que em peixes esse produto já causou danos no DNA (Correia et al., 2017) e danos histopatológicos no fígado de *Oreochromis niloticus* (Marinho et al., 2014). Além de ser considerada altamente tóxica em animais, plantas e microrganismos (Christofolletti et al., 2013a). Em ensaios de *Allium cepa*, a vinhaça apresentou efeitos genotóxicos nas células meristemáticas, mesmo após o bioprocessamento das amostras por um invertebrado terrestre (Christofolletti et al., 2013b). Além disso, é comprovado que muitos agroquímicos utilizados na cultura de cana-de-açúcar possuem potencial para desregulação endócrina, incluindo metais pesados (Iavicoli et al., 2009), e pode levar a danos no desenvolvimento e manutenção das gônadas (Trudeau et al, 2020), acarretando alterações na espermatogênese dos animais em

ambientes agrícolas, mesmo sem variação morfológica (McCoy et al., 2017; Rezende et al., 2021). Visto isso, ao se considerar que muitas espécies se reproduzem em ambientes próximos ou inseridos na matriz agrícola, suas larvas podem entrar em contato com esses contaminantes em algum momento de seu desenvolvimento (Sanchez et al., 2014).

Em relação a contaminantes ambientais, Mathew (2013) relatou que os testículos de sapos expostos a contaminante em condições laboratoriais sofreram alterações negativas, além da morte causada em alguns organismos. Além disso, Sanchez et al. (2014) sugerem que o uso de agrotóxicos em agroecossistemas e ambientes próximos está associado com a diminuição do desenvolvimento testicular. Oka et al. (2008) com a preocupação de que os agroquímicos possam ser capazes de interromper o desenvolvimento e funcionamento do sistema reprodutivo em anfíbios, realizaram análise com o herbicida atrazina e demonstraram que este está associado à feminilização de machos anuros na natureza. Assim, estes compostos químicos são capazes de alterar o desenvolvimento gonadal em machos, atuando como disruptores endócrinos na maioria das classes de vertebrados (Hayes et al., 2011), causando, desta forma, preocupações em relação ao sucesso reprodutivo das espécies que habitam agroecossistemas.

### 3.5 CONCLUSÃO

Estes resultados demonstram que a vinhaça de cana-de-açúcar causa alterações na dinâmica do desenvolvimento das células germinativas de anuros da espécie *Leptodactylus fuscus*, uma vez que, em geral, os parâmetros testiculares avaliados apresentaram diminuições entre o controle e os grupos de exposição à vinhaça. Tal alteração pode interferir na capacidade de reprodução, causando impactos graves nas próximas gerações, além de implicações ecológicas e evolutivas. É importante estabelecer a quantidade de vinhaça a ser usada na fertirrigação para que não cause risco a essas populações. Considerando a diversidade e endemismo de anuros no Brasil e os riscos de diminuição populacional que esses animais enfrentam, este estudo, reforça a importância do monitoramento ecotoxicológico e o uso de biomarcadores como ferramenta de auxílio a conservação.

### 3.6 REFERÊNCIAS

Adedara, I. A., Subair, T. I., Ego, V. C., Oyediran, O., Farombi, E. O. (2017). Chemoprotective role of quercetin in manganese-induced toxicity along the brain-pituitary-testicular axis in rats. *Chemico-biological interactions*, 263, 88-98. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.12.019>

Ali, H., Khan, E., Ilahi, I. (2019). Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *Journal of chemistry*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6730305>

Bernabò, I., Gallo, L., Sperone, E., Tripepi, S., Brunelli, E. (2011). Survival, development, and gonadal differentiation in *Rana dalmatina* chronically exposed to chlorpyrifos. *Journal of Experimental Zoology*, 315, 314-327. <https://doi.org/10.1002/jez.678>

Borges, R. E., de Souza Santos, L. R., Benvindo-Souza, M., Modesto, R. S., Assis, R. A., & de Oliveira, C. (2019). Genotoxic evaluation in tadpoles associated with agriculture in the Central Cerrado, Brazil. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 77(1), 22-28. <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00623-y>

Cadmus, P., Brinkman, S. F., & May, M. K. (2018). Chronic toxicity of ferric iron for North American aquatic organisms: Derivation of a chronic water quality criterion using single species and mesocosm data. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 74(4), 605-615. <https://doi.org/10.1007/s00244-018-0505-2>

Cagol, L., Zadinelo, I. V., Baldan, L. T., Ballester, E. L. C., Pontes, T. C., Dos Santos, L. D. (2016). Concentrações letais de fósforo na água para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Iguazu*, 5(3), 71-82. <https://doi.org/10.48075/actaiguaz.v5i3.15847>

Camargo, J. A., & Alonso, Á. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment international*, 32(6), 831-849. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.002>

Cheng, J., Fu, J. L., & Zhou, Z. C. (2003). The inhibitory effects of manganese on steroidogenesis in rat primary Leydig cells by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Toxicology*, 187(2-3), 139-148. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00063-5](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00063-5)

Christofoletti, C. A., Escher, J. P., Correia, J. E., Marinho, J. F. U., & Fontanetti, C. S. (2013A). Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. *Waste management*, 33(12), 2752-2761. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09.005>

Colin, V. L., Cortes, Á. A. J., Aparicio, J. D., & Amoroso, M. J. (2016). Potential application of a bioemulsifier-producing actinobacterium for treatment of vinasse. *Chemosphere*, 144, 842-847. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.064>

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>> Acesso em: 18 de novembro de 2021.

Correia, J. E., Christofoletti, C. A., Ansoar-Rodríguez, Y., Guedes, T. A., & Fontanetti, C. S. (2017). Comet assay and micronucleus tests on *Oreochromis niloticus* (Perciforme: Cichlidae) exposed to raw sugarcane vinasse and to physicochemical treated vinasse by pH adjustment with lime (CaO). *Chemosphere*, 173, 494-501. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.025>

Dias, M. O. S., Maciel Filho, R., Mantelatto, P. E., Cavalett, O., Rossell, C. E. V., Bonomi, A., & Leal, M. R. L. V. (2015). Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. *Environmental Development*, 15, 35-51. <https://doi.org/10.1016/j.envdev.2015.03.004>

Duan, R. Y., & Huang, M. Y. (2016). The influence of low-dose cadmium on the laryngeal microstructure and ultrastructure of *Pelophylax nigromaculata*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(17), 17322-17331. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6942-4>

Duellman, W.E.; Trueb, L. *Biology of amphibians*. New York, McGraw-Hill, 1994.

Espana-Gamboa, E., Mijangos-Cortes, J., Barahona-Perez, L., Dominguez-Maldonado, J., Hernández-Zarate, G., Alzate-Gaviria, L. (2011). Vinasses: characterization and treatments. *Waste management & research*, 29(12), 1235-1250. <https://doi.org/10.1177%2F0734242X10387313>

Fattahi, E., Jorsaraei, S. G. A., Gardaneh, M. (2012). The effect of Carbaryl on the pituitary-gonad axis in male rats. *Iranian journal of reproductive medicine*, 10(5), 419.

Filoso, S., do Carmo, J. B., Mardegan, S. F., Lins, S. R. M., Gomes, T. F., &

Martinelli, L. A. (2015). Reassessing the environmental impacts of sugarcane ethanol production in Brazil to help meet sustainability goals. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, 1847-1856. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.08.012>

Fuess, L. T., & Garcia, M. L. (2014). Implications of stillage land disposal: a critical review on the impacts of fertigation. *Journal of Environmental Management*, 145, 210-229. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.003>

Fuess, L. T., Rodrigues, I. J., Garcia, M. L. (2017). Fertirrigation with sugarcane vinasse: foreseeing potential impacts on soil and water resources through vinasse characterization. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 52(11), 1063-1072. <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1338892>

Gregorio, L. S., Franco-Belussi, L., Gomes, F. R., Oliveira, C. (2016). Flutamide effects on morphology of reproductive organs and liver of Neotropical Anura, *Rhinella schneideri*. *Aquatic Toxicology*, 176, 181-189. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.022>

Guo, R., Zhang, W., Yang, Y., Ding, J., Yang, W., Zhang, Y. (2018). Variation of fitness and reproductive strategy in male *Bufo raddei* under environmental heavy metal pollution. *Ecotoxicology and environmental safety*, 164, 253-260. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.035>

Gurzau, E. S., Neagu, C., & Gurzau, A. E. (2003). Essential metals—case study on iron. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 56(1), 190-200. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00062-9](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00062-9)

Hayes, T. B., Anderson, L. L., Beasley, V. R., De Solla, S. R., Iguchi, T., Ingraham, H., ... & Willingham, E. (2011). Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: consistent effects across vertebrate classes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 127(1-2), 64-73. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.03.015>

Hernroth, B., Baden, S. P., Holm, K., André, T., & Söderhäll, I. (2004). Manganese induced immune suppression of the lobster, *Nephrops norvegicus*. *Aquatic Toxicology*, 70(3), 223-231. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.09.004>

Huang, M. Y., Duan, R. Y., Ji, X. (2015). The influence of long-term cadmium exposure on phonotaxis in male *Pelophylax nigromaculata*. *Chemosphere*, 119, 763-768. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.014>

Iavicoli, I., Fontana, L., & Bergamaschi, A. (2009). The effects of metals as endocrine disruptors. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 12(3), 206-223. <https://doi.org/10.1080/10937400902902062>

International Union for Conservation of Nature (IUCN). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-3. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T57129A11588348.en>> Acesso em 18 Nov. 2021.

Leite, G. B., Franco-Belussi, L., Provete, D. B., Oliveira, C. (2015). Comparative testis morphology of Neotropical anurans. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 257, 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2015.04.005>

Macedo, C. F., Tavares, L. H. (2018). Eutrophication and water quality in pisciculture: consequences and recommendations. *Boletim do Instituto de Pesca*, 36(2), 149 – 163.

Marco, A., Blaustein, A. R. (1999). The effects of nitrite on behavior and metamorphosis in Cascades frogs (*Ranacascadae*). *Environmental Toxicology and*

Chemistry: An International Journal, 18(5), 946-949.  
<https://doi.org/10.1002/etc.5620180519>

Mann, R. M., Hyne, R. V., Choung, C. B., & Wilson, S. P. (2009). Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental pollution*, 157(11), 2903-2927. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.015>

Marinho, J. F. U., Correia, J. E., de Castro Marcato, A. C., Pedro-Escher, J., & Fontanetti, C. S. (2014). Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia. *Ecotoxicology and environmental safety*, 110, 239-245. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.010>

Mathew, M. (2014). Reproductive toxicity of organophosphorus pesticide on male frog (*Bufo melanostictus*). *Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 2, 357-368.

McCoy, K. A., Amato, C. M., Guillette Jr, L. J., & Mary, C. M. S. (2017). Giant toads (*Rhinella marina*) living in agricultural areas have altered spermatogenesis. *Science of the Total Environment*, 609, 1230-1237. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.185>

McCoy, K. A., Amato, C. M., Guillette Jr, L. J., & Mary, C. M. S. (2017). Giant toads (*Rhinella marina*) living in agricultural areas have altered spermatogenesis. *Science of the Total Environment*, 609, 1230-1237. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.185>

Mohan, D., & Singh, K. P. (2002). Single-and multi-component adsorption of cadmium and zinc using activated carbon derived from bagasse—an agricultural waste. *Water research*, 36(9), 2304-2318. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00447-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00447-X)

Carvalho, J. L. N., Nogueirol, R. C., Menandro, L. M. S., Bordonal, R. O., Borges, D., Cantarella, H., Franco, H. C. J. (2017) Agronomic and environmental implication of sugarcane straw removal: a major review. *Global change biology bioenergy*, 9(7), 1181-1195.

Moresco, R. M., Margarido, V. P., & de Oliveira, C. (2014). A persistent organic pollutant related with unusual high frequency of hermaphroditism in the neotropical anuran *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826. *Environmental research*, 132, 6-11. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.028>

Moraes, B. S., Zaiat, M., Bonomi, A. (2015). Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 44, 888–903.

Ngo, H. T. T., Gerstmann, S., Frank, H. (2011). Sub chronic effects of environment-like cadmium level on the bivalve *Anodonta anatina* (Linnaeus 1758): III. Effects on carbonic anhydrase activity in relation to calcium metabolism. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 93(9), 1815-1825. <https://doi.org/10.1080/02772240802503619>

Oka, T., Tooi, O., Mitsui, N., Miyahara, M., Ohnishi, Y., Takase, M., Iguchi, T. (2008). Effect of atrazine on metamorphosis and sexual differentiation in *Xenopus laevis*. *Aquatic toxicology*, 87(4), 215-226. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.02.009>

Pérez-Iglesias, J. M., Franco-Belussi, L., Moreno, L., Tripole, S., de Oliveira, C., Natale, G. S. (2016). Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(10), 9852-9861. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6153-z>

Randall, D. J., & Tsui, T. K. N. (2002). Ammonia toxicity in fish. *Marine pollution bulletin*, 45(1- 12), 17-23. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00227-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00227-8)

Reader, J. P., Dalziel, T. R. K., Morris, R. (1988). Growth, mineral uptake and skeletal calcium deposition in brown trout, *Salmo trutta* L., yolk-sac fry exposed to aluminium and manganese in soft acid water. *Journal of fish biology*, 32(4), 607-624. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1988.tb05399.x>

Rezende, W. R., de Souza Santos, L. R., Franco-Belussi, L., Oliveira, C. (2021). Testicular morphometric changes in neotropical anurans from agroecosystems. *Environmental Pollution*, 271, 116265. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116265>

Sanchez, L. C., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P., Manzano, A. S., Junges, C. M., & Attademo, A. M. (2014). First evidence of the effects of agricultural activities on gonadal form and function in *Rhinella fernandezae* and *Dendropsophus sanborni* (Amphibia: Anura) from Entre Ríos Province, Argentina. DOI: 10.13128/Acta\_Herpetol-13759

Santos, L. R. S., Franco-Belussi, L., Oliveira, C. (2011). Germ cell dynamics during the annual reproductive cycle of *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae). *Zoological science*, 28(11), 840-844. <https://doi.org/10.2108/zsj.28.840>

Santos, L. R.S., Oliveira, C. (2008). Histological aspects and structural characteristics of the testes of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). *Micron*, 39(8), 1266-1270. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.03.006>

Santos, L.R.S.; Oliveira, C. (2007) Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 24, 64-70.

Scaia, M. F., de Gregorio, L. S., Franco-Belussi, L., Succi-Domingues, M., Oliveira, C. (2019). Gonadal, body color, and genotoxic alterations in *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to nonylphenol. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(22), 22209-22219. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05403-8>

Shinn, C., Marco, A., Serrano, L. (2013). Influence of low levels of water salinity on toxicity of nitrite to anuran larvae. *Chemosphere*, 92(9), 1154-1160. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.079>

Silva, A. J. N. D., Cabeda, M. S. V., Carvalho, F. G. D. (2006). Matéria orgânica e propriedades físicas de um Argissolo Amarelo Coeso sob sistemas de manejo com cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande. Vol. 10, n. 3 (jul./set. 2006), p. 579-585.

Silva, M. A., Griebeler, N. P., Borges, L. C. (2007). Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 11, 108-114. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662007000100014>

Sugai, J. L. M. M., Terra, J. D. S., Ferreira, V. L. (2012). Diet of *Leptodactylus fuscus* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) in the Pantanal of Miranda river, Brazil. *Biota Neotropica*, 12, 99-104. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032012000100008>

Trudeau, V. L., Thomson, P., Zhang, W. S., Reynaud, S., Navarro-Martin, L., Langlois, V. S. (2020). Agrochemicals disrupt multiple endocrine axes in amphibians. *Molecular and cellular endocrinology*, 513, 110861. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110861>

Vaz-Silva, W., Maciel, N. M., Nomura, F., Morais, A. R. D., Batista, V. G., Santos, D. L., ... & Bastos, R. P. (2020). *Guia de identificação das espécies de anfíbios (Anura e Gymnophiona) do estado de Goiás e do Distrito Federal, Brasil Central*.

Sociedade Brasileira de Zoologia. <https://doi.org/10.7476/9786587590011>

Wang, C., Liang, G., Chai, L., Wang, H. (2016). Effects of copper on growth, metamorphosis and endocrine disruption of *Bufo gargarizans* larvae. *Aquatic Toxicology*, 170, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.023>

Wong, C. K. C., Yeung, H. Y., Cheung, R. Y. H., Yung, K. K. L., & Wong, M. H. (2000). Ecotoxicological assessment of persistent organic and heavy metal contamination in Hong Kong coastal sediment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 38(4), 486-493. <https://doi.org/10.1007/s002449910064>

Zhang, W., Guo, R., Ai, S., Yang, Y., Ding, J., & Zhang, Y. (2018). Long-term heavy metal pollution varied female reproduction investment in free-living anura, *Bufo raddei*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 159, 136-142. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.001>

Zhang, W., Guo, R., Yang, Y., Ding, J., & Zhang, Y. (2016). Long-term effect of heavy-metal pollution on diversity of gastrointestinal microbial community of *Bufo raddei*. *Toxicology letters*, 258, 192-197. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.003>



#### 4. CONCLUSÃO GERAL

Em síntese, este trabalho revelou que a exposição a vinhaça de cana-de-açúcar pode impactar a dinâmica de desenvolvimento das células germinativas do anuro *Leptodactylus fuscus*, uma vez que, em geral, observou-se que os parâmetros testiculares apresentaram alterações com diminuição da área ocupada pelas células germinativas. É importante ressaltar o cuidado para o reaproveitamento desse efluente na fertirrigação, uma vez que pode levar a bioacumulação de metais no ambiente, e assim interferir na manutenção das espécies, podendo contribuir para o declínio ou até mesmo extinção das populações.

## Material Suplementar

**Tabela 2.** Frequência média da comparação da relação entre a área ocupada por cistos germinativos no interior de lóculos nos diferentes tratamentos. **SG1** – espermatogônia primária; **SG2** – espermatogônia secundária; **SC1** – espermatócito primário; **SC2** – espermatócito secundário; **SZ** - espermatozoides.

Tratamentos	Média ± erro padrão dos tratamentos				
	SG 1	SG2	SC1	SC2	SZ
GN	381.26±23.54b	763.23±70.88a	1728.41±131.84abc	4503.76±204.49bc	2507.68±321.93abc
CT	460.51±30.23b	1186.21±81.03bc	2773.98±230.88bc	4802.78±146.05c	3828.23±334.99b
25%	329.62±16.10ab	1270.01±31.91b	1816.94±182.17abc	2568.72±134.32a	3008.50±120.24bc
50%	435.21±48.01b	979.02±88.30a	1420.62±79.99ad	3568.05±202.10a	3223.73±171.57abc
75%	187.71±14.96a	990.51±45.86ac	1157.01±71.22ad	2487.14±165.98a	1717.25±51.21ac
100%	337.39±15.99ab	773.90±47.12a	1834.79±135.05c	2546.17±304.37a	1863.27±114.23ac

**Tabela 3.** Frequência média da comparação da relação entre a área locular e diâmetro.

Tratamentos	Média ± erro padrão dos tratamentos	
	A LOC	DIÂMETRO
GN	25404.91±828.47dc	206.45±4.57b
CT	20885.86±404.28c	183.48±2.96abc
25%	20776.01±364.58cd	183.81±2.50abc
50%	20031.21±588.51cd	175.18±2.33ac
75%	14829.52±251.61a	155.27±0.69a
100%	17522.19±365.85a	175.07±1.87ac

**Tabela 4.** Resultados da análise química da água no local de coleta dos espécimes.

Parâmetros	Resultados	Unidade	LQ	CONAMA 357/2005 Classe II (VMP)
Nitrogênio total	< 0,01	mg/L	0,01	NR
Fósforo total	0,06*	mg/L	0,01	0,05
2,4D+2,4,5T	<1,15	µg/L	1,15	2,000
Alaclor	<0,100	µg/L	0,100	20,000
Aldicarb + Aldicarb sulfona+ aldicarb sulfóxido	<10	µg/L	10 NR	NR
Aldrin+Dieldrin	<0,00200	µg/L	0,00200	0,00500
Atrazina	<1,00	µg/L	1,00	2,00
Carbendazina+Benomil	<20,000	µg/L	20,000	NR
Carbofurano	<5,000	µg/L	5,000	NR
Clordano Cis + Trans	<0,020	µg/L	0,020	0,04
Clorpirifós+ClorpirifósOxon	<5,100	µg/L	5,100	NR
Diuron	<50,000	µg/L	50,000	NR
Endossulfanalfa+EndossulfanBeta+Endossulfan Sulfato	<0,030	µg/L	0,030	0,056
Endrin	<0,001000	µg/L	0,001000	0,004000
Gama-BHC (Lindano)	<0,010	µg/L	0,010	0,020
Metamidofós	<5,0000	µg/L	5,0000	NR
Molinato	<0,100	µg/L	0,100	NR
p,p'DDD+ p,p-DDE+ p,p-DDT	<0,0030	µg/L	0,0030	0,002
Parationa Metílica	<0,050	µg/L	0,050	NR
Pendimetalina	<0,100	µg/L	0,100	NR

Permetrina	<0,200	µg/L	0,200	NR
Profenofós	<0,100	µg/L	0,100	NR
Simazina	<0,100	µg/L	0,100	2,000
Tebuconazol	<0,100	µg/L	0,100	NR
Terbufós	<0,100	µg/L	0,100	NR
Trifluralina	<0,050	µg/L	0,050	0,200
Clomazona	<0,1	µg/L	0,1	NR
Mancozebe	<106,800	µg/L	106,800	NR
Metalocloro	<0,100	µg/L	0,100	NR
Glifosato + AMPA	<100	µg/L	100	NR

Conclusão: Os parâmetros analisados não obedecem às exigências da Resolução do CONAMA No 357/2005 - Classe II "Fósforo total".

NR: Não há recomendação pela legislação, VMP: Valor máximo permitido, pH: Potencial hidrogeniônico, cel: células, uH: Unidade da cor pelo Hazen em mg/L Pt-Co, NTU: Unidades Nefelométricas de Turbidez, V.A.: Virtualmente ausente, UFC: Unidade formadora de colônia, LQ: Limite de Quantificação, N.A.: Não Aplicável; E.A.: Em Análise

Águas de Classe I, II e III - limites definidos segundo a Resolução N° 357 do CONAMA de 17 de março de 2005. Segundo a RESOLUÇÃO CONAMA 357/2005: CLASSE II: destina-se ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário.