

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

**Quantificação do pesticida fipronil em uma lagoa marginal do Rio Moji-Guaçu e a
cinética de sua degradação por microrganismos aquáticos**

André Moldenhauer Peret

**São Carlos-SP
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

Quantificação do pesticida fipronil em uma lagoa marginal do Rio Moji-Guaçu e a cinética de sua degradação por microrganismos aquáticos

André Moldenhauer Peret

Orientador: Prof. Dr. Antonio Aparecido Mozeto

Co-Orientadora: Profa. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de São Carlos, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais).

**São Carlos-SP
2009**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

P437qp

Peret, André Moldenhauer.

Quantificação do pesticida fipronil em uma lagoa marginal do Rio Moji-Guaçu e a cinética de sua degradação por microrganismos aquáticos / André Moldenhauer Peret. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
99 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Ecologia aquática. 2. Diagnóstico de ecossistema. 3. Degradação. 4. Modelagem matemática. I. Título.

CDD: 574.5263 (20^a)


André Moldenhauer Peret


Quantificação do pesticida fipronil em uma lagoa marginal do Rio Moji-Guaçu e a cinética de sua degradação por microrganismos aquáticos

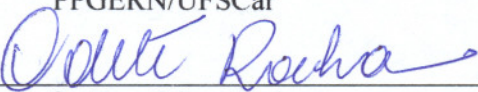
Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

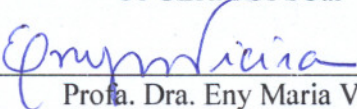
Aprovada em 20 de agosto de 2009


BANCA EXAMINADORA

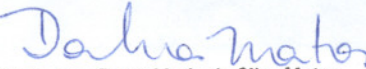
Presidente 
Prof. Dr. Antonio Aparecido Mozeto
(Orientador)

1º Examinador 
Prof. Dr. Irineu Bianchini Júnior
PPGERN/UFSCar

2º Examinador 
Profa. Dra. Odete Rocha
PPGERN/UFSCar

3º Examinador 
Profa. Dra. Eny Maria Vieira
USP/São Carlos-SP

4º Examinador 
Prof. Dr. Donato Seiji Abe
I.I.E./São Carlos-SP


Profa. Dra. Dalva Maria da Silva Matos
Coordenadora
PPGERN/UFSCar

*Dedico este trabalho à
minha esposa Marília, que
mais que uma
companheira, é minha fonte
de inspiração.*

AGREDECIMENTOS

1. Ao Prof. Dr. Antonio A. Mozeto pela orientação;
 2. À Prof. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim pela Co-orientação;
 3. Aos professores e amigos Irineu Bianchini Jr., Odete Rocha, Marcela Bianchesi Cunha-Santino e Pedro Fadini.
 3. À Marília, pelo carinho, e apoio nos momentos bons e nas horas difíceis de todos estes anos;
 4. Aos meus pais Alberto e Geïsa, meus sogros Maria Tereza e Dimas (em memória) pela cumplicidade e colaboração em todas as etapas de minha vida;
 5. Aos técnicos Luiz Aparecido Joaquim, Jurity Antonia Machado e Darci da Consolação Diniz Javaroti pela fundamental colaboração e em especial pela amizade;
 6. À memória dos técnicos Ditão e Horácio;
 7. Aos colegas do Laboratório de Biogeoquímica DQ-UFSCar de hoje e sempre Camila, Cássia, Dalva, Daniele, Érida, Fernando, Helena, Júlio, Marcelo, Marcos, Maria de Lourdes, Maria Isabel, Marina, Rafael, Ronaldo, Thaís, e em especial à Luciana, pela amizade e auxílio;
 8. Aos professores e amigos do PPGERN, pela amizade e auxílio em todos os aspectos;
 8. Ao CNPq e ao PPG-ERN/UFSCar pela bolsa e oportunidades concedidas, respectivamente;
 9. À FAPESP pelo auxílio à pesquisa concedido ao Prof. Dr. Antonio A. Mozeto (processo No. 06/56723-7);
- Agradeço, finalmente, a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

1 – Resumo	09
2 – Abstract	10
3 – Introdução	12
3.1 – Água como recurso natural	12
3.2 – Cultivo de cana-de-açúcar	12
3.3 – Pesticidas e sua relação com o ambiente aquático	14
3.4 – Fipronil: origem e utilização	15
4 - Descrição da área de estudos	20
5 – Objetivos	24
5.1 – Objetivo Geral	24
5.2 – Objetivos específicos	24
6 - Material e métodos	26
6.1 – Coleta e processamento de amostras	26
6.1.1 - Coleta e processamento de amostras de água	27
6.1.2 - Coleta de sedimento e extração de água intersticial	28
6.1.3 – Coleta de Perifiton	28
6.1.4 – Coleta de Solo	28
6.2 - Análises de nutrientes	29
6.2.1 - Determinações de Nutrientes em água	29
6.2.1.1 – Nitrogênio amoniacal	29
6.2.1.2 – Nitrito	29
6.2.1.3 – Nitrato	30
6.2.1.4 – Fluoreto	30
6.2.1.5 – Cloreto	30
6.2.1.6 – Ortofosfato	30
6.2.1.7 – Sulfeto	31
6.2.1.8 – Sulfato	31
6.2.1.9 - Nitrogênio Orgânico Total (Kjeldahl)	31
6.2.1.10 - Fósforo total em meio líquido	31
6.2.2 - Determinações de nutrientes em sedimento	32
6.3 – Testes de Toxicidade	32
6.4 - Extração de fipronil	33

6.4.1 – Preparação das amostras de água para extração de fipronil	33
6.4.2 – Extração de fipronil em água	33
6.4.3 – Extração de fipronil em sedimento	34
6.4.4 – Processo de limpeza das amostras (<i>Clean up</i>)	35
6.5 – Análise de fipronil e metabólitos por cromatografia gasosa	36
6.7 – Enriquecimento e isolamento de microrganismos capazes de utilizar fipronil como única fonte de carbono	37
6.7.1 – Preparação das linhagens de microrganismos para registro	38
6.8 – Ensaio em microcosmos para avaliação da dinâmica de fipronil na Lagoa do Óleo	38
6.8.1 – Montagem dos Microcosmos	39
6.8.2 – Análises nos microcosmos	39
7 - Resultados e discussão	43
7.1 – Variáveis físicas e químicas da Lagoa do Óleo	43
7.2 – Análises de nutrientes em água	44
7.3 - Análise de nutrientes em sedimento	51
7.4 – Modelo conceitual de exposição da Lagoa do Óleo ao fipronil	54
7.5 – Ensaio ecotoxicológicos	57
7.5.1 – Ensaio ecotoxicológicos na coluna de água	57
7.5.2 – Ensaio ecotoxicológicos em sedimento	57
7.5.3 – Faixa de Sensibilidade da bactéria <i>Vibrio fischeri</i> ao fipronil	57
7.6 – Análise de fipronil por cromatografia gasosa	58
7.6.1 – Eficiência metodológica de extração do analito em amostras de água	60
7.6.2 - Eficiência metodológica de extração do analito em amostras de sedimento	60
7.7 – Detecção de fipronil na água da Lagoa do Óleo	61
7.8 – Detecção de Fipronil nos sedimentos da Lagoa do Óleo	61
7.9- Isolamento de linhagens de microrganismos capazes de utilizar fipronil como fonte de carbono	61

7.10 – Ensaio em Microcosmos	63
8 – Conclusões	75
9 – Perspectivas de estudos futuros	76
10 - Referências bibliográficas	77
11 – Anexos	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da distribuição dos cultivos de cana-de-açúcar no Brasil (extraído da página da internet www.unica.com.br em 25/06/2009).	13
Figura 3 – Fipronil e seus produtos de degradação (modificado de Gunasekara e Troung, 2007).....	18
Figura 4 - Localização geográfica da Estação Ecológica de Jataí, evidenciando a Lagoa do Óleo, objeto do presente estudo (Modificado de Ferreira-Peruquetti e Fonseca Gessner, 2003).....	20
Figura 5– Fotografia de satélite evidenciando a Lagoa do Óleo e os limites da Estação Ecológica de Jataí com os campos de cultivo de cana-de-açúcar. Retirado do programa Google Earth (maio de 2006).	21
Figura 6 - Fotografia da Lagoa do Óleo, evidenciando a vegetação marginal (André Moldenhauer Peret).....	22
Figura 7 - Desenho esquemático da Lagoa do Óleo com base em fotografia de satélite, evidenciando os pontos de coleta.....	27
Figura 7 - Coleta de água com bomba de imersão e coleta de sedimento com draga tipo Van Veen (foto de André Moldenhauer Peret)	28
Figura 9 - Diagrama mostrando as etapas utilizadas na extração de fipronil em água, por extração em fase sólida (do inglês, SPE).	34
Figura 10 – Parte do processo de extração em sedimento	35
Figura 11 -Coluna de vidro para limpeza de extrato.....	36
Figura 12 – Concentração de amostra em evaporador rotativo	36
Figura 13 – Perfil de oxigênio dissolvido na coluna de água da lagoa do Óleo (períodos de seca e chuva).....	43
Figura 14 – Representação gráfica das médias dos valores obtidos nas análises das formas nitrogenadas e de fósforo para os cinco pontos de coleta nos períodos de seca e chuva.....	46
Figura 15 - Representações gráficas das médias dos valores obtidos nas análises das formas nitrogenadas para os cinco pontos de coleta nos períodos de seca e chuva.	47
Figura 16 - Concentrações de carbono dissolvido na coluna de água durante os períodos seco e chuvoso	49
Figura 17– Análise de componentes principais mostrando a separação entre os pontos de coleta pelas variáveis analisadas. s=superfície, m=meio,	

f=fundo, dez = dezembro (período de chuvas) e set = setembro (período de seca).	50
Figura 18 – Análises de carbono total (C), nitrogênio total (N), enxofre total (S) e fósforo total (P) nos sedimentos dos cinco pontos de coleta da Lagoa do Óleo durante os períodos de seca (setembro de 2007) e de chuva (dezembro de 2006).	52
Figura 19 - Análise de componentes principais, comparando os períodos de seca e chuva nos cinco pontos de coleta quanto às concentrações de carbono total (C), nitrogênio total (N), enxofre total (S) e fósforo total (P) no sedimento.	53
Figura 21 - Variáveis físico-químicas da água dos microcosmos não estéreis com e sem adição de fipronil.	64
Figura 22 – Concentrações de nutrientes nos microcosmos ao longo do tempo	67
Figura 27– Número e diversidade de colônias de microrganismos capazes de utilizar o fipronil como fonte de carbono.	68
Figura 23 - Modelo que representa o destino do fipronil nos microcosmos elaborados no presente estudo.	69
Figura 24 - Cinética de degradação do fipronil em microcosmos com água e sedimento da Lagoa do Óleo. (A) Representa a cinética nos microcosmos não estéreis e (B) nos microcosmos estéreis.	70
Figura 25 – Modelo estocástico representando o destino do fipronil e as taxas de cada processo nos ensaios em microcosmos desenvolvidos no presente estudo.	71
Figura 26 – CE50% nos microcosmos ao longo do tempo.	74

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DO FIPRONIL (RETIRADO DE <i>THE PESTICIDE MANUAL, 2000</i>).....	17
TABELA 2 - TOXICIDADE DO FIPRONIL PARA DIFERENTES ORGANISMOS, EVIDENCIANDO A MAIOR TOXICIDADE PARA INSETOS (MODIFICADO DE GUNASEKARA & TROUNG, 2007).....	19
TABELA 3 - CONDIÇÕES DO CROMATÓGRAFO E DO DETECTOR PARA ANÁLISE DE FIPRONIL.....	59
TABELA 4 – QUANTIDADE DE CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS DAS LINHAGENS DE MICRORGANISMOS ISOLADOS NOS MEIOS DE CULTURA COM FIPRONIL NA FORMA COMERCIAL E CELULOSE COMO ÚNICAS FONTES DE CARBONO, COM 5 DIAS DE INCUBAÇÃO. - = SEM CRESCIMENTO; + = POUCO CRESCIMENTO; ++ = CRESCIMENTO INTERMEDIÁRIO; +++ = CRESCIMENTO ABUNDANTE.	63
TABELA 5 – TEMPOS DE MEIA-VIDA CALCULADOS PARA OS PROCESSOS DETERMINADOS NO MODELO MATEMÁTICO ADOTADO PARA O DECAIMENTO DE FIPRONIL NOS MICROCOSMOS	73

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 - Médias dos valores de concentrações (mg L^{-1}) nutrientes para os 5 pontos de coleta na estação seca (set) e na estação chuvosa (dez) nos 4 compartimentos estudados (superfície, meio, funto e água intersticial)....	88
Anexo 2 - Valores (mg g^{-1}) das concentrações de elementos no sedimento dos cinco pontos de coleta durante os períodos de seca e chuva.....	90
Anexo 3 - Características Físico-Químicas dos Microcosmos com e sem adição de fipronil ao longo do tempo	91
Anexo 4 - Nutrientes (ug L^{-1}) nas águas dos microcosmos com e sem adição de fipronil (N Total em mg L^{-1}).....	92
Anexo 5 - Fotografias de imagens de microscópio óptico e descrição das colônias de microrganismos isolados capazes de utilizar fipronil comercial como única fonte de carbono.....	93
Anexo 6 - Concentrações de fipronil ao longo do tempo nos microcosmos não estéreis.....	98
Anexo 7 - Médias dos números de colônias de microrganismos provenientes dos microcosmos com e sem fipronil, capazes de utilizar fipronil como única fonte de carbono.....	99

1 - RESUMO

A Lagoa do Óleo é um corpo de água localizado na Estação Ecológica de Jataí (Luiz Antônio – SP) em uma área entre esta unidade de conservação e extensivas plantações de cana-de-açúcar que a contornam. Por este motivo, a lagoa apresenta um risco potencial de contaminação pelos pesticidas aplicados nestas plantações, em especial o fipronil. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar esta lagoa sob a ótica da distribuição de nutrientes nos compartimentos água e sedimento, bem como determinar as concentrações do fipronil nos diferentes compartimentos deste corpo de água e elaborar um modelo para caracterização do destino deste composto quando em contato com a água da lagoa. Para avaliar o potencial da degradação biológica dessa substância na lagoa, foram também isoladas 11 linhagens de microrganismos capazes de utilizar fipronil como fonte de carbono de diversos compartimentos deste ecossistema. Estes aspectos foram discutidos com base em um diagrama para a avaliação de risco da utilização de fipronil no entorno da Estação Ecológica de Jataí e os resultados indicam uma forte contribuição alóctone de matéria orgânica, principalmente no período de chuvas, o que torna preocupante a aplicação de pesticidas no entorno da Estação Ecológica de Jataí. Apesar do grande número de linhagens isoladas de microrganismos capazes de degradar o composto, este foi detectado no sedimento de um dos pontos de coleta, o que indica que este compartimento sofreu contaminação por este composto. Os experimentos realizados em microcosmos apontam para uma sedimentação rápida (tempo de meia vida de 17 dias) de cerca de 30% do composto e uma degradação lenta na água (tempo de meia vida de 43 dias). No sedimento, a biodegradação contribuiu de forma eficiente para o decaimento das concentrações de fipronil (tempo de meia vida de 7 dias), sem que a toxicidade fosse reduzida. Os microrganismos capazes de utilizar o fipronil como fonte de carbono tiveram um crescimento significativo nos microcosmos contaminados, no entanto, a diversidade foi, ao longo do tempo, reduzindo, o que evidencia uma seleção de organismos mais eficientes na utilização do composto em função do tempo de exposição.

2 - ABSTRACT

Óleo lagoon is a water body located at the border of the Jataí Ecological Station, next to extensive sugar-cane plantations that surround this conservation area. For this reason, there is a potential risk for contamination of this water body by pesticides that are widely used to protect the crops among them fipronil. This work aimed at characterize the Óleo Lake (an oxbow lake located at Moji-Guaçu river floodplain) under the optics of nutrient distribution, to access the concentrations of fipronil in the water body, as well as to develop a mathematical model able to predict the fate of fipronil when in contact to the water of the lake. Besides, it was carried out the isolation of microbial lineages from several compartments of the studied ecosystem. All these aspects were discussed based on a risk assessment diagram in the present work. Results show a great alloctonous organic matter contribution, especially on the rainy season, which shows that the application of pesticides in the surroundings of Jataí Ecological Station can be an object of great concern. The high number of isolated microorganisms lineages capable of using fipronil as carbon source demonstrates that the environment can modify this compound into other molecules. A low but measurable concentration of fipronil was detected in only one sediment sample, which indicates that the contamination of the studied water body had already happened. A microcosm experiment showed that, when in contact to water, about 30% of fipronil moves quickly to the sediment (17 days half-life time). The other fraction is slowly degraded in water (43 days half-life time). In the sediment, biodegradation was an efficient pathway to reduce fipronil concentration (7 days half-life time), without reducing the toxicity. Microorganism populations capable of using fipronil as carbon source has grown in the fipronil contaminated microcosms but their diversity was reduced as a function of time, what is believed to be a result of a selection of microorganisms that are most efficient in using fipronil molecules as a function of exposure time.



INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

3.1 - ÁGUA COMO UM RECURSO NATURAL

Todas as formas de vida na Terra dependem da água. Apesar de 75% da superfície do globo ser recoberta por água, mais de 97% deste total é de água salgada, indisponível para o consumo direto e para a maioria dos usos pelo ser humano. Lagos e rios são as principais fontes de água potável, mesmo constituindo, em seu conjunto, menos de 0,01% do total de água do planeta (Baird, 2002). As atividades antropogênicas podem causar modificações ambientais, resultando em mudanças na estrutura dinâmica de um ecossistema. Entre os ecossistemas do planeta, os aquáticos acabam por constituir-se em receptáculos temporários ou finais de uma grande quantidade e variedade de poluentes, sejam eles lançados ao ar, ao solo, ou diretamente nos corpos de água. Quando atingem os corpos de água, estes poluentes podem ter vários destinos, que dependem das propriedades físicas do composto, das características químicas, físicas e biológicas do ecossistema atingido, bem como da taxa de entrada do composto no ambiente (Rand, 1995).

Segundo Ayibotele (1992), cerca de 70% da água consumida no mundo é utilizada para agricultura, 22% nos processos industriais e 8% para o consumo doméstico. Sendo assim, grande importância deve ser dada aos resíduos gerados pela atividade agrícola e suas conseqüências para os ecossistemas adjacentes.

3.2 - CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O cultivo de cana-de-açúcar, no Brasil, teve seu início no Nordeste do país, durante o período colonial, no século XVI e representa até hoje um importante segmento da economia do país (Masuti e Mermut, 2007). Durante a década de 1970, com o Pró-Álcool (programa instituído pelo Governo Federal para incentivo à substituição de parte do consumo de gasolina pelo etanol), o plantio da cana-de-açúcar foi intensificado e difundido em grande parte do país.

Atualmente, a produção mundial de cana-de-açúcar está voltada para a produção de açúcar (Waldheim *et al.*, 2006), sendo que o Brasil se sustenta como o maior produtor de álcool e açúcar de cana-de-açúcar do mundo (Masuti e Mermut, 2007). Devido à diversidade agroecológica do território nacional e à variabilidade sócio-econômica, a agricultura brasileira é uma realidade heterogênea e complexa em seus sistemas e estruturas de produção. No entanto, em alguns locais, esta atividade se constitui em um dos sistemas agrícolas mais primitivos, que consomem muitos recursos naturais e em outros, sistemas intensificados, que consomem menos recursos, porém, introduzem no ambiente, entre outras substâncias, inseticidas, herbicidas e fertilizantes para garantir uma maior produção em uma menor área. Estes dados são confirmados pela UNICA (união das indústrias de cana-de-açúcar), em sua página na internet, como mostrado pelo mapa da Figura 1.

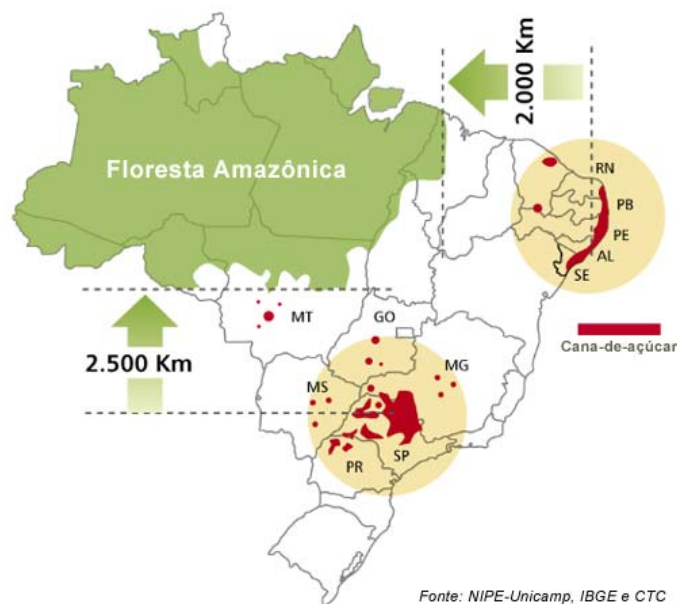


Figura 1 - Mapa da distribuição dos cultivos de cana-de-açúcar no Brasil (extraído da página da internet www.unica.com.br em 25/06/2009).

3.3 - PESTICIDAS E SUA RELAÇÃO COM AMBIENTES AQUÁTICOS

Os agrotóxicos, entre eles os utilizados na agricultura, popularmente denominados de agrotóxicos ou defensivos agrícolas, são compostos que podem matar diretamente um organismo indesejável ou controlá-lo de alguma maneira. O uso mais antigo que se tem registro é a queima de enxofre contra insetos, para fumigar os lares gregos, cerca de 1000 a.C. (Baird, 2002). Atualmente, na agricultura, são utilizados para que possam ser cultivadas grandes quantidades de determinada espécie em uma pequena área, sem a interferência de organismos que possam reduzir a produção.

O grande esforço dos produtores de agrotóxicos está voltado para o aumento da margem de segurança entre a toxicidade para invertebrados alvo e para a saúde humana. No entanto, estes compostos podem exercer efeitos em organismos diferentes dos alvos da aplicação, o que pode alterar o equilíbrio dinâmico de um ecossistema. Segundo Pimentel e Levitam (1991), em revisão sobre a quantidade de pesticidas aplicados, em média, apenas 0,1% do produto atinge os organismos-alvo. O restante acaba por contaminar os ecossistemas adjacentes ao da aplicação. Tendo em vista que o ambiente aquático exerce um papel de receptáculo intermediário ou final de grande quantidade de compostos, quando há grande proximidade entre um agroecossistema e ambientes aquáticos, os riscos de contaminação são eminentes (Rand, 1995).

Nos ecossistemas aquáticos, os pesticidas podem ter diversos destinos: permanecerem dissolvidos na coluna d'água, alcançarem o sedimento ou se acumularem nos tecidos dos organismos. Compostos como DDT, por exemplo,

possuem uma alta tendência à sedimentação e altíssimo poder de bioacumulação (Baird, 2002). A baixa afinidade destes compostos pela água os torna extremamente persistentes no ambiente aquático (Masutti e Mermut, 2007) e perigosos aos demais organismos, inclusive ao homem. Por esta razão estas substâncias tiveram sua utilização regulamentada ou mesmo proibida, abrindo espaço para o desenvolvimento de novos pesticidas (Zhu *et al.*, 2004).

3.4 - FIPRONIL: ORIGEM E UTILIZAÇÃO

O fipronil (5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-[(trifluoromethyl)sulfinyl]-1*H*-pyrazole-3-carbonitrile) é um inseticida Fenil Pirazólico, descoberto em 1987 pela Rhône-Poulenc Agro Company (atual Bayer Cropscience) e registrado como pesticida nos Estados Unidos da América do Norte (EUA) em 1996. Considerado como um pesticida seletivo para insetos, ele atua de forma semelhante aos inseticidas ciclodienos, como endossulfan e dieldrin, interferindo na passagem de íons cloreto pelos canais de cloro dos neurônios, processo que é regulado pelo ácido gama-aminobutírico (GABA). Portanto, o fipronil atua no sistema nervoso, paralisando ou matando o organismo-alvo (Rhône-Poulenc, 1996). Desta forma, tem sido amplamente utilizado para o controle de formas adultas e larvais de pragas, como baratas, mosquitos, moscas, besouros, etc., e em plantações, como as de soja e cana-de-açúcar, para o controle de formigas, cupins e larvas de coleópteros. A ampla disseminação deste composto deve-se a sua eficácia no combate a insetos resistentes a outros pesticidas (Bobe *et al.*, 1997). O composto é ingrediente ativo de diversas formulações, como Termidor®,

Frontline®, Regent®, Evolution®, entre outras, e a patente pertence à Bayer Cropscience até hoje, mas tornar-se-á pública em agosto de 2010 (Anvisa, 2008). No Brasil, o início da utilização de fipronil foi registrado em 2000, em plantações da região Nordeste (Masutti e Mermut, 2007). No país, o produto Regent 800 WG, com 80% de fipronil em sua composição, é aplicado em plantações de cana-de-açúcar, no período entre junho e agosto, logo após o plantio, em sulcos no solo, com a finalidade de formar uma barreira contra insetos na subsuperfície, sendo recomendada pelo fabricante a utilização de concentrações que variam de 200 g ha⁻¹ a 500 g ha⁻¹, dependendo do inseto a ser controlado.

Dados de diversas publicações demonstram que a maior concentração registrada de fipronil em águas naturais adjacentes a campos de agricultura foi de, aproximadamente, 0,12 µg L⁻¹ no estado de Louisiana, nos Estados Unidos da América do Norte (Gunasekara e Troung, 2007). No entanto, as características físico-químicas do composto (Tabela 1) demonstram que há uma partição considerável do fipronil entre água e sedimento, representada pelo seu coeficiente de partição octanol-água (log K_{ow} = 4,0), e que o sedimento representa um compartimento importante na consideração das concentrações de fipronil em um ecossistema aquático.

Tabela 1 - Características químicas do fipronil (retirado de *The Pesticide Manual, 2000*)

Grupo Químico	Fenil pirazol
Classe	Inseticida
Fórmula Molecular	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS
Número CAS (Chemical Abstracts Service)	120068-37-3
Massa Molar	437,2 g mol ⁻¹
Ponto de ebulição	200°C
Classe Toxicológica	II – altamente tóxico
log Kow	4,0
Solubilidade em água a 20°C	pH= 5:1,9 mg L ⁻¹ / pH= 9: 2,49 mg L ⁻¹

Quando atinge um ecossistema, o fipronil pode ser degradado por hidrólise, fotólise, oxidação ou redução, resultando em compostos derivados, tais como fipronil sulfeto, fipronil sulfona, fipronil desulfinil e fipronil amida (Masutti e Mermut, 2006; Zhu *et al.*, 2003; Zhou Pei *et al.*, 2004; Wirth *et al.*, 2004; Hainzl e Casida, 1996; Gunasekara e Troung, 2007). O fipronil desulfinil é um produto de degradação exclusivamente fotolítica, e os demais produtos podem ser resultantes de processos químicos, mediados ou não por microrganismos (Figura 2).

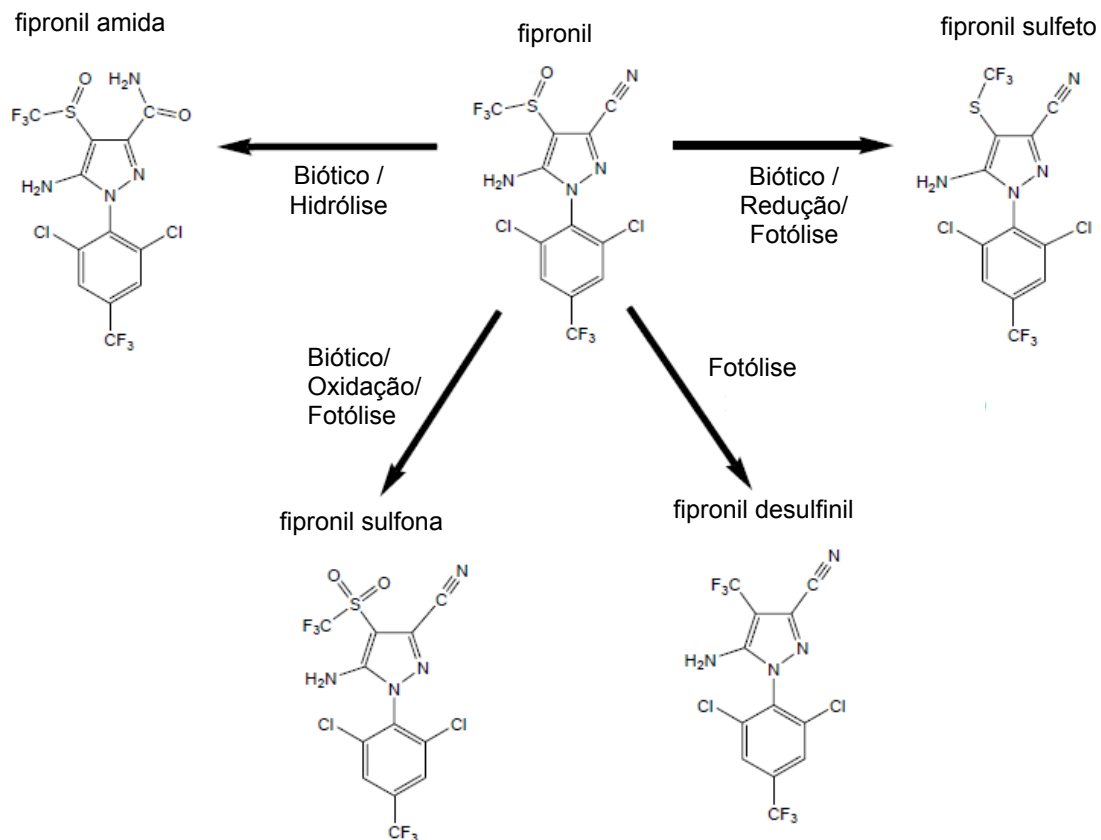


Figura 2 – fipronil e seus produtos de degradação (modificado de Gunasekara e Troung, 2007).

Diversos artigos relatam que o fipronil é um composto pouco tóxico para peixes e moluscos (Wirth *et al.*, 2004; Ngim e Crosby, 2001; Mesléard *et al.*, 2005) e altamente seletivo para insetos, absorvido por estes organismos primariamente via ingestão (Chaton *et al.*, 2001). Segundo Beeler *et al.* (2001), os produtos de degradação do Fipronil podem ser ainda mais tóxicos que o composto original. Em ordem crescente de toxicidade encontram-se fipronil amida, fipronil e fipronil desulfínil, fipronil sulfona e o mais tóxico dos derivados, fipronil sulfeto. Gunasekara e Troung (2007) em uma revisão sobre o destino ambiental do fipronil, destacaram a toxicidade do composto para insetos, determinada pela concentração letal para 50% dos organismos teste (CL_{50}), que variou de $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ a $23 \mu\text{g L}^{-1}$. Estes valores são extremamente baixos,

quando se compara com os efeitos em outros organismos aquáticos, como crustáceos, moluscos ou mesmo alguns peixes (Tabela 2)

Tabela 2 - Toxicidade do fipronil para diferentes organismos, evidenciando a maior toxicidade para insetos (modificado de Gunasekara & Troung, 2007).

Organismos	Testes	Toxicidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Truta Arco-íris	CE ₅₀ (96h)	250
Ostras	CE ₅₀ (24h)	770
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CE ₅₀ (48h)	17,7
<i>Aedes aegypti</i>	CL ₅₀	1,54
<i>Chironomus crassicaudatus</i>	CL ₅₀	0,48

CE50 = Concentração efetiva em 50% dos organismos

CL50 = Concentração letal para 50% dos organismos

4 - DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDOS

A Estação Ecológica do Jataí (Figura 3), inserida na planície de inundação do Rio Mogi-Guaçu, localizada no município de Luiz Antônio (SP), é uma das mais importantes unidades de conservação do Estado de São Paulo e comporta um significativo número de corpos de água lóticos e lênticos. As lagoas marginais do Rio Mogi-Guaçu desempenham um papel fundamental para a ictiofauna da bacia hidrográfica em questão, funcionando como criadouros, locais de refúgio e forrageamento (Ferreira, 1998). A presença abundante de macrófitas aquáticas nessas lagoas possibilita o desenvolvimento de uma teia alimentar complexa.

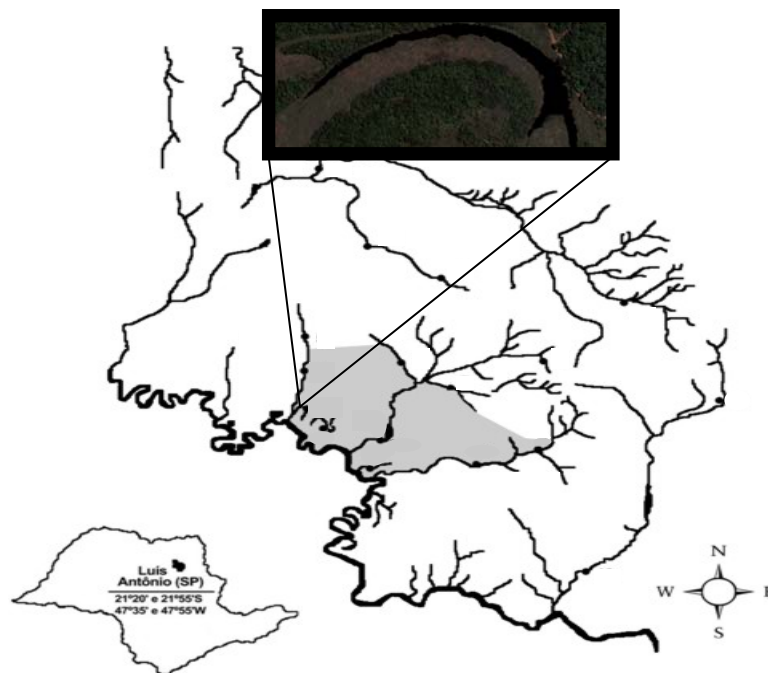


Figura 3 - Localização geográfica da Estação Ecológica de Jataí, evidenciando a Lagoa do Óleo, objeto do presente estudo (modificado de Ferreira-Peruquetti e Fonseca Gessner, 2003).

Esta unidade de conservação é limitada ao sul pelo Rio Mogi-Guaçu e em todo o entorno da Estação Ecológica há campos de cultivo de cana-de-açúcar e laranja.

A maioria dos rios tropicais tem um ciclo anual, o qual é principalmente ditado pelo regime de chuvas. Se o canal do rio, em função de suas características geológicas e geomorfológicas, não é capaz de conter a elevação do nível da água, ocorre o transbordamento lateral deste canal. A

velocidade e impedimentos na drenagem deste fluxo levam a inundações em extensas áreas (Payne, 1986 *apud* Albuquerque, 1992), como é o caso do Rio Mogi-Guaçu, que exibe um comportamento caracterizado por pulsos de inundação. As condições climáticas da região caracterizam-se por duas estações bem definidas: uma chuvosa (verão quente e úmido) de novembro a abril e outra seca (inverno seco), de maio a outubro (Cavalheiro *et al.*, 1990). Dados relativos aos anos de 1994 a 1997 indicam que durante os meses de chuva, a vazão do Rio Mogi-Guaçu, principal corpo de água do sistema hidrológico da Estação Ecológica de Jataí, pode aumentar em até dez vezes em relação ao período de estiagem, gerando pulsos de inundação de diferentes grandezas e durações. No entanto, dados mais recentes (de 1997 até 2004) indicam que, com as secas mais severas ao longo dos anos, não ocorreram mais inundações expressivas no Rio Mogi-Guaçu, o que tem modificado significativamente a fisionomia da Estação Ecológica de Jataí (Peret, 2009). Logo, se fazem necessários estudos mais atuais que caracterizem os corpos de água na região.

A Lagoa do Óleo (Figuras 4 e 5) é um corpo de água lântico tipicamente de decomposição, isto é, o principal reservatório de carbono para o ecossistema são as macrófitas aquáticas que o liberam para o sedimento, compartimento que apresenta um considerável volume de matéria orgânica em decomposição. Este corpo aquático encontra-se próximo do limite da estação ecológica e é um dos mais próximos dos campos de cultivo de cana de açúcar.



Figura 4 – Fotografia de satélite evidenciando a Lagoa do Óleo e os limites da Estação Ecológica de Jataí com os campos de cultivo de cana-de-açúcar. Retirado do programa Google Earth (maio de 2006).



Figura 5 - Fotografia da Lagoa do Óleo, evidenciando a vegetação marginal (foto de André Moldenhauer Peret).

O ambiente aquático alvo deste estudo constitui-se, portanto, em um compartimento do ecossistema que, apesar de encontrar-se dentro de uma reserva ecológica, por consequência do ordenamento do uso do solo na região pode sofrer influências das atividades antrópicas em seu entorno cujas consequências podem influenciar o destino da própria unidade de conservação.



OBJETIVOS

5 - OBJETIVOS

5.1 - OBJETIVO GERAL

Avaliar se há ou não contaminação da Lagoa do Óleo pelo pesticida fipronil, aplicado nas plantações de cana-de-açúcar em seu entorno e identificar o destino deste composto quando atinge este corpo de água e o potencial da degradação do mesmo em seus principais compartimentos.

5.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a contribuição alóctone de matéria orgânica na Lagoa do Óleo e o consequente risco de sua exposição ao fipronil aplicado em seu entorno;
- Investigar a existência, na Lagoa do Óleo, de microrganismos capazes de utilizar o fipronil como fonte de carbono para seus processos metabólicos;
- Avaliar as taxas de degradação do fipronil ao atingir a Lagoa do Óleo, em ensaios com microcosmos em laboratório.



MATERIAL E
MÉTODOS

6-. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Foram realizadas duas expedições para coleta de amostras (setembro e dezembro de 2007), representando o período seco e chuvoso da região estudada. Foram definidos cinco pontos de coleta (P1: 21°35'30,97"S/46°50'14,10"O; P2: 21°35'28,22"S/46°50'15,59"O; P3: 21°35'26,38"S/46°50'20,34"O; P4: 21°35'27,25"S/46°50'24,66"O; P5: 21°35'29,02"S/46°50'27,92"O) na Lagoa do Óleo (Figura 6) onde foram determinadas *in situ*, na água, com auxílio de uma sonda multiparamétrica da marca *YellowSpring modelo YSI 650 MDS*, diversas variáveis físicas e químicas (pH, turbidez, oxigênio dissolvido, condutividade e potencial de oxi-redução). As amostras de água de superfície, meio e interface sedimento-água, além de sedimento superficial; foram levadas ao laboratório para análises de nutrientes. Os pontos de coleta 1 e 2, na porção leste da lagoa são cobertos por vegetação marginal de grande porte e, por isso, apresentam maior quantidade de detritos vegetais no sedimento. Os demais pontos são expostos, isto é, a maior parte da vegetação do entorno é representada por espécies de pequeno porte.

Todas as amostras foram mantidas refrigeradas em caixa isotérmica com gelo após a coleta e durante o transporte até o laboratório, onde foram acondicionadas em refrigerador (4°C) até o momento das análises, as quais ocorreram em até 7 dias.

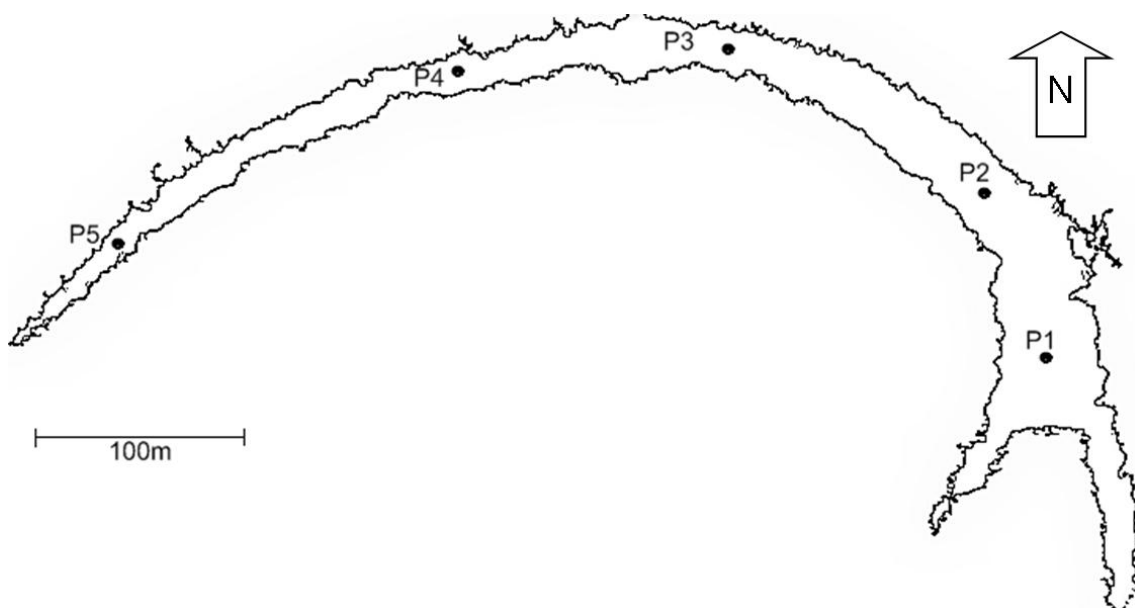


Figura 6 Desenho esquemático da Lagoa do Óleo com base em fotografia de satélite, evidenciando os pontos de coleta.

6.1.1 - AMOSTRAS DE ÁGUA

As amostras de águas de superfície meio e interface, dispostas em garrafas plásticas pré lavadas, foram coletadas com auxílio de uma bomba de água (Figura 7). As análises de carbono orgânico total foram realizadas nas águas armazenadas em pequenos frascos de vidro previamente lavados e descontaminados. As águas de cada ponto de coleta foram separadas em duas alíquotas para análises de nutrientes: uma das alíquotas foi filtrada em membranas de acetato de celulose ($0,45 \mu\text{m}$ de porosidade pré lavados com 100 mL de ácido clorídrico 10 % e secos em estufa a $50 \text{ }^\circ\text{C}$) para as determinações de nutrientes dissolvidos e a outra fração foi mantida intacta para as determinações de fósforo e nitrogênio totais. Para a análise de fipronil foi obtida uma amostra integrada contendo o mesmo volume de água de superfície, meio e interface, mantida refrigerada ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) até o momento da análise.



Figura 7 - Coleta de água com bomba de imersão e coleta de sedimento com draga tipo van-Veen (fotos de André Moldenhauer Peret).

6.1.2 - COLETA DE SEDIMENTO E EXTRAÇÃO DE ÁGUA INTERSTICIAL

As amostras de sedimento foram coletadas com auxílio de uma draga tipo “Van Veen” (Figura 7) e dispostas em sacos de polipropileno pré-lavados até a chegada em laboratório, onde foi extraída a água intersticial por centrifugação a 832 g por 15 minutos em centrífuga refrigerada. O sobrenadante (água intersticial) foi removido dos tubos da centrífuga com auxílio de uma seringa, descartando-se o restante do sedimento. As águas intersticiais passaram pelo mesmo fracionamento das águas de superfície, meio e interface. Uma alíquota do sedimento foi acondicionada em marmitas esterilizadas de alumínio com 1L de capacidade e mantida sob refrigeração para posterior obtenção do inóculo de microrganismos e análise de fipronil.

6.1.3 COLETA DE PERIFÍTON

Raízes de diversas macrófitas aquáticas, as quais foram coletadas e mantidas sob refrigeração até a chegada em laboratório, onde foram raspadas assepticamente com auxílio de uma espátula de aço estéril para remoção do perifíton, posteriormente utilizado para isolamento de microrganismos capazes de degradar o fipronil.

6.1.4 COLETA DE SOLO

Foi escolhido um ponto para coleta de solo do entorno da Lagoa do Óleo, nas proximidades das plantações de cana-de-açúcar, com a finalidade de se obter microrganismos capazes de degradar o fipronil. Com o auxílio de uma pá, foi coletada uma amostra de solo superficial de 10 cm de profundidade, que foi acondicionada em frasco de vidro estéril e refrigerada em caixa isotérmica com gelo até a chegada em laboratório.

6.2 ANÁLISES DE NUTRIENTES

6.2.1 DETERMINAÇÕES DE NUTRIENTES EM ÁGUA

As concentrações das frações dissolvidas de nitrato, nitrito, nitrogênio amoniacal, sulfeto, sulfato, cloreto, fluoreto e ortofosfato das águas foram determinadas nas amostras filtradas em membranas de acetato de celulose.

As análises da concentração de carbono total dissolvido e carbono orgânico total dissolvido foram realizadas em analisador de carbono orgânico TOC-5000 (Shimadzu, Japão). Nas alíquotas de águas não filtradas foram determinadas as concentrações de nitrogênio orgânico total e fósforo total. As determinações de nutrientes são descritas a seguir.

6.2.1.1 - Nitrogênio Amoniacal

O método utilizado para a determinação de nitrogênio amoniacal está baseado na metodologia descrita por Koroleff (1976). Em meio moderadamente alcalino, e tendo como catalisador o nitroprussiato de sódio a amônia é oxidada por hipoclorito de sódio e fenol resultando em indofenol. Este último é quantificado espectrofotometricamente no comprimento de onda de 630 nm. O limite de detecção da metodologia $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$.

6.2.1.2 – Nitrito

A determinação de nitrito foi realizada pelo método descrito por Strickland e Parsons (1960). Em solução ácida o nitrito reage com a sulfanilamida. O composto formado reage com bicloridrato(N-(1-

naftil))etilenodiamina formando um complexo de cor violeta, que é lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540nm. O limite de detecção da metodologia empregada é de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$

6.2.1.3 - Nitrato

O nitrato foi determinado a partir da metodologia descrita por Makereth (1978) que consiste em um procedimento onde o nitrato da amostra é reduzido a nitrito usando-se cádmio amalgamado. O nitrito é então, determinado por reação ácida com a sulfanilamida. O composto formado reage com bicloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina resultando num complexo de cor violeta que é lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. O limite de detecção da metodologia empregada é de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$

6.2.1.4 - Fluoreto

Determinado por colorimetria, com a utilização do espectrofotômetro HACH, com o método 8029 (SPADNS), que envolve a reação do fluoreto com uma solução vermelha de zircônio. A quantidade de fluoreto é proporcional ao clareamento da solução vermelha original ($\lambda = 580 \text{ nm}$). O limite de detecção da metodologia é de $0,04 \text{ mg L}^{-1}$.

6.2.1.5 - Cloreto

A determinação de cloreto foi realizada pelo método HACH 8113. O cloreto na amostra reage com tiocianato de mercúrio para formar cloreto de mercúrio, liberando o íon tiocianato. Este íon reage com íons férricos para formar um complexo, cor laranja, de tiocianato férrico, proporcional à concentração de cloreto ($\lambda = 455 \text{ nm}$). O Limite de detecção calculado para a metodologia foi de $0,583 \text{ mg.L}^{-1}$.

6.2.1.6 - Ortofosfato

A determinação de ortofosfato foi realizada pelo método descrito por Strickland e Parsons (1960). Ortofosfato, ou fósforo dissolvido, reage com molibdato em meio ácido, produzindo um complexo de fosfomolibdato. O ácido ascórbico reduz este complexo, originando uma coloração azul ($\lambda = 882 \text{ nm}$). O limite de detecção da metodologia é de $0,08 \mu\text{g L}^{-1}$.

6.2.1.7 - Sulfeto

A determinação de sulfetos foi realizada pelo método HACH 8131. Sulfetos reagem com oxalato de N,N dimetil-p-fenienediamina, formando azul de metileno. A intensidade do azul é proporcional à concentração de sulfeto na amostra ($\lambda = 665 \text{ nm}$). O limite de detecção da metodologia é de $5,96 \mu\text{g L}^{-1}$.

6.2.1.8 - Sulfato

A determinação de sulfatos foi realizada pelo método HACH 8051. Íons sulfato da amostra reagem com bário, originando sulfato de bário, sal insolúvel, proporcionando turbidez à amostra. O grau de turbidez é proporcional ao teor de sulfato da amostra ($\lambda = 450 \text{ nm}$). O limite de detecção da metodologia é de $1,75 \text{ mg L}^{-1}$.

6.2.1.9 - Nitrogênio Orgânico Total (Kjeldahl)

A metodologia utilizada é uma adaptação de Voegel (1992). Na presença de ácido sulfúrico, sulfato de potássio e sulfato de mercúrio como catalisador, o nitrogênio orgânico é convertido em sulfato de amônia. Após decomposição, a amônia é destilada em meio alcalino e adsorvida em ácido bórico ou sulfúrico. A amônia é determinada por titulação.

6.2.1.10 - Fósforo total nas águas

A amostra é digerida com persulfato de potássio em autoclave, liberando o fósforo na forma de ortofosfato. A análise de ortofosfato segue o procedimento descrito anteriormente. O limite de detecção da metodologia empregada é de 0,08 g L⁻¹

6.2.2 - DETERMINAÇÕES DE NUTRIENTES EM SEDIMENTO

Nos sedimentos dos cinco pontos de coleta foi determinada a concentração de carbono orgânico total com a utilização de um analisador de carbono Shimadzu TOC 5000 acoplado ao módulo para amostras sólidas (SSM) da mesma marca. Enxofre total e nitrogênio total foram analisados com a utilização do analisador elementar Carlo Erba EA 1108. As concentrações de fósforo total foram determinadas pelo método de Andersen (1976) que consiste no aquecimento da amostra em forno tipo mufla por uma hora a 550 °C, seguido de digestão em meio ácido em chapa aquecedora. No extrato ácido é realizado o procedimento já descrito para fósforo total em água.

6.3 TESTES DE TOXICIDADE

Foi determinada a toxicidade da água com a utilização da bactéria *Vibrio fischeri* como organismo teste, seguindo a norma CETESB L5.227 (2001). Este teste baseia-se na medida da quantidade de luz emitida pelo organismo na presença e na ausência da amostra em teste (Umbuzeiro e Rodrigues, 2004; Rodrigues, P. F. 2006).

A toxicidade aguda do sedimento foi determinada pelo mesmo tipo de ensaio, porém, utilizando o elutriato do sedimento como amostra para teste, que foi obtido agitando-se 100g de sedimento homogeneizado com 400 mL de água deionizada por 24 h a 30 rpm. As amostras foram, anteriormente a cada teste, filtradas em membranas de acetato de celulose de 0,22 µm de diâmetro de poro.

A faixa de sensibilidade do organismo-teste ao fipronil comercial foi estimada por meio do cálculo da concentração efetiva média (CE50) testando-se diversas diluições do composto. A faixa de sensibilidade equivale à média

das concentrações efetivas médias somadas e subtraídas do dobro do desvio padrão dos resultados obtidos (USEPA, 1985).

6.4 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE FIPRONIL

6.4.1 RECUPERAÇÃO DOS COMPOSTOS

Para todas as metodologias utilizadas para a extração de fipronil, foram realizados testes de recuperação, adicionando-se 1 mL de solução padrão na concentração 1 mg L^{-1} à água ou sedimento da Lagoa do Óleo e realizando-se a extração e análise de fipronil antes e após a adição padrão. O procedimento foi repetido 10 vezes para cada matriz analisada e a média de recuperação obtida foi posteriormente utilizada para o cálculo das concentrações após detecção.

6.4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA EXTRAÇÃO DE FIPRONIL EM ÁGUA

A um volume de 100 mL das amostras de água foi acrescida solução de ácido clorídrico 2 N, até que as soluções atingissem pH 2. As amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose ($0,45 \mu\text{m}$ de poro) previamente tratadas com 100 mL água deionizada. Em seguida, as amostras foram encaminhadas para o processo de extração de fipronil e metabólitos.

6.4.3 EXTRAÇÃO DE FIPRONIL EM ÁGUA

O composto fipronil foi extraído da água seguindo metodologia estabelecida por Brondi (2000), que consiste do processo de extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) com a utilização de cartuchos de sílica ligada a octadecilsilano (C_{18}) com 6mL de capacidade. Este processo foi realizado com auxílio de bomba a vácuo e consistiu das seguintes etapas, esquematizadas na Figura 8:

- ETAPA A – Condicionamento do cartucho

Inicialmente, cartuchos foram condicionados passando-se através deles 10 mL de acetato de etila, seguindo-se de 10 mL de água deionizada ajustada para pH 2 com solução de ácido clorídrico 2 M .

- ETAPA B – Inserção da Amostra

Posteriormente, foram passados pelo cartucho 50 mL de amostra, e o cartucho foi seco com a passagem de ar a 10 mm Hg por 30 minutos.

- ETAPA C – Eluição dos analitos retidos

Os analitos retidos no C₁₈ foram eluídos com a passagem de 20 mL do solvente acetato de etila.

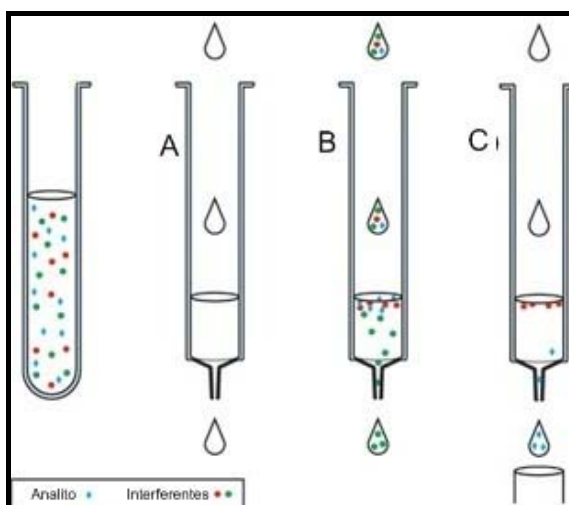


Figura 8 - Diagrama mostrando as etapas utilizadas na extração de fipronil em água, por extração em fase sólida (SPE).

Logo após a eluição, cada amostra foi concentrada em evaporador rotativo, com temperatura mantida em 52 °C, até aproximadamente 1 mL e o volume foi aferido para 1mL em fluxo de nitrogênio. As amostras foram, então, encaminhadas para análise em cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de espectrometria de massas, no qual foi desenvolvida metodologia de detecção adequada, otimizando-se parâmetros estabelecidos por Jiménez *et al.*(2007).

6.4.4 - EXTRAÇÃO DE FIPRONIL EM SEDIMENTO

A extração de fipronil no sedimento da Lagoa do Óleo foi procedida com a utilização de 10 g de amostra previamente seca em estufa a 40 °C. À amostra foram adicionados 50 mL da mistura de solventes diclorometano-

hexano na proporção volumétrica 3:2. O conjunto foi submetido à agitação severa em ultra-som por 15 minutos e submetido à filtração em filtros de papel Whatman com 8 µm de abertura de poro (Figura 9). Uma nova alíquota de 50mL de solventes foi adicionada e o conjunto submetido ao mesmo processo de agitação. Este procedimento foi repetido três vezes para cada amostra, gerando 150 mL de extrato. O extrato teve seu volume reduzido para aproximadamente 1 mL em um evaporador rotativo a 52 °C e encaminhado à etapa de *clean-up* (limpeza do extrato).



Figura 9 – Parte do processo de extração em sedimento

6.4.5 – PROCESSO DE “CLEAN-UP” (LIMPEZA DO EXTRATO)

Quando se realiza um processo de extração em sedimento com solventes orgânicos, não somente o analito alvo do processo é extraído, como também inúmeros interferentes com a mesma afinidade pelos solventes utilizados. Para a obtenção de um extrato mais puro, contendo apenas os compostos de interesse, foi realizada uma limpeza do extrato em colunas de vidro de 10 cm de comprimento (Figura 10) contendo 5 g de sílica ativada (previamente seca em estufa a 100 °C por 24 h) e 1 g de alumina. A amostra concentrada foi introduzida no sistema, seguindo-se a adição de mais 20 mL da mesma mistura de solventes utilizada na extração. A mistura percolou pela coluna e o extrato resultante do processo foi recolhido na base do sistema, já com uma quantidade reduzida de interferentes.

Após o processo de limpeza, o extrato foi novamente concentrado em evaporador rotativo a 52 °C até atingir, aproximadamente 1mL (Figura 11). O volume foi levado a exatos 1 mL com auxílio de fluxo de nitrogênio.



Figura 10 - Coluna de vidro para limpeza de extrato.



Figura 11 – Concentração de amostra em evaporador rotativo.

6.4.6 - ANÁLISE DE FIPRONIL POR CROMATOGRAFIA GASOSA

O fipronil foi analisado em um cromatógrafo a gás da marca Shimadzu (Japão) Modelo QP2010 acoplado a um detector de espectrometria de massas da mesma marca. Os parâmetros utilizados para a detecção foram otimizados com base em trabalhos desenvolvidos por Brondi (2000) e Jiménez *et al.* (2007). Para a determinação dos limites de detecção da metodologia, foram realizadas sete extrações de amostras contendo 1 mL de padrão de cada um dos compostos na concentração 15 $\mu\text{g L}^{-1}$. O limite de detecção equivale ao produto do desvio padrão obtido na análise pelo valor de *t-student* para seis graus de liberdade (USEPA, 2002).

Para o posterior cálculo das concentrações reais, após a detecção, os valores foram ponderados utilizando os volumes ou massas utilizados durante as extrações, como descrito pela equação 1.

$$C_f = \frac{C_{det} \cdot V_i \cdot 100}{V_f \cdot R(\%)} \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

C_f = Concentração real

C_{det} = Concentração detectada

V_i = Volume (ou massa) da amostra

V_f = Volume final do extrato

R = Recuperação da extração (%)

6.5 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS PRESENTES NAS MATRIZES COLETADAS CAPAZES DE UTILIZAR O FIPRONIL COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO EM MEIO ENRIQUECIDO COM ESTE COMPOSTO

As amostras de sedimento dos cinco pontos de coleta da Lagoa do Óleo, uma amostra de solo do entorno da lagoa e uma amostra de perifiton foram utilizadas como inoculo para o isolamento de microrganismos capazes de degradar o fipronil em sua forma comercial. A massa de 100 g de cada amostra foi adicionada a 100 mL de meio de cultura FTW (K_2HPO_4 , 0.225 g L⁻¹; KH_2PO_4 , 0.225 g L⁻¹; $(NH_4)_2SO_4$, 0.225 g L⁻¹; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05 g L⁻¹; $CaCO_3$, 0.005 g L⁻¹; e $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,005 g L⁻¹ somados a 1ml de solução de elementos traço com $MnSO_4 \cdot H_2O$, 169 mg L⁻¹; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 288 mg L⁻¹ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 250 mg L⁻¹ $NiSO_4 \cdot 6H_2O$, 26 mg L⁻¹; $CoSO_4$, 28 mg L⁻¹; e $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 24 mg L⁻¹) (Siddique *et al.*, 2003) contendo fipronil comercial à concentração de 100 mg L⁻¹, conforme metodologia descrita por Focht (1994). O material foi deixado sob agitação a 25°C por duas semanas. Alíquotas de um volume de 100 µL de cada sistema foram transferidas para novos Erlenmeyers contendo 100 mL do meio de cultura enriquecido com o pesticida, na mesma concentração, com a finalidade de eliminar a interferência do carbono presente no sedimento. Os

sistemas foram mantidos sob agitação e temperatura controladas por mais duas semanas. Com a finalidade de isolar as linhagens de microrganismos presentes em cada sistema, após o período de incubação, os Erlenmeyers foram deixados em repouso por 2 horas e 100 µL de sobrenadante de cada sistema foram transferidos para placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura enriquecido com fipronil e 2 % de ágar. As placas de Petri foram incubadas à 25 °C por 10 dias. As colônias de microrganismos foram repicadas para novas placas contendo o mesmo meio de cultura, até que se conseguisse o completo isolamento das linhagens.

6.5.1 – CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DAS LINHAGENS DE MICRORGANISMOS ISOLADAS

As linhagens de bactérias foram caracterizadas pelo método de coloração de Gram (Gram, 1884), que consiste no preparo de esfregaços bacterianos fixados na chama do bico de Bunsen e posterior coloração com um corante primário (cristal violeta 20 g L⁻¹) seguido de fixação com solução de lugol 10 g L⁻¹, descoloração com solvente orgânico etanol e coloração com um corante secundário (safranina 0,25 %).

As linhagens de fungos foram analisadas microscopicamente pela técnica do microcultivo em lâminas. A técnica consiste em inocular os fungos em meio de cultura agarizado fundido que é posteriormente espalhado, com alça de platina estéril, sobre lâminas e cobertos por lamínulas, ambos estéreis. Essas lâminas foram incubadas assepticamente em câmaras úmidas por cinco dias para permitir o crescimento das hifas e estruturas reprodutivas do fungo.

Em seguida, todas as lâminas foram levadas a um microscópio óptico acoplado a câmera de vídeo para registro das imagens.

6.6 - ENSAIOS EM MICROCOSMOS PARA AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DE FIPRONIL NA LAGOA DO ÓLEO

Com a finalidade de entender o destino do fipronil na Lagoa do Óleo, foram desenvolvidos estudos em microcosmos, que visaram avaliar, ao longo

do tempo, as concentrações de fipronil em água e sedimento da Lagoa do Óleo. A partir dos resultados, foi proposto um modelo cinético que contemplou etapas importantes para caracterização do destino do composto, tais como, taxas de sedimentação, degradação química e biológica na água e no sedimento.

6.6.1 - MONTAGEM DOS MICROCOSMOS

Foram montados um total de vinte microcosmos (um microcosmo e uma réplica por período de abertura) utilizando frascos de cerca de 5 L de capacidade que continham 3 L de água e 650 g de sedimento. Para a montagem dos sistemas, foram utilizados, ao todo, 120 L de água de superfície do ponto de coleta que exibiu contaminação com fipronil nas análises cromatográficas em amostras de sedimento e cerca de 26 kg de sedimento do mesmo ponto. Antes de adicionar 650 g de sedimento a cada sistema, a massa total coletada foi homogeneizada com auxílio de uma pá previamente limpa e descontaminada com acetona, em um recipiente protegido por sacos plásticos. A água foi disposta em outro tonel plástico e adicionada de fipronil comercial Regent 800 WG atingindo a concentração final de 1g L^{-1} do composto. A alta concentração de fipronil introduzida nos microcosmos visou avaliar a biodegradação e o crescimento de microrganismos sem interferência da rápida redução das concentrações (problema citado por Zhou Pei *et al.*, 2004, que obtiveram curtos tempos de meia vida por, entre outros fatores, utilizarem concentrações muito baixas em seus experimentos, fazendo com que o composto fosse prontamente absorvido pelos vegetais estudados, tornado-se rapidamente indetectável). Foram também montados 10 microcosmos nos quais não foi adicionado fipronil (branco sem fipronil para controle de características físicas e químicas) e 10 microcosmos com fipronil sendo que a água contaminada com o inseticida, o sedimento e os frascos foram previamente esterilizados em autoclave, por 30 minutos a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ em 1 atm de pressão. Deve ser ressaltado que estes últimos sistemas visaram o controle da oxidação química e sedimentação do composto. Os procedimentos de montagem dos microcosmos estéreis foram feitos assepticamente em capela de fluxo laminar previamente esterilizada com luz ultra violeta por 30 min.

6.6.2 - ANÁLISES NOS MICROCOSMOS

Pelo período total de 97 dias foram analisadas as concentrações de fipronil em água e sedimento de dois microcosmos e um branco estéril. As extrações seguiram os mesmos procedimentos supracitados, exceto a extração de fipronil da água, que utilizou apenas 20 mL de amostra para que não saturassem os cartuchos de C₁₈, dadas as altas concentrações de fipronil nos microcosmos. As análises foram realizadas em dez dias amostrais, contemplando os seguintes períodos (dias após a montagem): 1, 4, 7, 12, 19, 24, 31, 40, 62, 97. A escolha destes períodos obedeceu a um critério baseado na concentração obtida na amostra anterior, isto é, uma variação grande nas concentrações em pouco tempo reduziam o período para a próxima amostragem e uma variação pequena, aumentava este tempo.

Em cada microcosmo, foram também avaliadas as características físicas e químicas da água com auxílio de uma sonda multi parâmetros da marca YellowSpring modelo YSI 650 MDS e as concentrações de nitrato, nitrito, nitrogênio amoniacal, nitrogênio orgânico total, fósforo total e ortofosfato em água, por meio das metodologias anteriormente descritas. Foi também determinada, ao longo do tempo, a toxicidade da água dos microcosmos com a utilização do sistema Microtox[®].

Para cada período de avaliação das concentrações de fipronil, amostras de 10g de sedimento foram utilizadas como inóculos de microrganismos e foram, por meio da metodologia já citada, inoculados em placas de Petri com meio de cultura FTW com fipronil comercial na concentração 100 mg L⁻¹ e mantidos em temperatura constante a 25 °C por 10 dias. Após o período de incubação, foram contadas as unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de sedimento e separadas de acordo com as características visuais apresentadas. Este procedimento foi realizado para os microcosmos com e sem adição de fipronil. Após a contagem de colônias, foi calculado o índice de diversidade de Shannon (H'), assumindo-se que cada tipo de colônia equivale a uma espécie (equação 2)

$$H' = -\sum_{i=1}^S (p_i * \ln p_i) \quad (\text{equação 2})$$

onde,

S = número de espécies e

P_i = abundância relativa de cada espécie



RESULTADOS E DISCUSSÃO

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 - VARIÁVEIS FÍSICAS E QUÍMICAS NA LAGOA DO ÓLEO

Entre as variáveis físicas e químicas, o oxigênio dissolvido é extremamente sensível às variações na qualidade de água em decorrência do regime hidrológico (Albuquerque, 1992). Os gráficos representados pela Figura 12 permitem observar que o ambiente estudado apresenta teores relativamente baixos de oxigênio durante o período de seca, devido à agitação da coluna de água, que pode reduzir a oxigenação

. Além disso, neste período, a utilização do oxigênio dissolvido na oxidação da matéria orgânica reflete estes baixos teores de oxigênio (Krusche, 1995). Neste período, parte da matéria orgânica é degradada por processos anaeróbicos no hipolímnio, em consequência do decaimento nos teores de oxigênio. No período chuvoso, os perfis de oxigênio refletem uma coluna de água mais oxidada e homogênea (os coeficientes de variação para seca e chuva foram, respectivamente, 23 % e 17 %). Isto sugere maior mistura das massas de água durante o período das chuvas. No período de cheias, a entrada de águas alóctones contribui para a homogeneização da coluna de água (Sampaio, 1998). A comparação dos valores de turbidez nos dois períodos (média do período seco = 0,922 NTU; média no período chuvoso = 8,9 NTU), ratificam esta informação.

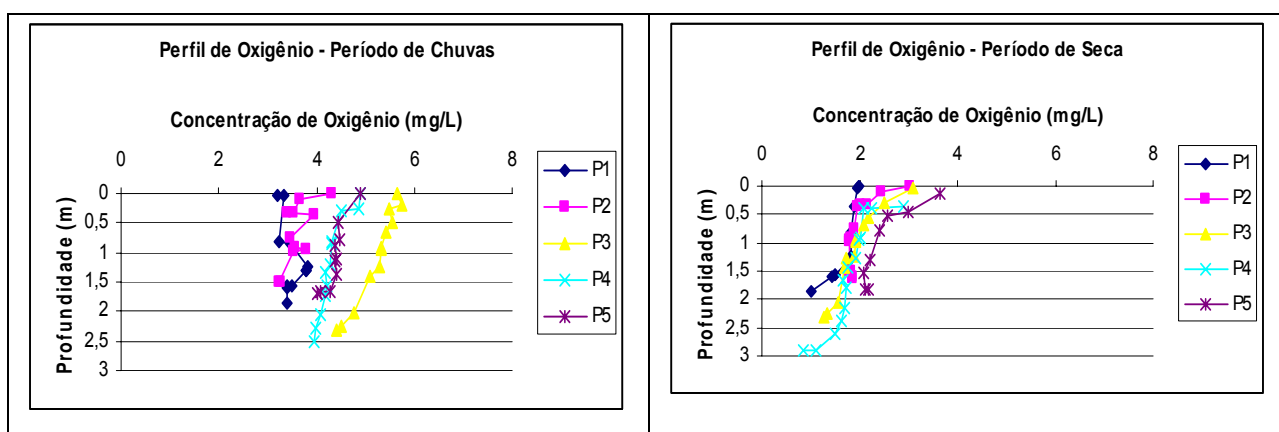


Figura 12 – Perfil de oxigênio dissolvido na coluna de água da lagoa do Óleo (períodos de seca e chuva)

7.2 - ANÁLISES DE NUTRIENTES EM ÁGUA

Quanto às tendências das concentrações das formas nitrogenadas dissolvidas nas águas da Lagoa do Óleo durante o período de seca (Figura 13) devem ser evidenciados os altos valores, principalmente de amônia e nitrogênio orgânico total na região hipolimnética. Os altos teores de nitrogênio amoniacal quando comparado com as outras formas de nitrogênio inorgânico devem-se às condições redutoras do hipolímnio, onde os processos naturais de desnitrificação dão lugar à redução do nitrato por amonificação. O nitrogênio orgânico total superou em muitas vezes os totais de nitrogênio inorgânico, o que pode ser consequência da abundante biomassa de plantas vasculares em decomposição, principalmente no hipolímnio (informação baseada em observações de campo), justificando os baixos teores de oxigênio dissolvido neste compartimento: com a decomposição aeróbia, o teor de oxigênio dissolvido decai e os processos de degradação passam a ser anaeróbios. A comparação entre os períodos de seca e chuva permite observar que não há diferenças tão evidentes nas concentrações das formas nitrato e nitrito, porém, quando se observam as tendências do nitrogênio amoniacal, pode ser concluído que, no período chuvoso, os teores do composto são superiores em todos os compartimentos analisados, o que indica maior taxa de decomposição neste período, resultante de uma incorporação de matéria orgânica alóctone no ambiente. Postula-se aqui que esta conclusão pode ser ratificada pelos valores de nitrogênio orgânico total que evidenciam uma maior concentração em todos os compartimentos durante o período chuvoso.

Os teores de fósforo e nitrogênio são considerados fatores limitantes ao crescimento de vegetação em lagos (Esteves, 1988). Juntamente com valores de clorofila 'a' e transparência da água, os teores de fósforo são utilizados para caracterizar o estado trófico do ambiente. Apesar dos baixos valores, indicando um ambiente entre oligotrófico e mesotrófico (segundo Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos – USEPA, 2000), as concentrações de fósforo total elevaram-se sutilmente com aumento da profundidade, tanto no período de seca, como no período chuvoso (Figura 13), e as concentrações nas águas intersticiais superaram em muitas vezes os valores da coluna de água, evidenciando maior concentração destes elementos no compartimento do

sedimento. Estes altos valores permitem enxergar de forma clara as diferenças entre os períodos seco e chuvoso. O sistema apresentou uma substancial diferença nos teores de fósforo total quando comparados os dois períodos, mais uma vez evidenciando a elevação dos teores de nutrientes no período chuvoso. A forma dissolvida de fósforo, durante o período de seca apresentou baixas concentrações, enquanto no período chuvoso estes valores elevaram-se. Isso se deve ao aporte alóctone de nutrientes e à perturbação da coluna de água e re-suspensão do sedimento no período de chuvas: durante o período de seca, a coluna de água é menos perturbada, possibilitando o desenvolvimento abundante de fitoplâncton e macrófitas aquáticas. Tendo em vista que se trata de um composto limitante à produção primária, pode ser concluído que os baixos teores de ortofosfato no período de estiagem devem-se à pronta absorção por estes organismos produtores (Guereschi e Fonseca-Gessner, 2000); neste período, o bombeamento do fósforo presente no sedimento por macrófitas aquáticas é a principal fonte deste composto para a coluna de água (Esteves, 1988), bem como, a entrada de fósforo adsorvido aos oxi-hidróxidos de ferro, manganês e alumínio no período das chuvas com as águas de inundação (Albuquerque, 1992; Mozeto e Albuquerque, 1997; Albuquerque e Mozeto, 1997).

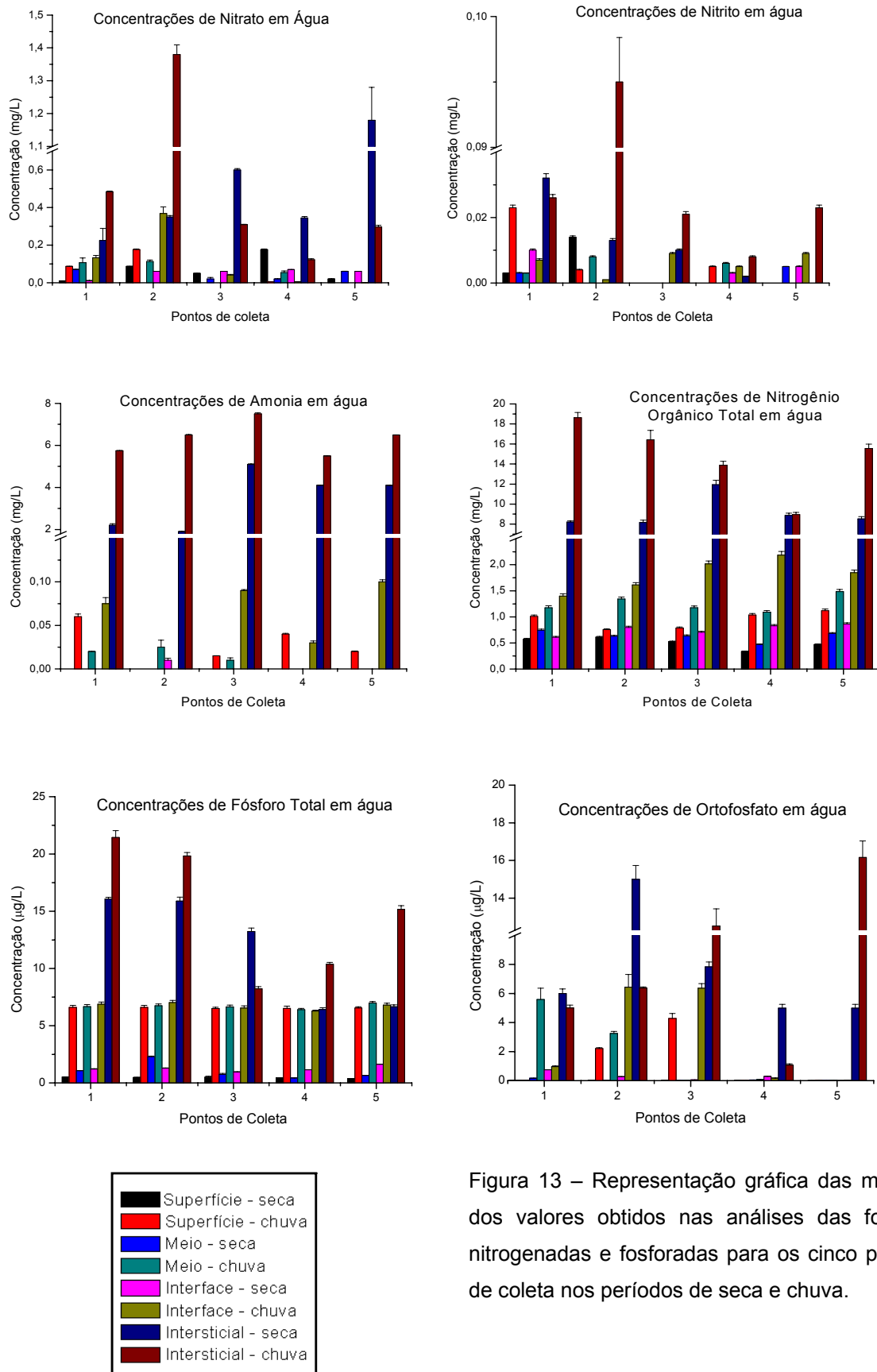


Figura 13 – Representação gráfica das médias dos valores obtidos nas análises das formas nitrogenadas e fosforadas para os cinco pontos de coleta nos períodos de seca e chuva.

Durante o período de seca, as concentrações de sulfetos (Figura 14) mostraram-se baixas e homogêneas em toda a coluna de água, principalmente nos pontos de coleta 1 e 2 que, como já descrito anteriormente, apresentavam visivelmente uma maior quantidade de detritos orgânicos. A forma oxidada sulfato, entretanto, mostrou-se homogênea entre os pontos de coleta, porém com substancial diferença entre os períodos, exibindo relativamente altas concentrações durante o período chuvoso e concentrações nulas ou quase nulas durante o período seco, possivelmente devido aos maiores teores de oxigênio durante o período chuvoso, que ocasionam a oxidação dos sulfetos a sulfatos. Apesar disso, os valores das concentrações de sulfatos no período chuvoso são muito superiores às diferenças entre os teores de sulfetos nos dois períodos o que indica que os teores totais das espécies de enxofre são significativamente maiores durante o período chuvoso, principalmente nos pontos 1 e 2. Este fato sugere que, durante o período chuvoso, o revolvimento do sedimento por perturbações na coluna de água bem como a incorporação de material alóctone podem ser grandes colaboradores para o aumento dos teores de nutrientes na coluna de água durante este período. Pode-se ainda inferir que, durante a estiagem, a forma predominante de enxofre na coluna de água é o sulfeto, dados os menores teores de oxigênio dissolvido.

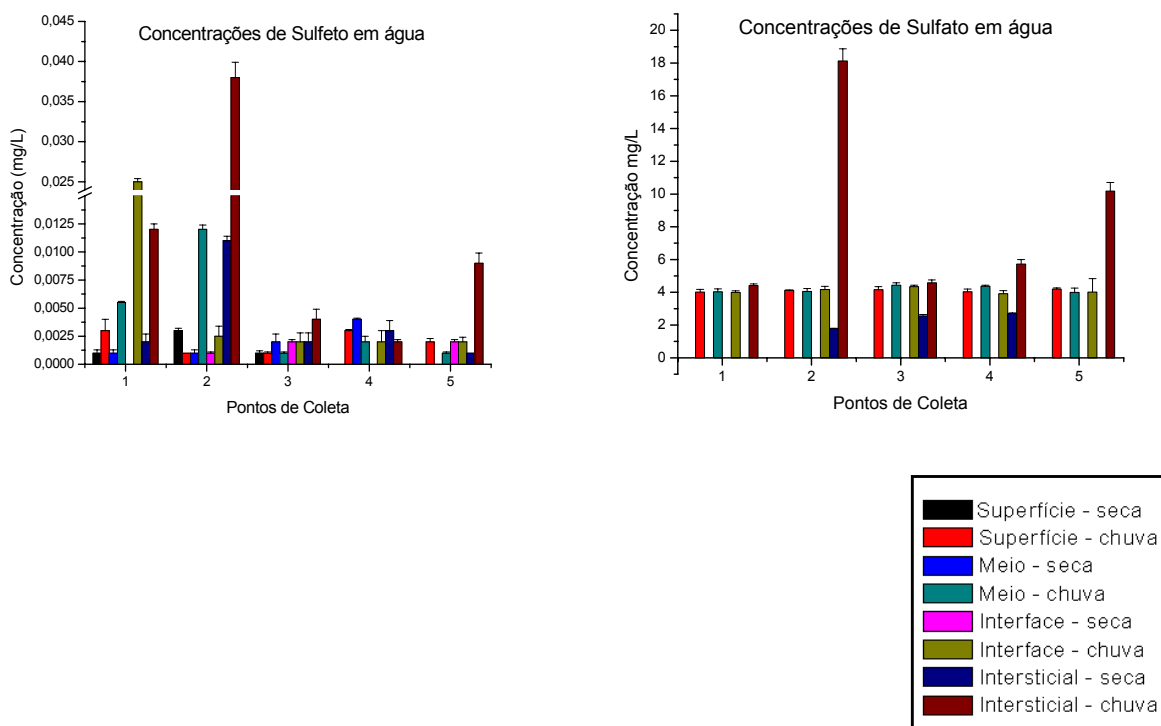


Figura 14 Representações gráficas das médias dos valores obtidos nas análises das formas sulfuradas para os cinco pontos de coleta nos períodos de seca e chuva.

As concentrações de fluoreto (Anexo 1) foram baixas em toda a coluna de água em ambos os períodos de coleta, o que pode ser tomado como uma indicação de ausência de fontes de esgoto doméstico nas proximidades da Lagoa do Óleo (Soares e Mozeto, 2006), tendo em vista que, geralmente, este composto é detectado em altas concentrações apenas em ambientes contaminados por efluentes domésticos.

Os teores de cloreto na coluna de água mostraram-se extremamente baixos em ambos os períodos, no entanto, foram encontradas altas concentrações nas águas intersticiais, principalmente no ponto 5, no período de seca (Anexo 1). Uma possível explicação para este evento reside no fato de que a Lagoa do Óleo é mantida por descargas de águas subterrâneas, principalmente na região mais próxima do Rio Mogi-Guaçu, como postulado por Mozeto *et al.* (1989). Altos teores de cloreto indicariam, também, interação entre águas do rio principal e da lagoa em questão, que pode estar ocorrendo mesmo no período de estiagem. Durante o período de chuvas, as concentrações de cloreto na maior parte dos pontos de coleta mostraram-se levemente mais elevadas quando comparadas às do período de estiagem, no entanto o ponto 5 apresentou uma redução no teor do íon, o que pode dever-se à mistura da coluna de água neste período do ano.

Talvez o composto que melhor caracterize a distribuição de matéria orgânica na coluna de água da Lagoa do Óleo seja o carbono dissolvido (composto por uma grande fração orgânica e uma pequena fração inorgânica) como mostrado na Figura 15.

Em ambos os períodos, suas concentrações indicam um ambiente relativamente pobre em matéria orgânica na coluna de água, com características típicas de lagos cercados por florestas (Esteves, 1988), porém, as concentrações de carbono dissolvido dão um grande salto quando analisadas as águas intersticiais. Aliado às observações em campo sobre a grande quantidade de vegetais em decomposição no sedimento da Lagoa do Óleo, este fato indica uma grande quantidade de organismos decompositores neste compartimento do sistema. O carbono orgânico dissolvido é representado, além de outras formas, por compostos intermediários dos processos de decomposição, e se constitui na principal fonte de carbono dos organismos heterotróficos em ambientes aquáticos (Cunha-Santino e Bianchini

Jr., 2006), visto que as suas concentrações no período de chuvas são significativamente mais elevadas quando comparadas às do outro período avaliado, e ratificam a informação de que há uma maior decomposição e uma contribuição alóctone durante o período chuvoso.

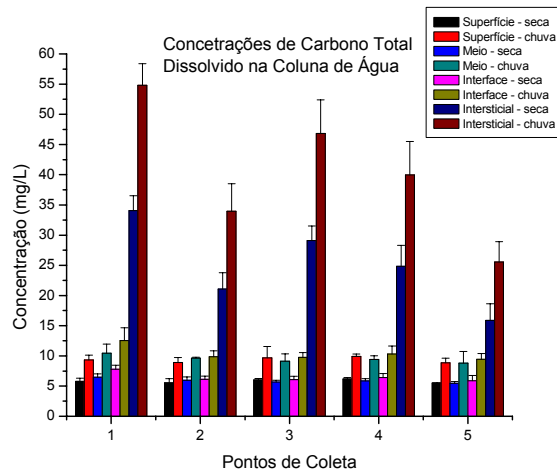


Figura 15 - Concentrações de carbono dissolvido na coluna de água durante os períodos seco e chuvoso

De uma forma geral, pode ser concluído que o período caracterizado por chuvas intensas apresentou elevados teores de nutrientes, quando comparados ao período mais seco. A análise de componentes principais (ACP) aplicada aos dados é capaz de explicar praticamente 100 % dos dados e demonstra a discriminação dos dois períodos de coleta, quando considerados os nutrientes da água na coluna de água (Figura 16). Para esta análise não foram incluídos os valores das águas intersticiais, uma vez que suas grandezas mascarariam as diferenças explicadas pelos outros compartimentos.

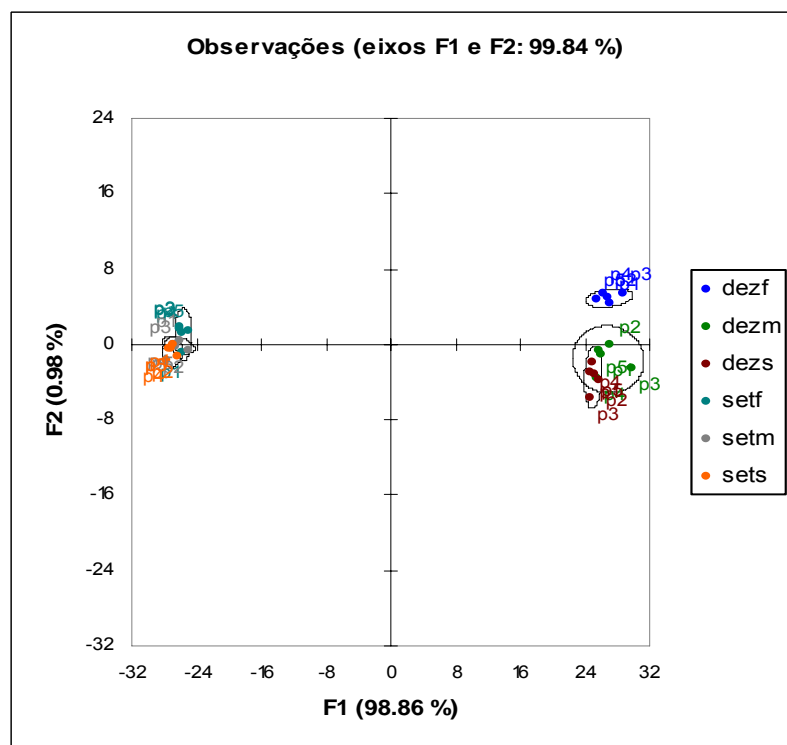
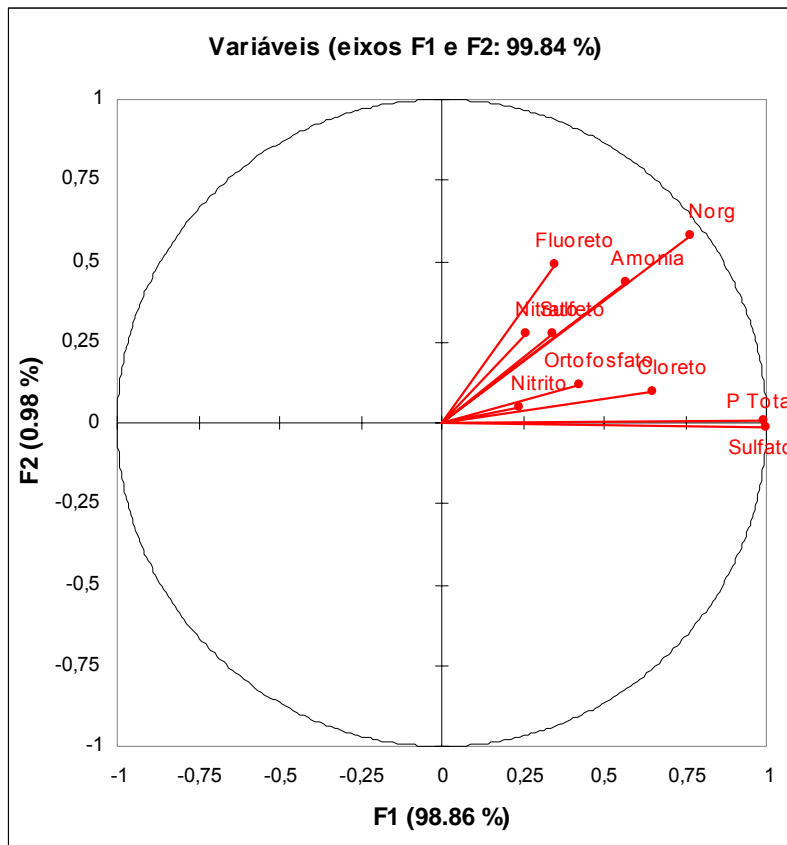


Figura 16 4– Análise de componentes principais mostrando a separação entre os pontos de coleta pelas variáveis analisadas. s=superfície, m=meio, f=fundo, dez = dezembro (período de chuvas) e set = setembro (período de seca).

Esta análise deixa clara a separação entre o período de seca e o chuvoso no que diz respeito às concentrações de nutrientes na coluna de água, evidenciando que todos os pontos de coleta do período chuvoso apresentaram maiores concentrações, principalmente de sulfato e fósforo total. É também notável a separação entre os grupos superfície, meio e fundo, influenciada, principalmente, pelas altas concentrações das formas nitrogenadas no hipolímnio do ecossistema estudado.

7.3 - ANÁLISES DE NUTRIENTES EM SEDIMENTO

As análises de nutrientes no sedimento evidenciam os altos teores de nitrogênio total, carbono total, enxofre total e fósforo total neste compartimento do ecossistema (Figura 17). Nota-se um comportamento diferenciado para cada um dos compostos analisados. O carbono total mostra maiores concentrações no período de chuvas nos pontos 1 e 2, e menores nos pontos 3, 4 e 5. Os pontos 1 e 2 estão cercados por vegetação terrestre de grande porte, portanto, o carbono destes pontos de coleta representa uma grande contribuição alóctone desta vegetação. Nos demais pontos de coleta, no período de seca, há uma menor turbidez devido à baixa perturbação, o que possibilita um aumento da zona fótica e, conseqüentemente, o desenvolvimento de macrófitas aquáticas e fitoplâncton. A degradação destes organismos gera matéria orgânica particulada rica em carbono, que pode ser responsável pelos resultados apresentados. Os teores de nitrogênio no sedimento praticamente não mostraram diferenças entre os períodos de seca e chuva, assim como os de enxofre. Entretanto, as concentrações de fósforo total, apresentam um padrão em todos os pontos de coleta, de altos valores no período chuvoso e baixos valores no período seco, refletindo a contribuição alóctone já discutida no item anterior.

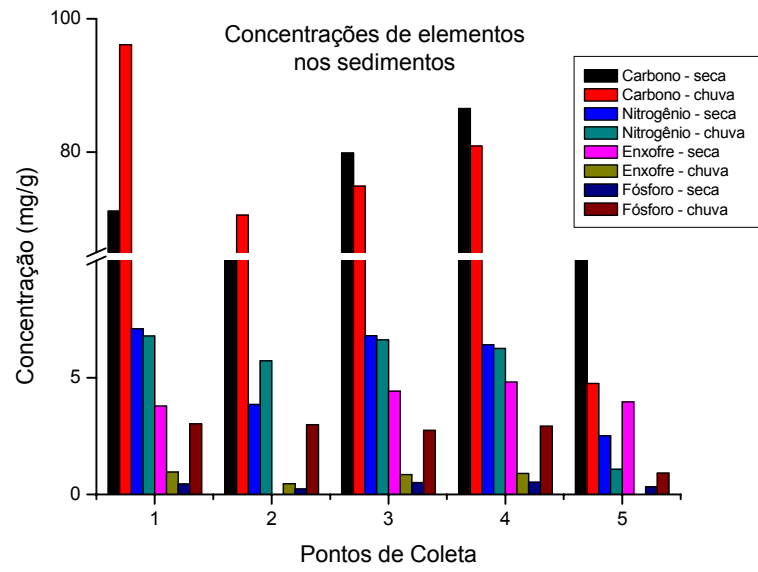


Figura 17 – Análises de carbono total (C), nitrogênio total (N), enxofre total (S) e fósforo total (P) nos sedimentos dos cinco pontos de coleta da Lagoa do Óleo durante os períodos de seca (setembro de 2007) e de chuva (dezembro de 2006).

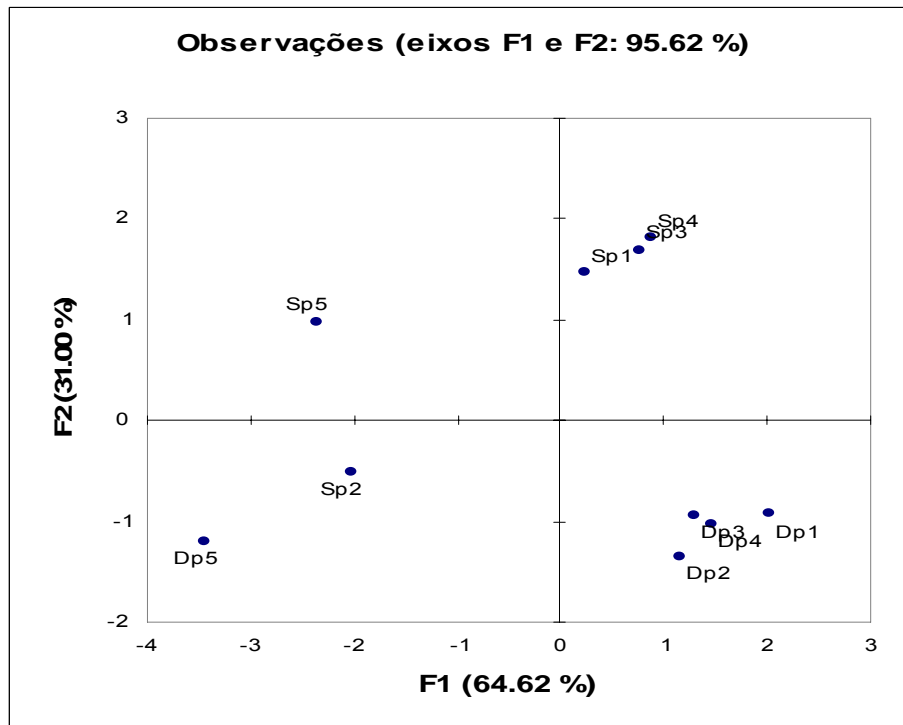
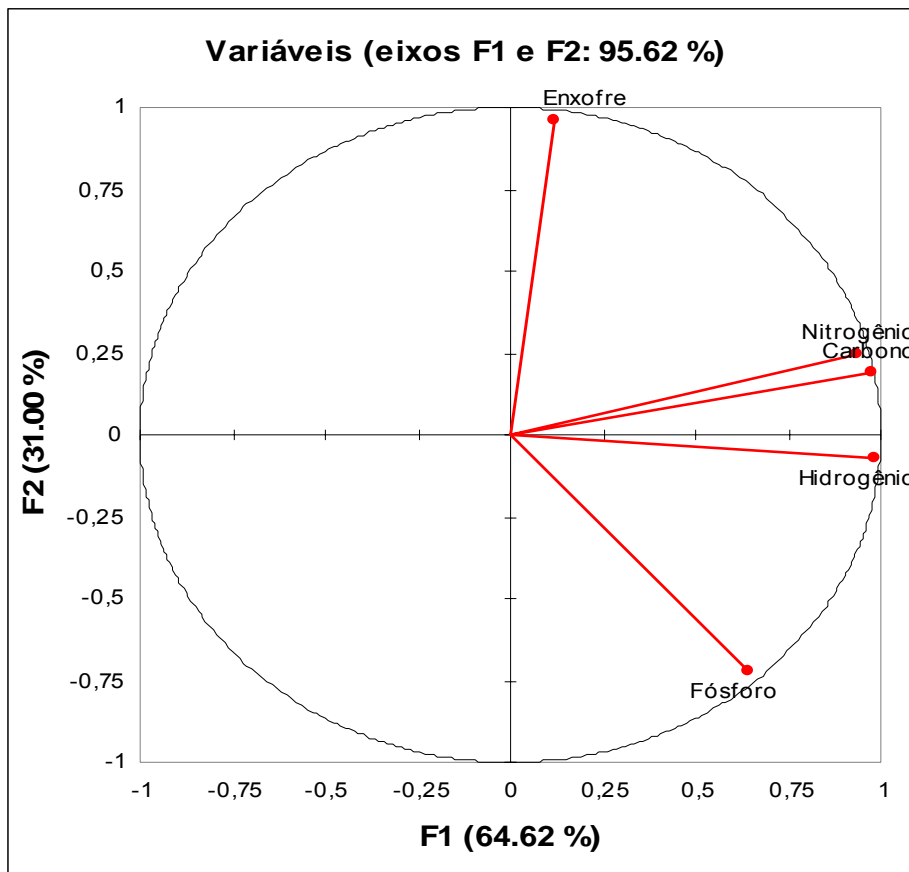


Figura 18 - Análise de componentes principais, comparando os períodos de seca e chuva nos cinco pontos de coleta quanto às concentrações de carbono total(C), nitrogênio total (N), enxofre total (S) e fósforo total (P) no sedimento.

É notável, observando-se a análise de componentes principais (Figura 18), que o ponto cinco foi o que apresentou a menor concentração de nutrientes em ambos os períodos. É possível concluir que as elevadas concentrações de fósforo durante o período de chuvas foram os principais colaboradores para a separação destes períodos e indicam uma grande contribuição alóctone de fósforo no período chuvoso que pode ser atribuído à incorporação de material particulado ao sedimento neste período, como antes demonstrado por Mozeto e Albuquerque (1997).

7.4 – MODELO CONCEITUAL DE EXPOSIÇÃO DA LAGOA DO ÓLEO AO FIPRONIL

Modelos conceituais são fundamentais para o esclarecimento das rotas de exposição a um contaminante e o estabelecimento de indicadores para a avaliação de risco ambiental Moraes *et al.* (2002). A natureza e a magnitude dos riscos são dependentes das condições específicas do local estudado, que incluem a natureza da contaminação, a natureza dos contaminantes, e as rotas de exposição (Bidges, 2006). A Figura 19 exhibe um modelo conceitual que caracteriza as rotas de exposição da Lagoa do Óleo ao fipronil aplicado em seu entorno, desde a fonte até os receptores.

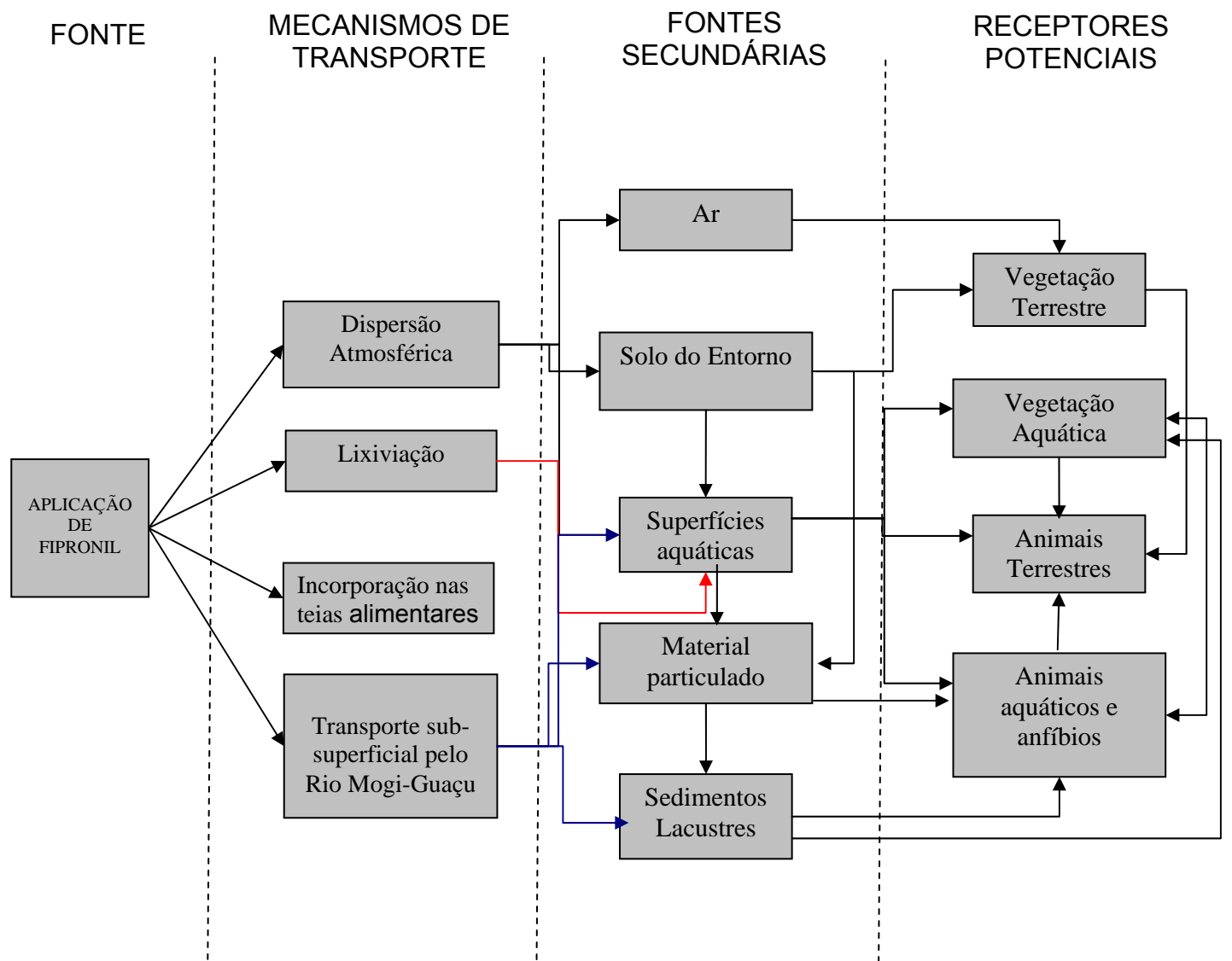


Figura 19 – modelo estocástico conceitual para caracterizar a exposição do ecossistema que abrange a Lagoa do Óleo e seu entorno aos agroquímicos utilizados na região.

A Estação Ecológica de Jataí encontra-se inserida em uma região agrícola, dominada pelo cultivo de cana-de-açúcar em praticamente, todo seu entorno. A aplicação de agroquímicos neste tipo de cultivar é notoriamente abundante em toda sua fase de desenvolvimento. Levando-se em conta que a Lagoa do Óleo encontra-se próxima dos limites desta área de proteção ambiental, constitui-se em um ecossistema, com riscos de contaminação pela aplicação de defensivos agrícolas e fertilizantes.

A comparação das concentrações de nutrientes entre os períodos de estiagem e de chuvas torna evidente a contribuição do material alóctone para o ecossistema estudado, e evidencia que há um risco ecológico aumentado ao qual a Lagoa do Óleo se expõe quando são utilizados defensivos agrícolas no seu entorno. A Figura 19 evidencia algumas rotas de exposição do corpo de água em estudo ao fipronil aplicado nas plantações de cana-de-açúcar do entorno evidenciando as principais rotas de exposição.

Para o combate ao lepidoptero *Diatraea saccharalis*, ao coleóptero *Migdolus fryanus* e a diversos tipos de cupins, o produtor do Regent 800 WG (fipronil comercial) recomenda que sejam feitas diferentes aplicações de acordo com o inseto-alvo, variando de pulverizações no sulco da semeadura, aplicações de solução concentrada nas folhas ou aplicação de solução concentrada com auxílio de aviões agrícolas em condições de alta infestação. Entre as rotas de exposição da Lagoa do Óleo ao fipronil, podem ser citadas a exposição direta do espelho de água ao spray aplicado por aeronaves ou mesmo aplicado diretamente nas folhas da cana-de-açúcar, além da dispersão pelas cadeias alimentares envolvendo meio terrestre e aquático, tendo em vista que alguns organismos são capazes de acumular elevadas concentrações do composto sem que lhes causem toxicidade (Chaton, *et al.*, 2001), e da lixiviação (essencialmente no período de chuvas), que acarretaria uma contaminação direta das superfícies aquáticas. Uma vez na superfície aquática, o fipronil deverá sofrer processos de quelação à matéria orgânica em suspensão e sedimentação (conseqüente geoacumulação e partição água-sedimento). Outra rota de exposição caracteriza-se pela incorporação ao sedimento da

Lagoa do Óleo por meio de infiltração pelo Rio Mogi-Guaçu, conforme citado anteriormente.

7.5 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

7.5.1 - ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS NA COLUNA DE ÁGUA

De uma forma geral, a água da Lagoa do Óleo, não mostrou toxicidade, exceto para a da interface sedimento-água do ponto 2 do período chuvoso, o que leva à conclusão de que a alta concentração de amônia é responsável pela toxicidade, mostrando uma CE50% de amônia de aproximadamente 4,53 mg L⁻¹. Não há artigos que descrevam testes ecotoxicológicos utilizando matrizes da Lagoa do Óleo, o que impossibilita comparação de resultados.

7.5.2 - ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS EM SEDIMENTO

Os elutriados dos sedimentos dos cinco pontos de coleta foram analisados. No período chuvoso, os sedimentos dos pontos de coleta 1, 2, 3 e 5 apresentaram indícios de toxicidade, enquanto o ponto 4 não apresentou qualquer efeito sobre os organismos testados e o ponto 5 apresentou pouco efeito. No período seco, a toxicidade foi menor em quase todos os pontos de coleta. Conforme supracitado, a grande massa de matéria orgânica em decomposição nos pontos de coleta levaram a um concentração de amônia na água intersticial que supera a sensibilidade da bactéria *Vibrio fischeri* ao composto, que é de, aproximadamente, 3,5 mg L⁻¹ (Qureshi *et al.*, 1982), apontando indícios de toxicidade nos pontos de maior concentração do composto.

7.5.3 - FAIXA DE SENSIBILIDADE DA BACTÉRIA *Vibrio fischerii* AO FIPRONIL

Foi determinada a sensibilidade do sistema MICROTOX[®] ao fipronil comercial (Figuras 20 e 21). Conforme demonstrado, a faixa de sensibilidade obtida foi de 11,2 a 13,5 mg L⁻¹ para 5 minutos de exposição

e de 9,3 a 10,1 mg L⁻¹ para 15 minutos de exposição. Portanto, o pesticida pode ser considerado relativamente tóxico às bactérias, tendo sua sensibilidade similar a outros agroquímicos, como simazina, atrazina e carbaril (Di Fernando *et al.*, 2006).

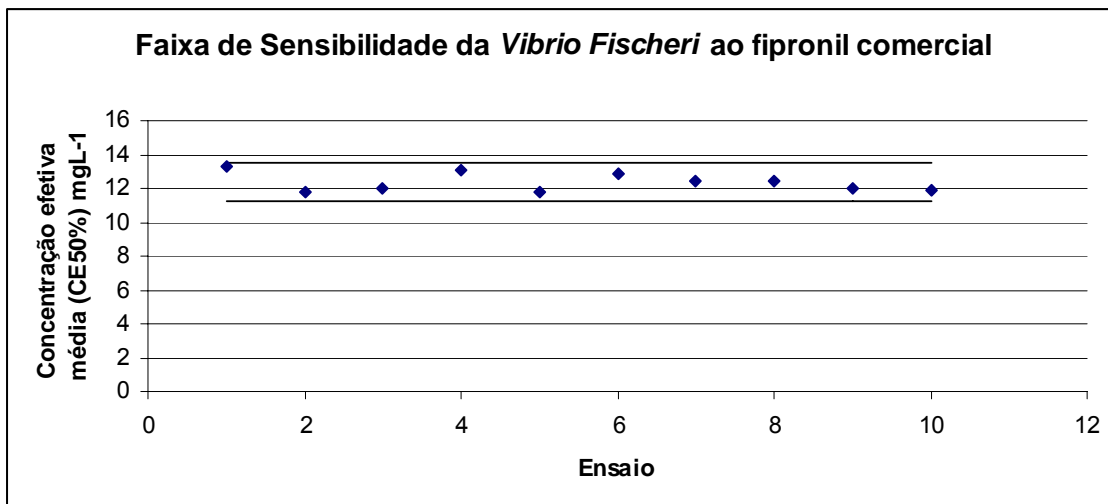


Figura 20 - Faixa de sensibilidade da bactéria *Vibrio Fischeri* ao fipronil comercial para 5 minutos de exposição.

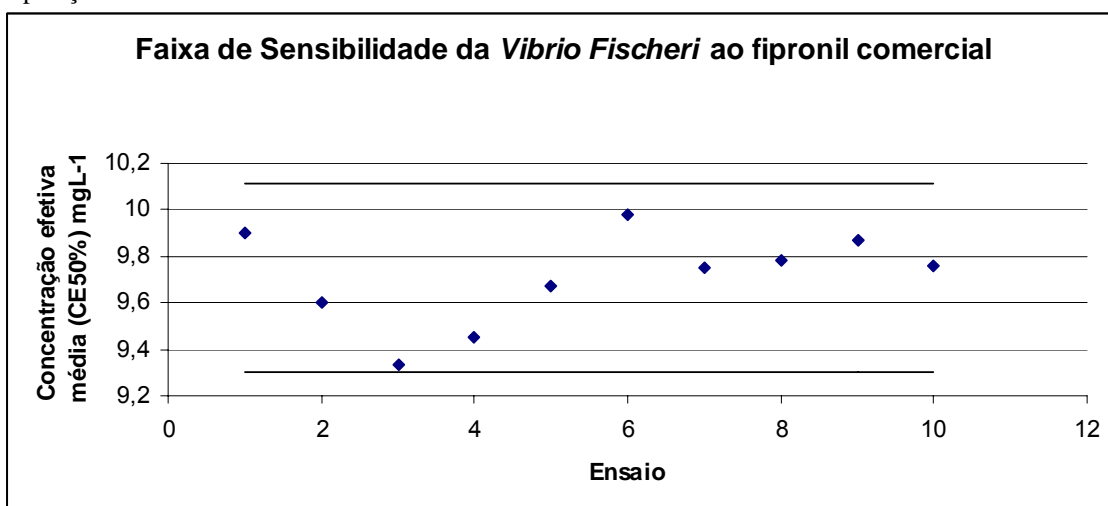


Figura 21 - Faixa de sensibilidade da bactéria *Vibrio Fischeri* ao fipronil comercial para 15 minutos de exposição.

7.6 - ANÁLISE DE FIPRONIL POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Foi desenvolvida uma metodologia de análise para o composto fipronil em cromatografia gasosa acoplada a um detector de espectrometria de massas, adaptando os parâmetros citados por Brondi (2000) e Vílchez *et al.* (2001). As condições do cromatógrafo após otimização encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições do cromatógrafo e do detector para análise de fipronil.

Coluna RTX-5	Coluna capilar de sílica fundida de 30m de comprimento com diâmetro interno de 0,25mm, com fase estacionária com 5% de fenil dimetil polisiloxano.		
Temperatura do Injetor	250 °C		
Modo de Injeção	<i>Splitless</i>		
Fluxo de gás na coluna	1,48 mL min ⁻¹		
Temperatura do Detector	300°C		
Rampa de temperatura	Taxa (°C min ⁻¹)	Temperatura (°C)	Duração na mesma temperatura (min)
	-	75	3
	30	250	6
Modo SIM – Massas analisadas	367, 369 e 213 (Wei Cui, 2008)		

Com esta metodologia foi possível a separação perfeita do pico do fipronil e sua quantificação (Figura 23). O limite de quantificação do cromatógrafo com base na curva analítica (Ribani *et al.*, 2003), foi de 1 µg L⁻¹. A curva analítica para o composto (Figura 22) apresentou coeficiente de correlação de 0,998.

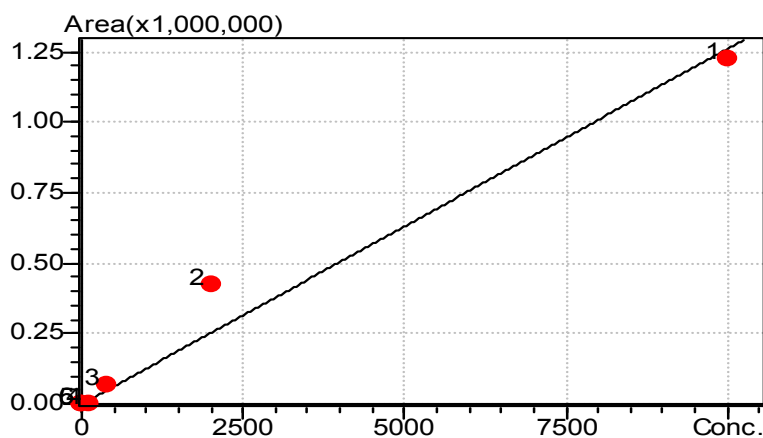


Figura 22 - Curva analítica do composto fipronil.

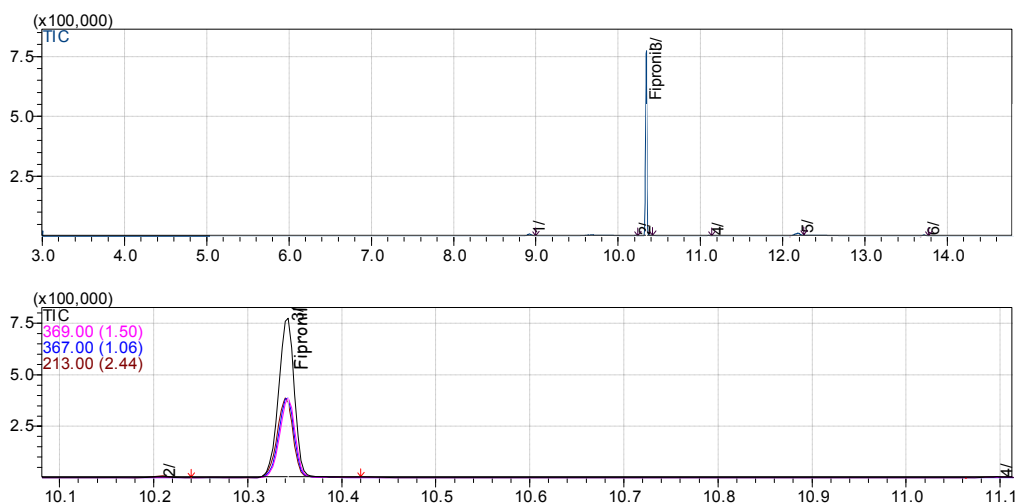


Figura 23 - Cromatograma e fregmentograma do fipronil em uma amostra contaminada pelo composto.

5.5.1 EFICIÊNCIA METODOLÓGICA DE EXTRAÇÃO DO ANALITO EM ÁGUA

A eficiência do processo de extração foi testada por intermédio dos testes de recuperação supracitados e os resultados mostraram uma boa eficiência de extração, com 98,5 % de recuperação.

Os limites de detecção para a metodologia foram calculados pela multiplicação do desvio padrão de sete réplicas de extrações do analito na concentração $1 \mu\text{g L}^{-1}$ pelo valor de *t-student* para 6 graus de liberdade e 95 % de confiança (1,943), conforme descrito na norma internacional da USEPA (2002). O resultado mostra um limite de detecção de aproximadamente $0,11 \mu\text{g L}^{-1}$, baseado em uma média de $0,97 \mu\text{g L}^{-1}$ e um desvio padrão de $0,055 \mu\text{g L}^{-1}$.

7.6.1 - EFICIÊNCIA METODOLÓGICA DE EXTRAÇÃO DO ANALITO EM SEDIMENTO

Os resultados dos testes de recuperação mostram uma boa eficiência de extração, sendo que a média das recuperações foi de 72,3%. O limite de detecção, calculado da mesma forma como foi calculado para as amostras de água foi de $1,05 \mu\text{g L}^{-1}$, baseados em uma média de $0,73 \mu\text{g L}^{-1}$ e um desvio padrão de $0,054 \mu\text{g L}^{-1}$.

7.6.2 - DETECÇÃO DE FIPRONIL NA ÁGUA DA LAGOA DO ÓLEO

Nas amostras de água dos cinco pontos de coleta da Lagoa do Óleo, não foi detectada a presença de fipronil durante os períodos analisados. Estes resultados demonstram que, apesar da lixiviação no período chuvoso, o fipronil pode não ter sido incorporado ao ecossistema estudado, dada a existência de uma área de vegetação natural entre a Lagoa do óleo e as plantações de cana-de-açúcar no entorno. Também é possível afirmar que, se houve aplicações deste pesticida nos canaviais adjacentes em períodos anteriores às coletas das amostras, moléculas do composto em estudo podem ter sido degradadas, tendo atingido concentrações abaixo da detecção.

7.6.3 - DETECÇÃO DE FIPRONIL NOS SEDIMENTOS DA LAGOA DO ÓLEO

Nos sedimentos superficiais da Lagoa do Óleo, na estação chuvosa, o composto foi detectado na concentração de $4,23 \mu\text{g L}^{-1}$ (desvio padrão $0,061 \mu\text{g L}^{-1}$) no ponto 5, e não foi detectado nos demais pontos, que podem não apresentar contaminação pelo composto ou apresentar concentrações dele abaixo da detecção do método empregado. As mais notáveis diferenças do ponto 5 para os demais, residem no fato deste ponto receber águas do rio por fluxo subsuperficial, conforme supracitado. É possível, portanto que as águas do rio sejam um mecanismo de transporte do fipronil para a Lagoa do Óleo.

7.7 - ISOLAMENTO DE LINHAGENS DE MICRORGANISMOS CAPAZES DE UTILIZAR FIPRONIL COMO FONTE DE CARBONO

Foi possível o isolamento de 11 linhagens de microrganismos potencialmente capazes de utilizar o fipronil em sua forma comercial como fonte de carbono, sendo 8 de bactérias e 3 de fungos. No entanto, tendo em vista que o fipronil comercial possui celulose em sua composição, estes

organismos isolados foram repicados para meios de cultura onde a única forma de carbono é celulose, com a finalidade de verificar se os organismos isolados estariam utilizando a celulose e não o composto alvo do estudo.

A Tabela 8 exhibe qualitativamente o crescimento das colônias nos dois meios de cultura. Nota-se que a maior parte dos organismos exibiu crescimento superior no meio contendo fipronil, mas alguns deles cresceram de forma igual nos dois meios de cultura, apontando para a possibilidade de estarem utilizando apenas a celulose como fonte de carbono. Estes resultados demonstram que a presença de organismos capazes de utilizar o composto como fonte de carbono não depende de sua presença no ambiente. Logo, organismos capazes de transformá-lo, também são capazes de utilizar outros compostos como fonte de carbono. O Anexo 5 traz imagens de microscópio óptico das linhagens de organismos.

Tabela 4 – Quantidade de crescimento das colônias das linhagens de microrganismos isolados nos meios de cultura com fipronil na forma comercial e celulose como únicas fontes de carbono, com 5 dias de incubação. - = sem crescimento; + = pouco crescimento; ++ = crescimento intermediário; +++ = crescimento abundante.

NOME CONFERIDO À LINHAGEM	MEIO COM FIPRONIL	MEIO COM CELULOSE
SOLO A	++	+
SOLO B	+++	+
SOLO C	+	+
P1 A	++	++
P1 B	++	-
P2 A	++	++
P3A	+++	+
P4 A	+++	+
P5 A	+++	+++
P5 B	+++	-
PERIFITON A	++	+

7.8 – ENSAIOS EM MICROCOSMOS

A integração e o entendimento de processos que operam em diversos níveis de organização podem ser facilitados pela condução de experimentos em microcosmos em escala apropriada. Os microcosmos podem oferecer altos níveis de complexidade ecológica nos estudos, garantindo também a reprodutibilidade e levando a conclusões mais próximas às do ambiente natural (Culp *et al.*, 2000).

Com vista na agricultura, muitos estudos foram conduzidos para determinação da dinâmica do fipronil aplicado no solo, mas são escassos os trabalhos que descrevem o destino deste composto em ecossistemas aquáticos. Tendo em vista que o grau de adsorção do fipronil em solos é variável e dependente de características como o teor de hidróxidos de ferro

(Masutti e Mermut, 2007), entre outros compostos, dependendo do ambiente e do procedimento de aplicação, é possível que este composto seja, em parte, lixiviado e tenha como destino os corpos de água adjacentes aos campos agrícolas, como é o caso da Lagoa do Óleo.

Conforme descrito anteriormente, os ensaios em microcosmos tiveram duração de 97 dias. Durante o experimento, a temperatura foi mantida com média de 22,71 °C, com pequena variação (desvio padrão de 0,84 °C).

Os gráficos representados pela Figura 24 demonstram o comportamento das variáveis físicas e químicas analisadas nos microcosmos com e sem adição de fipronil.

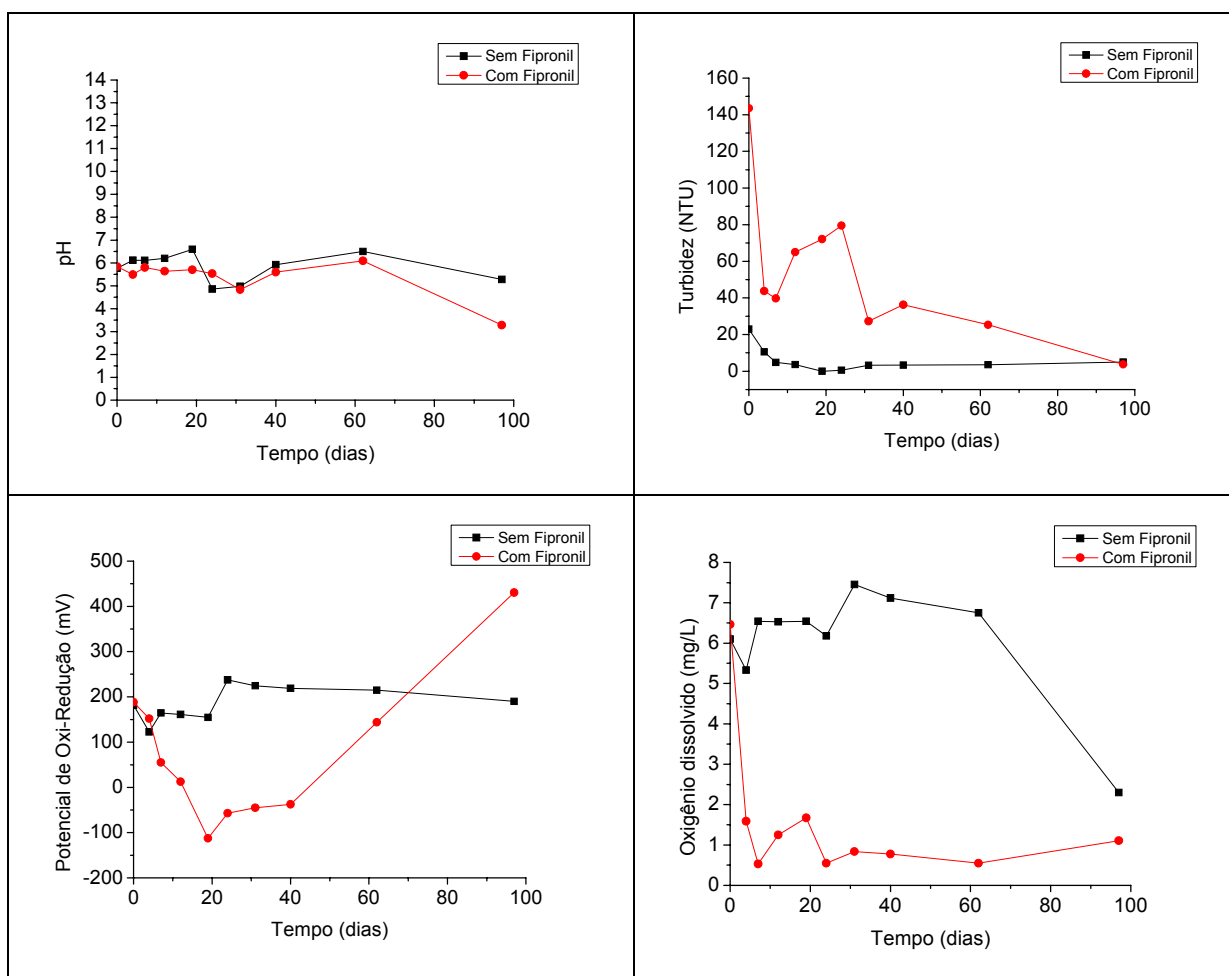


Figura 24 - Variáveis físico-químicas da água dos microcosmos não estéreis com e sem adição de fipronil.

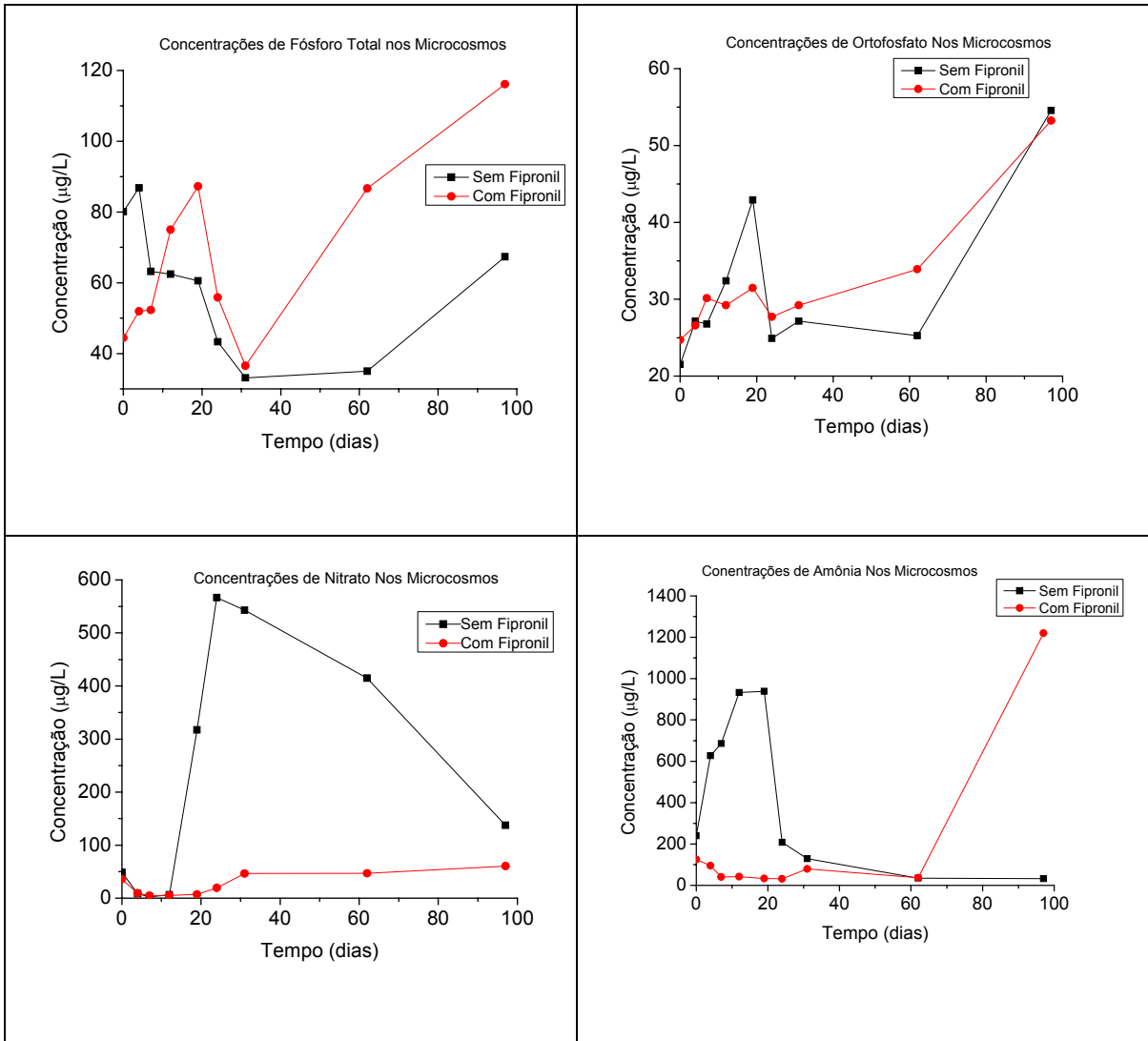
A análise dos gráficos permite observar que a turbidez da água caiu abruptamente nos primeiros sete dias de incubação, o que indica a sedimentação de uma fração do pesticida juntamente com o particulado fino, inicialmente suspenso na coluna de água dos microcosmos. A partir

deste momento, este padrão não foi mais observado, o que pode ser atribuído à intensa atividade microbiana. A turbidez foi, então, reduzindo continuamente com as reduções das concentrações do pesticida na coluna de água. Os valores de pH na coluna d'água permaneceram relativamente constantes, exibindo uma queda no final do período, que pode ser reflexo da respiração microbiana e a conseqüente liberação de gás carbônico e enxofre para o meio aquático durante a degradação da matéria orgânica, nos microcosmos contaminados e não contaminados (Zibilske, 1994). Como os microcosmos contaminados com Regent 800WG[®] continham um teor significativamente maior de matéria orgânica provinda tanto do pesticida, como da celulose, a atividade microbiana reduziu o pH a níveis menores que os dos microcosmos sem adição do pesticida.

Os teores de oxigênio dissolvido nos microcosmos com firponil exibiram uma significativa queda no início do processo, e permaneceram constantes em um nível baixo após os primeiros dez dias de incubação, até o fim do processo, o que favoreceu a degradação por microrganismos anaeróbios facultativos e anaeróbios. No entanto, o potencial de oxi-redução, após quarenta dias de incubação, exibiu uma elevação significativa. Logo, pode-se postular que, por volta de 30 dias de incubação, há a formação de quantidade significativa de compostos oxidantes, resultantes das reações ocorrentes no sistema ou mesmo da atividade microbiana.

Os teores de nutrientes nos microcosmos contaminados apresentaram reduzidos valores das formas nitrogenadas. Como os processos de amonificação, fixação de nitrogênio, e nitrificação são dependentes tanto do potencial de oxi-redução quanto de atividade de microrganismos específicos, a toxicidade dos microcosmos manteve os teores de nitrato e nitrito constantemente baixos. Estes processos biológicos ocorreram normalmente nos microcosmos controle a partir do nitrogênio eliminado durante o processo de degradação de matéria orgânica, até que os teores de compostos nitrogenados e fósforo total tornaram-se extremamente reduzidos, apontando para uma redução do teor total de matéria orgânica do sistema devido à sua mineralização. Nos microcosmos contaminados, quando observados os teores de fósforo total

e nitrogênio orgânico total, a dinâmica é a mesma até, aproximadamente o trigésimo dia de incubação, quando os valores tornam-se discrepantes. Este comportamento é acompanhado pela inversão do potencial redox mesmo com baixos teores de oxigênio dissolvido, o que indica a liberação de compostos oxidantes para a coluna de água, como nitrato.



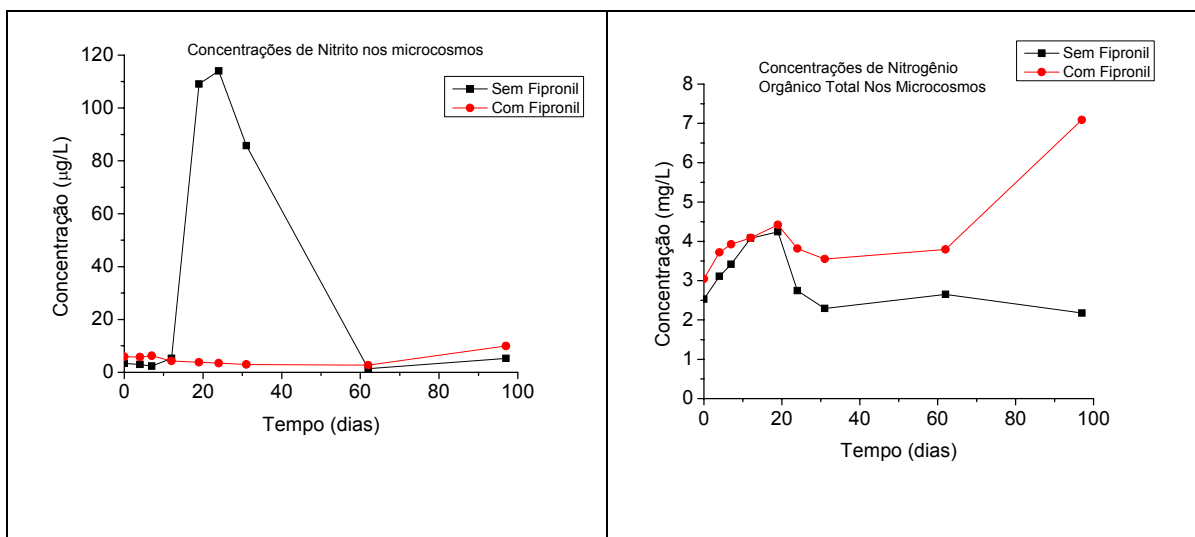


Figura 25 – Concentrações de nutrientes nos microcosmos ao longo do tempo.

Neste ponto, pode ser observado não somente um incremento no número de microrganismos capazes de utilizar o fipronil comercial como única fonte de carbono, bem como uma redução em sua diversidade. Postula-se que houve uma seleção dos microrganismos mais aptos à degradação do fipronil em função do tempo. Como resultado do metabolismo destes microrganismos, houve um aumento significativo do potencial de oxi-redução em função da liberação de compostos oxidantes na coluna de água, além de um aumento na concentração de amônia dissolvida, um possível produto das quebras das frações nitrogenadas da molécula de fipronil. Estes resultados permitem postular que a degradação do composto fipronil é um processo tardio na Lagoa do Óleo e é acelerado de acordo com o tempo de exposição ao composto e à falta de outras fontes de carbono. A molécula de fipronil contém elementos como cloro e flúor que usualmente, por efeitos estéricos, impedem a exposição das ligações químicas aos sítios ativos das enzimas (Alexander, 1994).

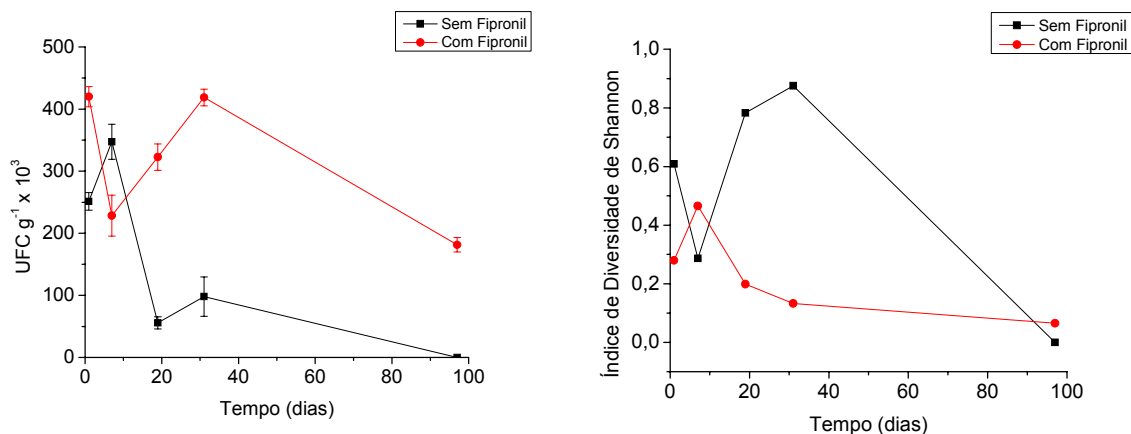


Figura 26 – Número e diversidade de colônias de microrganismos capazes de utilizar o fipronil como fonte de carbono.

As análises de fipronil conduzidas ao longo do tempo na coluna d'água e no sedimento dos microcosmos permitiram a aplicação de um modelo de balanço de massas, que representa o comportamento do composto nos microcosmos durante o período de incubação estudado. As constantes de formação e degradação são fundamentais para a predição do destino de compostos no ambiente. Dado o alto custo das análises, os modelos matemáticos são um meio rápido e conveniente para avaliação preliminar do destino destas substâncias (Sabljia e Reijnenburg, 2001).

Para o presente modelo foram adotadas algumas premissas baseadas na observação prévia dos resultados, que estão representadas na Figura 27:

- 1 – O fipronil comercial é um substrato heterogêneo, composto por uma fração solúvel em água e uma pouco solúvel.
- 2 – o fipronil, quando em contato com água pode sofrer degradação química (hidrólise) ou biológica;
- 3 – nos microcosmos não houve fotodegradação, pois foram dispostos no escuro simulando a região do sedimento durante o período chuvoso; e,
- 4 – no sedimento, a única forma de degradação foi biológica, por microrganismos;

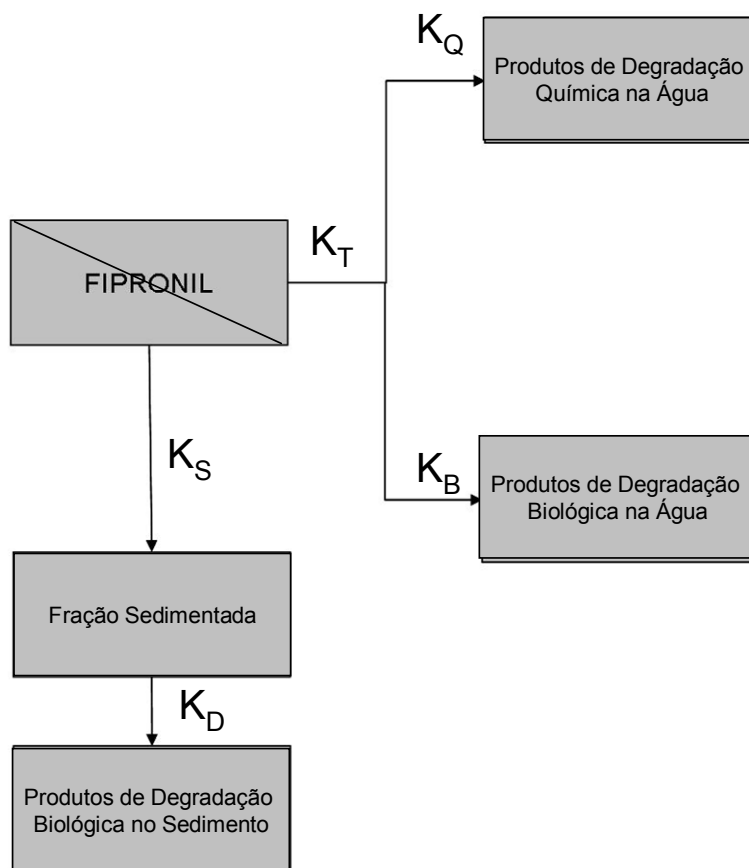


Figura 27 - Modelo que representa o destino do fipronil nos microcosmos elaborados no presente estudo.

Os resultados das concentrações de fipronil na água e no sedimento dos microcosmos estéreis permitiram determinar as taxas de sedimentação/adsorção do composto ao sedimento, sem interferências biológicas (K_S), a partir do ajustamento da curva cinética da concentração de fipronil no sedimento (Figura 28 B). A Curva que representa a perda de massa na coluna d'água nos mesmos microcosmos estéreis representa um somatório da sedimentação/adsorção (K_S), com as transformações químicas (K_Q), aqui denominado de K_T . A partir dos microcosmos não estéreis (Figura 28 A), foi possível avaliar o decaimento das massas de fipronil na coluna de água, representando a sedimentação (K_S), transformações químicas (K_Q) e transformações biológicas (K_B). Estas últimas foram representadas pela diferença entre as constantes que representam o decaimento de fipronil em água nos microcosmos estéreis e não estéreis. No sedimento dos microcosmos não estéreis, observou-se a

incorporação do fipronil por sedimentação (K_S), e o decaimento a partir da concentração máxima no sedimento (K_D), conforme ilustrado nos gráficos que representam o comportamento cinético do fipronil nos compartimentos analisados.

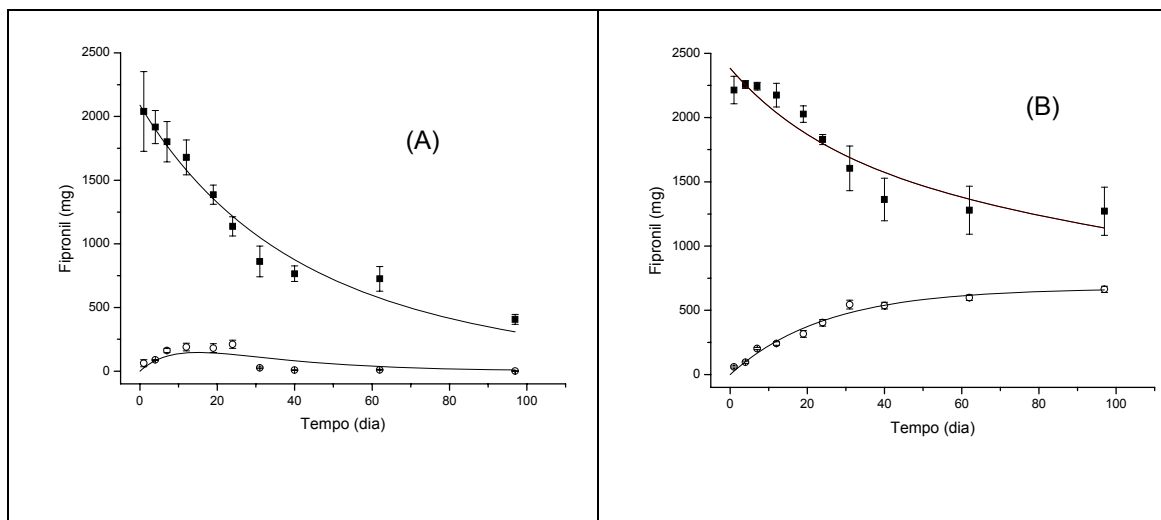


Figura 28 - Cinética de degradação do fipronil em microcosmos com água e sedimento da Lagoa do Óleo. (A) Representa a cinética nos microcosmos não estéreis e (B) nos microcosmos estéreis. A função superior representa o compartimento água e a inferior, o sedimento.

Os ajustamentos das expressões matemáticas pertinentes permitiram a determinação das taxas relativas aos processos de decaimento de massa nos compartimentos dos microcosmos, conforme exibido na Figura 29.

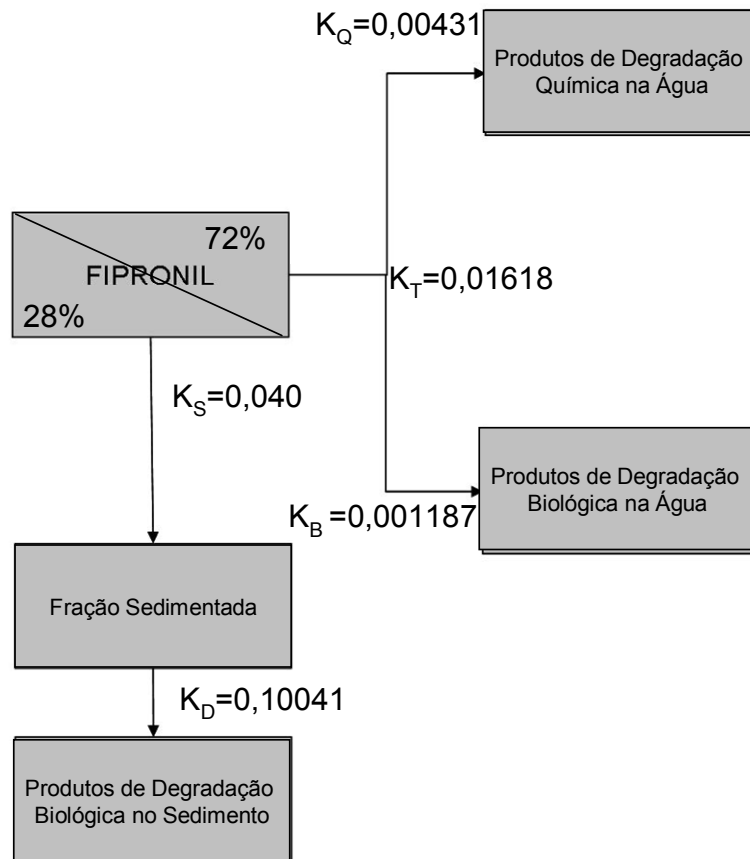


Figura 29 – Modelo cinético representando o destino do fipronil e as taxas de cada processo nos ensaios em microcosmos desenvolvidos no presente estudo.

Os resultados apontam para a rápida sedimentação do fipronil, ao encontrar o ambiente aquático. Apesar de apenas 30% do composto ter como destino final os sedimentos, a maior parte permaneceu na coluna de água, com um tempo de meia vida ($\ln 2/K$) cerca de dez vezes superior ao do composto no sedimento (Tabela 9). Bobe *et al.*, (1998), em uma caracterização da degradação abiótica do composto, afirma que o tempo de meia vida, para a hidrólise do fipronil varia em uma relação direta com o pH da água, isto é, quanto mais ácido o meio, maior é este tempo. Assim, em pH próximo ao dos microcosmos, seus resultados apontam para tempo de meia vida de hidrólise superior a 100 dias. Estas observações ratificam os resultados do modelo aqui utilizado, que demonstra o tempo de meia vida para o fipronil quando degradado por hidrólise de aproximadamente 161 dias. Outro estudo aponta para degradação anaeróbia em água, incluindo degradação química e biológica, com tempo de meia vida de 5,2 dias (*The*

Pesticide Manual, 2000), no entanto, somando-se as taxas de degradação química e biológica em água, chegou-se ao tempo de meia vida de aproximadamente 43 dias, com a maior contribuição provindo da degradação biológica. Compostos recalcitrantes são degradados por dois ou mais microrganismos, sendo que cada espécie possui as enzimas para quebra de ligações específicas (Focht, 1994). Em cada ecossistema há uma população diferente de microrganismos, e o pool de enzimas disponíveis para a degradação do composto é também distinto, podendo o composto ser mais ou menos persistente, dependendo do ambiente, o que justifica a diferença entre os experimentos conduzidos na Lagoa do Óleo e os supracitados. No sedimento, somam-se os processos de adsorção/sedimentação à degradação biológica, como exibido no gráfico constante da Figura 28. Tem-se, portanto, um processo de degradação visível a partir do vigésimo dia, quando se torna evidente o decaimento da concentração de fipronil no sedimento, a uma taxa de 0,10041 e com o tempo de meia vida do composto de 6,9 dias. Dado este curto tempo no sedimento quando comparado ao mesmo parâmetro na coluna de água, pode ser afirmado que o fipronil encontrado na Lagoa do Óleo pode ser proveniente da infiltração das águas do Rio Mogi-Guaçu, uma vez que, caso a principal rota de transporte fosse lixiviação, seria também encontrado na água. Os elevados teores de oxigênio dissolvido encontrados na água da Lagoa do Óleo poderiam acelerar a degradação do fipronil neste compartimento, no entanto, apesar de processos anaeróbios de degradação serem em geral, mais lentos do que os processos aeróbios, compostos como o fipronil, que contém alógenos em suas moléculas, são degradados na maioria das vezes apenas por processos anaeróbios (Alexander, 1994).

Pode ser inferido, portanto, que o fipronil comercial Regent 800 WG é um substrato heterogêneo, sendo que possui uma fração solúvel, que terá um destino na coluna de água (Equação 3), e uma fração menor que sedimenta e terá um destino de biodegradação neste compartimento do sistema (Equação 4). Essa heterogeneidade pode ser explicada por sua baixa a moderada afinidade por carbono orgânico, reflexo de seu coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{OW}$), que o classifica como um

composto de média solubilidade (Gunasekara e Troung, 2007), no entanto, se este fosse o único fator determinante da distribuição do composto, não haveria um decaimento tão evidente das concentrações, pois as concentrações de fipronil na água e no sedimento seriam complementares, mantendo o equilíbrio de partição, o que não é observado. Outro fator que contribui para este resultado é a presença, no fipronil comercial utilizado neste estudo, de 20% de celulose, composto de solubilidade extremamente baixa em água que, por isso, sedimenta nos microcosmos, carregando consigo para este compartimento, uma fração do fipronil.

Equação 3:
$$\frac{d[F]}{dt} = -K_S[F * 0,28] - K_T[F * 0,72]$$

Equação 4:
$$\frac{d[F_S]}{dt} = K_S[F * 0,28] - K_D[F_S]$$

[F] = concentração de fipronil

K_S = coeficiente de sedimentação

K_T = coeficiente de degradação biológica + degradação química na água

[F_S] = fipronil aderido ao sedimento

K_D = coeficiente de degradação biológica de fipronil no sedimento

Tabela 5 – Tempos de meia-vida calculados para os processos determinados no modelo matemático adotado para o decaimento de fipronil nos microcosmos

Processo	Tempo de meia-vida (dias)
Sedimentação	17
Biodegradação no sedimento	7
Degradação química na água	161
Biodegradação na água	58
Degradação total na água	43

As análises toxicológicas na coluna de água, com a utilização do sistema Microtox[®], demonstram uma elevada toxicidade para o organismo-teste durante todo o período de incubação, tendo o seu ápice atingido por volta do 12º dia de exposição, conforme demonstrado na Figura 30.

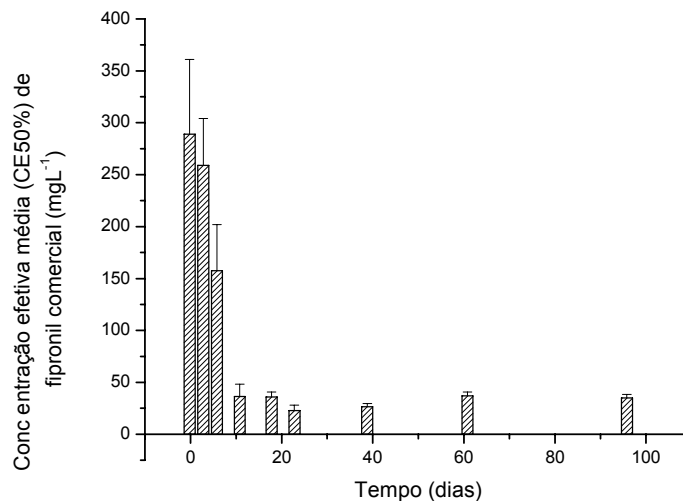


Figura 30 – CE50% de fipronil comercial nos microcosmos ao longo do tempo.

Este fenômeno não pode ser atribuído aos baixos teores de oxigênio dissolvido nos microcosmos uma vez que, de acordo com o método de ensaio proposto pela CETESB (L5.227 dez/2001), somente teores de oxigênio inferiores a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ podem exercer efeito tóxico sobre a bactéria *Vibrio fischeri*, e os valores obtidos não ultrapassaram o limite citado. Portanto, o aumento da toxicidade nos primeiros dias de incubação deve-se à estabilização do sistema em decorrência da completa solubilização da fração hidrofílica. Apesar da degradação do fipronil na coluna de água, a toxicidade dos sistemas não apresentou redução expressiva. A toxicidade do fipronil é resultado do balanço entre as concentrações do composto e de seus derivados, que podem ser mais ou menos tóxicos que o composto original (Gunasekara e Troung, 2007).

8 - CONCLUSÕES

- Há uma grande contribuição alóctone de matéria orgânica para a Lagoa do Óleo durante o período chuvoso, o que qualifica um risco aumentado de exposição do corpo de água aos pesticidas aplicados no entorno.
- Apesar de se encontrar dentro dos limites da Estação Ecológica de Jataí, a Lagoa do Óleo apresenta contaminação por fipronil.
- A degradação do fipronil por hidrólise é um processo lento e não contribuiu de forma expressiva para a sua transformação na coluna de água, onde a biodegradação é de maior relevância.
- No sedimento, após a estabilização do processo de sedimentação a biodegradação é rápida quando comparada ao mesmo processo na coluna de água.
- A presença de microrganismos capazes de degradar o fipronil no sedimento da Lagoa do Óleo não depende da presença deste composto.
- Os compostos gerados durante o processo de biodegradação têm toxicidade semelhante à do fipronil.

PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS

Esta tese apresenta importantes resultados para subsidiar avaliações de risco de contaminação por fipronil em ecossistemas aquáticos. No entanto, estudos complementares, como os sugeridos a seguir poderiam contribuir para análises mais precisas do panorama da utilização deste pesticida nas proximidades de corpos de água em geral, como a Lagoa do Óleo:

- Análise detalhada sobre a distribuição do fipronil na intersecção dos ecossistemas representados pelas plantações de cana-de-açúcar e a Lagoa do Óleo, uma vez que uma das hipóteses levantadas sugere que o composto seja retido pela vegetação natural que envolve o corpo de água estudado, bem como, nos solos circunvizinhos aos corpos de água;
- Análise dos compostos derivados da degradação do fipronil, uma vez que os mesmos podem ser mais tóxicos do que o composto original;
- Análise de fipronil e seus derivados nos tecidos de organismos da Lagoa do Óleo com a finalidade de estudar a bioacumulação e biomagnificação do composto neste ecossistema, mesmo que a presença deste composto tenha sido detetada em apenas uma amostra, há o potencial de que o mesmo seja bioacumulado em organismos residentes neste corpo de água.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, A.L.S. (1992). Composição e fluxo do material particulado transportado pelo Rio Mogi-Guaçú, na planície de inundação da Estação Ecológica de Jataí, Luiz Antonio, SP. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP. 148 p.

ALBUQUERQUE, A. L. S. & MOZETO, A. A. 1997. C:N:P ratios and stable carbon compositions as indicators of organic matter sources in a river floodplain system (Mogi-Guaçu River, São Paulo-Brazil). *Wetlands*.17(1):1-9.

ALEXANDER, M., 1994. Biodegradation and bioremediation. Academic Press. 302p.

ANDERSEN, J.M. (1976) An ignition method for determination of total phosphorous in lake sediments. *Water research* 10: 329-331.

ANVISA (2008). www.anvisa.gov.br Consulta Pública nº 107, de 09/11/2007.

AYIBOTELE, N. (1992) *The world's Water: Assessing the resource*.

International conference on Water and Environment: Development issues for the 21th century. 26-31 de Janeiro, Dublin, Irlanda.

BAIRD, C. (2002). *Química Ambiental – Segunda Edição*. Porto Alegre. Editora Bookman, 622p.

BEELER, A.; SCHLENK, D.K. (2001) Synthesis of fipronil Sulfide, an Active Metabolite, From the Parent Insecticide fipronil. TETRAEDRON LETTERS 42(32) 5371-5372.

BOBE, A., COOPER, J-F., COSTE, C.M (1997). Factors Influencing the adsoption of fipronil on soils. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 45 4861-4865.

BOBE, A., COOPER, J-F., COSTE, C.M., MULLER, M-A. (1998). Behavior of fipronil in soil under Sahelian plain field conditions. Pestic. Sci. 52: 275-281.

BRIDGES, T.S., APITZ, S.E., EVISON, L., KECKLER, K., LOGAN, M., NADEAU, S., WENNING, R. (2006). Risk-Based Decision making to manage contaminated sediments. Integrated Environmental Assessment and Management 2(1) 51-58.

BRONDI, S.H.G. (2000). Determinação de multiresíduos de agrotóxicos em águas de abastecimento do município de Araraquara: Ribeirão das Cruzes, Ribeirão das Anhumas e Córrego do Paiól. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo (USP) - Escola de Engenharia de São Carlos. 132 p.

CAVALHEIRO, F., BALLESTER, M. V. R., KRUSCHE, A. V., MELO, S. A., WAECHTER, J. L., DA SILVA, C. J., D'ARIENZO, M. C., SUZULI, M., BOZELLI, R., JESUS, T. P., SANTOS, J. E. (1990) Propostas preliminares referentes ao plano de zoneamento e manejo da Estação Ecológica de Jataí, Luiz Antônio, SP. Acta Limnológica Brasileira, Vol. 3: 951-968,

CETESB (2001) Teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* Método de ensaio L5.227).

CHATON, P.F.; RAVANEL, P.; TISSUT, M.; MEYRAN, J.C. (2002). Toxicity and bioaccumulation of fipronil in the nontarget Arthropodan fauna associated with subalpine mosquito breeding sites. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52 08-12.

CULP J.M.; PODEMSKI C.L.; CASH K.J; LOWELL R.B. (2000). A research strategy for using stream microcosms in ecotoxicology: Integrating experiments at different levels of biological organization with field data. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 7(2) 167-176

CUNHA-SANTINO, M.B., BIANCHINI JR, I. (2006). Formação e Mineralização de Lixiviados de Duas Macrófitas Aquáticas da Lagoa do Óleo (Estação Ecológica de Jataí, Luiz Antonio, SP, Brasil). In: Estação Ecológica de Jataí Vol 4 ED. José Eduardo Santos e José Salatiel Rodrigues Pires. Editora Rima. Pp. 417

DI-FERNANDO, M.; DI VETTORI, S.; BUENO, M.J.M, ALBA, A.R.F. (2007) Toxicity evaluation with *Vibrio fischerii* test of organic chemicals used in aquaculture. *Chemosphere* 68 (4): 724-730

ESTEVES, F.A. (1988). Fundamentos de Limnologia. Editora Interciência. Rio de Janeiro-RJ, 602 p.

- FERREIRA-PERUQUETTI, P.S.; FONSECA-GUESSNER, A.A. (2003) Comunidade de odonata (Insecta) em áreas naturais de Cerrado e monocultura no nordeste do Estado de São Paulo, Brasil: relação entre o uso do solo e a riqueza faunística. *Revista Brasileira de Zoologia* 20(2): 219-224
- FERREIRA, A. G. (1998) Caracterização de Lagoas Marginais do Rio Mogi-Guaçu na Estação Ecológica de Jataí: composição quantitativa da ictiofauna. São Carlos, SP, 211p. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos. 235 p.
- FOCHT, D. D. (1994) Microbiological procedures for biodegradation research. In: Weaver, J.S. and Bottomley, P.S. *Methods of Soil Analysis – SSSA Book Series no. 5. Wisconsin – USA.* pp. 407-424
- GUERESCHI, R.M., FONSECA-GUESSNER, A.A. (2000) Análise de variáveis físicas e químicas da água e do sedimento de três córregos da Estação Ecológica de Jataí, Luiz Antonio, SP, Brasil. In: Estação Ecológica de Jataí Vol 2 ED. José Eduardo Santos e José Salatiel Rodrigues Pires. Editora Rima. pp. 520
- GRAM, H.C. (1884). The differential staining of *Schizomycetes* in tissue sections and in dried preparations. *Fortschritte der Medicin.* (2) 185-189
- HAINZL, D.; CASIDA, J.E. (1996) fipronil Insecticide: Novel Photochemical Desulfinylation with retention of Neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences: Agricultural Sciences.* 93 12764-12767.

- JIMÉNEZ, J.J.; BERNAL, J.L.; del NOZAL, M.J.; MARTÍN, M.T.; MAYO, R. (2007) Comparative study of sample preparation procedures to determine fipronil in pollen by gas chromatography with mass spectrometric and electron-capture detection. *American Journal of Chromatography* 1146 (1): 08-16
- KOROLEFF, F. Determination of nutrients. *Methods of seawater analysis*. In: Grasshoff, K. (Ed.). New York: Verlag Chemie Weinheim, pp. 125-31, 1976.
- KRUSCHE, A.V. (1995). Aspectos do ciclo biogeoquímico do enxofre ao longo do Rio Solimões – Amazonas e em um lago de várzea – lago do Calado, Manacapuru, AM. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP. 93p.
- MACKERETH, F. J. H.; HERON, J.; TALLING, J. F.(1978). *Water chemistry: some revised methods for limnologists*. Freshwater Biological Association, Sci. Po. nº36, 121p.
- MASUTI, C.S.M; MERMUT, A.R. (2007) sorption of fipronil and its sulfide derivative by soils and goethite. *Geoderma* 140 (1-2) 01-07.
- MASUTI, C.S.M; MERMUT, A.R. (2007) Degradation of fipronil under laboratory conditions in a tropical soil from Sirinhaém Pernambuco, Brazil. *Journal of Environmental Science and Health Part B*. 42, 33-43
- MOZETO, A.A., KRUSCHE, A.V., MARTINELLI, L.A., MELO, S.A., PINTO, M.T.C., GAZETTA, M.R.B. (1989) *Water biogeochemistry in Mogi-*

Guaçu River floodplain oxbow lakes (Jataí Ecological Station, São Paulo, Brazil). In: Phosphorous Cycles in Terrestrial and Aquatic Ecosystems – Regional Workshop 3: South and Central America. ED. Tiessen, H., López-Hernández, D., Salcedo, I.H. – Maracay, Venezuela. pp. 257

MOZETO, A.A.; D'ELIA SAMPAIO, C.T. (2006) Gradientes espaço-temporais nas propriedades biogeoquímicas das águas superficiais e subterrâneas da área alagável da Estação Ecológica de Jataí (Luiz Antônio – SP). In: Estação Ecológica de Jataí. Estudos integrados em Ecossistemas. Ed: José Eduardo Santos, José Salatiel Pires, Luiz Eduardo Moschini. EDUFSCar São Carlos-SP.

MOZETO, A. A. & ALBUQUERQUE, A. L. S. 1997. Biogeochemical properties at the Jataí Ecological Station wetlands (Moji-Guaçu River, São Paulo, SP). *Ciência e Cultura*. 49(1/2) Jan-Abril/97: 25-33.

PERET, A.C. (2009). Comparação sazonal da diversidade de peixes em dois momentos distintos em duas lagoas de uma planície de inundação sujeita à ação antrópica. – Enviado para publicação. *Revista Brasileira de Zoologia*.

PIMENTEL & LEVITAM (1986). Pesticide: amounts applied and amounts reaching plants. *BioScience*, 36:86-91.

QURESHI A.A.; FLOOD K.W.; THOMPSON S.R.; JANHURST S.M.; INNISS C.S. ; ROKOSH D.A. (1982) Comparison of a luminescent bacterial test with other bioassays for determining toxicity of pure

compounds and complex effluents. In: Pearson, J.G., Foster, R.B. and Bishop, W.E. (Eds.) Aquatic toxicology and hazard assessment. Proceedings of the Fifth Annual Symposium on Aquatic Toxicology. pp. 179-195.

RAND, G.M. (1995) Fundamentals of Aquatic Toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. New York-NY. Taylor e Francis, 1124 p.

RHÔNE-POULENC AG COMPANY. 1998. Application for Registration. Volume No. 52062-071. Vol 1. Department of pesticide regulation, California Environmental Protection Agency, Sacramento, CA.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F ; MELO, L. F.C. . Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova 27 (5) 771-780.

Rodrigues, P. F. (2006). Teste de toxicidade aguda com a bactéria luminescente – *Vibrio Fischeri*. IN: Mozeto, A.A.; Umbuzerio, G. e Jardim, W.F.-Eds).. Métodos de Coleta, Análises Físico-Químicas e Ensaio Biológicos e Ecotoxicológicos de Sedimentos de Água Doce. Cubo Multimidia Editora. São Carlos, SP-Brasil). pp 161 – 166

SABLJIC, A.; REIJNENBURG, W. (2001). Recommendations on modeling lifetime and degradability of organic compounds in air, soil and water systems. Pure Applied Chemistry 73: 1331-1348.

SIDDIQUE, T., BENEDICT, C. O., ARSHAD, M., FRANKENBERGER Jr., W.T. (2003) Enrichment and Isolation of endosulfan-degrading microorganisms. Journal of Environmental Quality 32: 47-54.

SOARES, A., MOZETO, A.A. (2006). Water quality in the Tietê River Reservoirs (Billings, Barra Bonita, Bariri and Promissão, SP-Brazil) and nutrient fluxes across the sediment-water interface (Barra Bonita). *Acta Limnologica Brasiliensia* 18(3):247-266.

STRICKLAND, J.; PARSONS, T. (1960). *A Practical Handbook of Sea Water Analysis*. Bulletin Fisheries Research Board of Canada. 125:1-185.

SUTHERLAND, T.D., HORN I., LACEY, M.J., HARCOURT, R.L., RUSSELL, R.J., OAKESHOTT, J.G. (2000) Enrichment of an endosulfan-degrading mixed bacterial culture. *Applied and Environmental Microbiology* 66(7):2822-2828.

THE PESTICIDE MANUAL. (2000) 12. ed. Bath: British Crop Protection Council, 1250 p..

TINGLE, C. C., ROTHER, J. A., DEWHUST, C. F., LAUER, S., KING, W. J. 2003. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 176: 1-66.

UMBUZEIRO, G.A, RODRIGUES, P.F. (2004) O teste de toxicidade com bactérias luminescentes e o Controle da Poluição. *Ambiente Técnico, São Paulo*, v. 4, p. 2 - 5

USEPA - United States Environmental Protection Agency (1985). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving

waters to freshwater organisms. USEPA/600/4 - 85/014. Cincinnati, Ohio, p. 162.

USEPA - United States Environmental Protection Agency (2000). Nutrient criteria technical guidance manual lakes and reservoirs – First Edition. Cincinnati, Ohio, p. 232.

USEPA - United States Environmental Protection Agency (2002) Definition and procedure for the determination of the method detection limit – Appendix B, part 136. US Code of Federal Regulation. Cincinnati, Ohio. 24p.

VÍLCHEZ, J.L.; PRIETO, A.; ARAUJO, L.; NAVALÓN, A. (2001) Determination of fipronil by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 919 215-221

VOGEL, A. I. (1992). *Análise inorgânica quantitativa*. Rio de Janeiro: Guanabara Dois S.A., 712 p.

WALDHEIM, P.V.; CARVALHO, V.S.B.; CORREA, E.; FRANÇA, J.R.A. (2006). Zoneamento climático da cana-de-açúcar, da laranja e do algodão herbáceo para a região Nordeste do Brasil. *Anuário do Instituto de Geociências da UFRJ*. 29(2):30-43

WEI CUI. CALIFORNIA DEPARTMENT OF FOOD AGRICULTURE - Center for Analytical Chemistry (2008). Determination of fipronil and metabolites in surface water using gas chromatography/mass spectrometry. Section Method. 12p.

WIRTH, E.F.; PENNINGTON, P.L., LAWTON, J.C., DELORENZO, M.E.,
BEARDEN, D.; SHADDRIX, B., SIVERTSEN, S., FULTON, M.H. (2004)
The Effects of contemporary-use insecticide (fipronil) in an estuarine
mesocosm. *Environmental Pollution* 131: 365-371.

ZIBILSKE, L.M., 1994. Carbon mineralization. In: Weaver, J.S., Angle, J.S.,
Bottomley, P.S. (Eds.). *Methods of Soil Analysis – SSSA Book Series vol. 5*,
pp. 835-863.

ZHOU-PEI, Lu Yitong, LIU BAOFENG, JAY GAN. (2004) Dynamics of fipronil
in vegetable-field ecosystem. *Chemosphere* 57: 1691-1696.

ZHU, G., WU, H., GUO, J., KIMARO, F. M. E. 2004. Microbial degradation of
fipronil in clay loam soils. *Water Air Soil Pollution*. 153: 35-44.

ANEXOS

Anexo 1 - Médias dos Valores de concentrações (mg L⁻¹) nutrientes para os 5 pontos de coleta na estação seca (set) e na estação chuvosa (dez) nos 4 compartimentos estudados (superfície, meio, fundo e água intersticial).

	Amônia	Nitrato	Nitrito	N Org Total	Fósforo Total	Ortofosfato (µg L ⁻¹)	Cloreto	Fluoreto	Sulfato	Sulfeto
SET P1S	0,0000	0,0100	0,0030	0,5730	0,5269	0,0143	0,0000	0,2000	0,0000	0,0010
DEZ P1S	0,0600	0,0870	0,0230	1,0080	6,6000	0,0285	0,5000	0,1950	4,0235	0,0030
SET P1M	0,0000	0,0700	0,0030	0,7450	1,0665	0,1650	0,0000	0,0200	0,0000	0,0010
DEZ P1M	0,0200	0,1070	0,0030	1,1760	6,6800	2,5876	0,0000	0,2500	4,0235	0,0055
SET P1F	0,0000	0,0100	0,0100	0,6080	1,2137	0,7390	0,0000	0,3400	0,0000	0,0000
DEZ P1F	0,0750	0,1330	0,0070	1,4000	6,8800	0,9650	0,2000	0,3900	4,0235	0,0250
SET P1I	2,2000	0,2250	0,0320	8,1970	16,0780	4,0258	0,0500	0,2300	0,0000	0,0020
DEZ P1I	5,7500	0,4840	0,0260	18,6320	21,4400	5,0460	1,1000	0,0000	4,4090	0,0120
SET P2S	0,0000	0,0500	0,0140	0,6100	0,4778	0,0145	0,0000	0,1400	0,0000	0,0030
DEZ P2S	0,0000	0,1760	0,0040	0,7560	6,6000	2,2056	0,2000	0,3200	4,0235	0,0010
SET P2M	0,0000	0,0000	0,0000	0,6300	2,2930	0,0177	0,0000	0,1700	0,0000	0,0010
DEZ P2M	0,0250	0,1120	0,0080	1,3440	6,7400	3,2438	0,0000	0,3500	4,0235	0,0120
SET P2F	0,0100	0,0600	0,0000	0,7980	1,2873	0,2670	0,0000	0,0900	0,0000	0,0010
DEZ P2F	0,0000	0,3690	0,0010	1,6140	7,0200	2,4348	0,5000	0,2750	4,0235	0,0025
SET P2I	1,9000	0,3500	0,0130	8,1710	15,8817	8,3620	1,2000	0,0000	1,7800	0,0110
DEZ P2I	6,5000	1,3800	0,0950	16,4120	19,8400	1,1580	6,4000	0,0000	18,1212	0,0380
SET P3S	0,0000	0,0200	0,0000	0,5240	0,5024	0,0167	0,0000	0,0500	0,0000	0,0010
DEZ P3S	0,0150	0,0000	0,0000	0,7840	6,5000	4,2820	0,0500	0,0000	4,0235	0,0010
SET P3M	0,0000	0,0200	0,0000	0,6360	0,7477	0,0120	0,0000	0,0000	0,0000	0,0020
DEZ P3M	0,0100	0,0000	0,0000	1,1760	6,6400	0,0172	0,2000	0,1550	4,4365	0,0010
SET P3F	0,0000	0,0600	0,0000	0,7040	0,9684	0,0542	0,0000	0,3200	0,0000	0,0020
DEZ P3F	0,0900	0,0410	0,0090	2,0160	6,5400	6,3584	0,2000	0,2000	4,3539	0,0020
SET P3I	5,1000	0,6000	0,0100	11,9400	13,2327	5,6900	2,7500	0,0500	2,5600	0,0020
DEZ P3I	7,5000	0,3090	0,0210	13,8840	8,2200	5,0460	0,9000	0,0000	4,5742	0,0040
SET P4S	0,0000	0,0000	0,0000	0,3360	0,4288	0,0187	0,0000	0,0900	0,0000	0,0000
DEZ P4S	0,0400	0,0050	0,0050	1,0360	6,5200	0,0278	0,2000	0,3000	4,0235	0,0030
SET P4M	0,0000	0,0200	0,0000	0,4680	0,4288	0,0429	0,0000	0,1700	0,0000	0,0040
DEZ P4M	0,0000	0,0540	0,0060	1,0920	6,4000	0,0739	0,2000	0,0700	4,0235	0,0020
SET P4F	0,0000	0,0700	0,0030	0,8290	1,1401	0,2897	0,0000	0,1300	0,0000	0,0000
DEZ P4F	0,0300	0,0050	0,0050	2,1840	6,2800	0,1725	0,1000	0,3700	4,0235	0,0020

Continuação da Tabela do Anexo 1

	Amônia	Nitrato	Nitrito	N Org Total	Fósforo Total	Ortofosfato ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Cloreto	Fluoreto	Sulfato	Sulfeto
SET P4I	4,1000	0,3450	0,0020	8,8710	6,4137	2,0470	1,1000	0,0000	2,7000	0,0030
DEZ P4I	5,5000	0,1220	0,0080	8,9480	10,3800	4,2820	0,5000	0,4700	5,7306	0,0020
SET P5S	0,0000	0,0200	0,0000	0,4680	0,3797	0,0022	0,0000	0,1300	0,0000	0,0000
DEZ P5S	0,0200	0,0000	0,0000	1,1200	6,5400	0,0181	0,0000	0,0500	4,0235	0,0020
SET P5M	0,0000	0,0600	0,0050	0,6810	0,6495	0,0159	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
DEZ P5M	0,0000	0,0000	0,0000	1,4840	7,0000	0,0178	0,3000	0,0250	4,0235	0,0010
SET P5F	0,0000	0,0600	0,0050	0,8630	1,6307	0,0020	0,0000	0,2400	0,0000	0,0020
DEZ P5F	0,1000	0,0010	0,0090	1,8480	6,8000	0,0298	0,1000	0,4800	4,0235	0,0020
SET P5I	4,1000	1,1800	0,0000	8,5140	6,6590	2,3926	16,5000	0,1700	0,0000	0,0010
DEZ P5I	6,5000	0,2970	0,0230	15,5560	15,1600	8,6504	1,9000	0,1000	10,1912	0,0090

Anexo 2 - Valores (mg g^{-1}) das concentrações de elementos no sedimento dos cinco pontos de coleta durante os períodos de seca e chuva.

Estação Seca	N	C	S	P
P1				
P2	7,079	71,175	3,780	0,450
P3	3,845	30,180	0,000	0,240
P4	6,790	79,900	4,420	0,507
P5	6,400	86,570	4,800	0,522
Estação Chuvosa				
P1	6,780	96,112	0,955	3,023
P2	5,710	70,600	0,462	2,984
P3	6,610	74,930	0,848	2,737
P4	6,250	80,930	0,893	2,913
P5	1,080	4,750	0,000	0,914

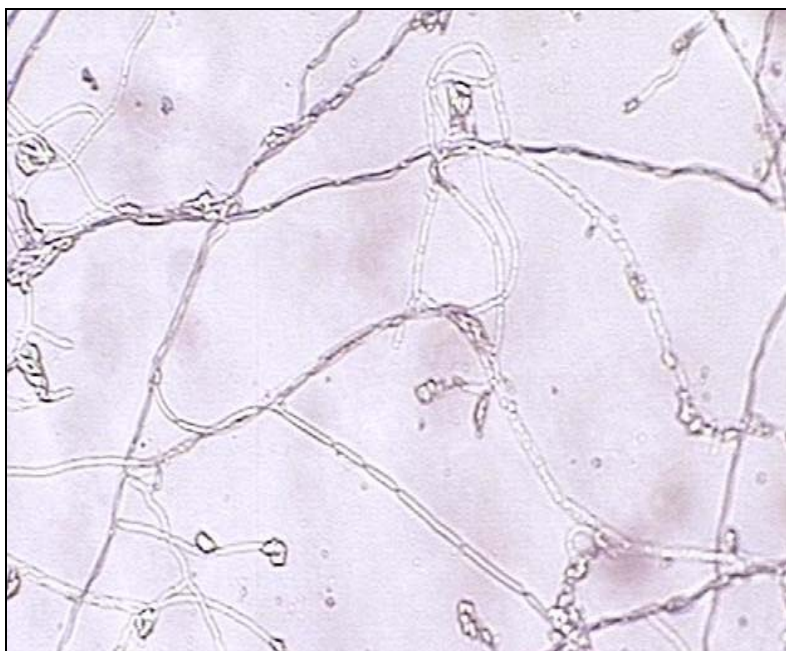
Anexo 3 - Características físico-químicas dos microcosmos com e sem adição de fipronil ao longo do tempo.

Dias	pH		ORP		OD		Turbidez	
	Sem fipronil	Com fipronil	Sem fipronil	Com fipronil	Sem fipronil	Com fipronil	Sem fipronil	Com fipronil
0	5,77	5,845	181,5	188,35	6,1	6,465	23	143,5
4	6,12	5,495	122,7	151,8	5,33	1,59	10,5	43,75
7	6,11	5,805	164,6	55,05	6,54	0,53	4,8	39,7
12	6,2	5,64	161,09	12,35	6,53	1,25	3,6	64,95
19	6,6	5,7	154,6	-112,6	6,54	1,67	0	72,1
24	4,86	5,53	237,6	-56,9	6,18	0,55	0,6	79,45
31	4,98	4,835	224,4	-45,05	7,45	0,835	3,2	27,25
40	5,92	5,6	219	-37,65	7,12	0,775	3,3	36,25
62	6,5	6,095	215	143,65	6,75	0,55	3,5	25,3
97	5,28	3,285	190	430,4	2,3	1,105	5	3,75

Anexo 4 - Nutrientes ($\mu\text{g L}$) nas águas dos microcosmos com e sem adição de fipronil (N Total em mg L).

Dias	Nitrito s/ fipronil	Nitrito c/ fipronil	Nitrato s/ fipronil	Nitrato c/ fipronils	Amonia s/ fipronil	Amonia c/ fipronils	P total s/ fipronil	P total c/ fipronil	Ntotal s/ fipronil	N total c/ fipronil	Orto-P. s/ fipronil	Orto-P c/ fipronil
0	3,3926	5,9403	48,63309	35,88138	239,47895	125,26895	80,0959	44,4234	2,53252	3,04573	21,5179	24,70965
4	2,9738	5,7658	8,68798	9,30252	626,93638	95,43159	86,8549	51,9334	3,11106	3,71957	27,1504	26,58715
7	2,3456	6,2893	2,26992	5,00075	686,04005	40,46802	63,1984	52,3089	3,41596	3,92153	26,7749	30,1544
12	5,2772	4,3349	6,69073	5,38483	932,44813	42,03841	62,4474	75,02665	4,07955	4,08796	32,4074	29,21565
19	109,0698	3,8114	317,3407	7,30527	938,15863	33,04438	60,5699	87,2304	4,24184	4,41896	42,9214	31,46865
24	114,0256	3,4973	566,53667	19,67289	208,35673	31,75951	43,2969	55,87615	2,74564	3,81824	24,8974	27,71365
31	85,7566	3,0087	542,87688	46,71265	129,2663	79,72771	33,1584	36,5379	2,29273	3,55327	27,1504	29,21565
62	1,3684	2,7295	414,59166	47,01992	35,04305	36,47068	35,0359	86,66715	2,65296	3,79253	25,2729	33,9094
97	5,2772	9,9887	137,58775	60,69343	32,1878	1220	67,3289	116,1439	2,17981	7,08803	54,5619	53,24765

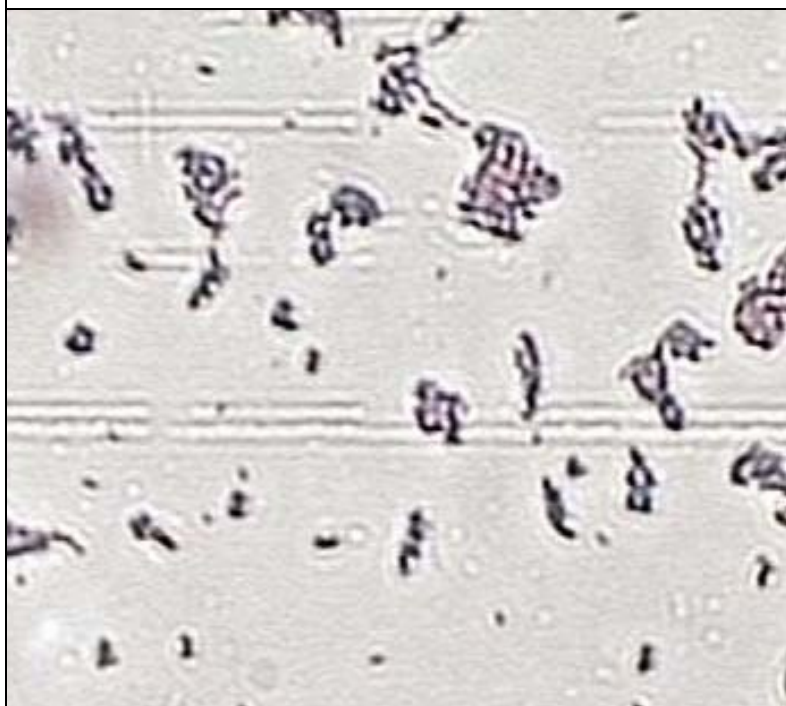
Anexo 5 - Fotografias de imagens de microscópio óptico e descrição das colônias de microrganismos isolados capazes de utilizar fipronil comercial como única fonte de carbono.



SOLO A (40X)

Fungo filamentososo, com hifas segmentadas.

Colônia com aspecto cotonoso.



SOLO B (40X)

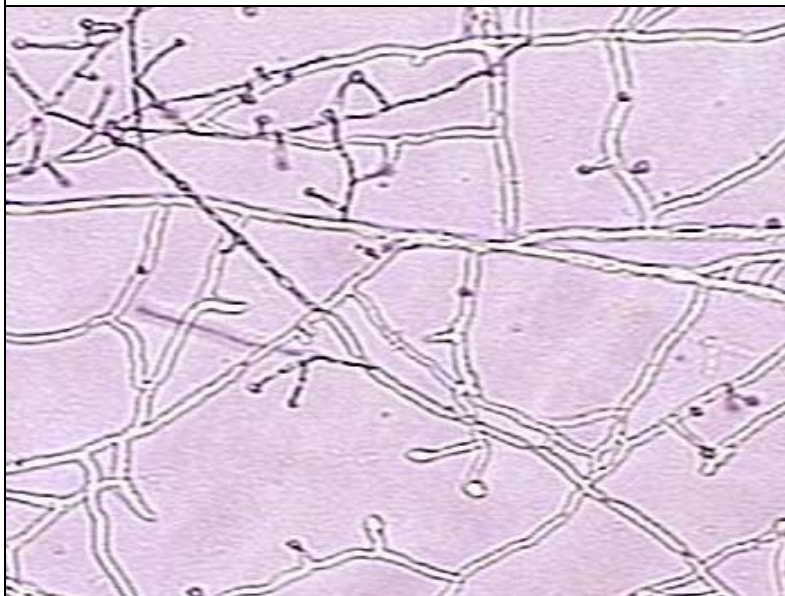
Bactérias bacilares gram positivas.

Colônias gelatinosas de coloração branca.



SOLO C (40X)

Bactérias gram positivas com formato do tipo diplococos. Colônias gelatinosas de coloração alaranjada.



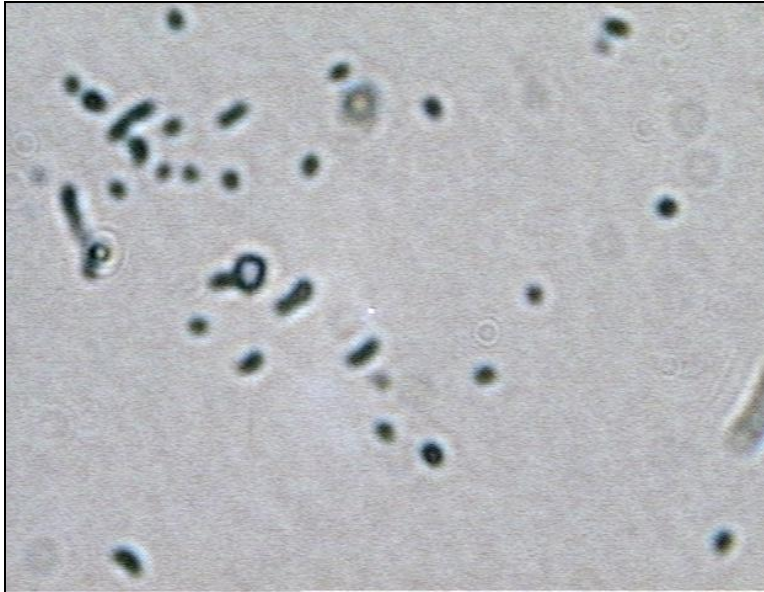
P1 A (40X)

Fungo filamentosos com hifas segmentadas. Colônia com aspecto cotonoso e translúcida.



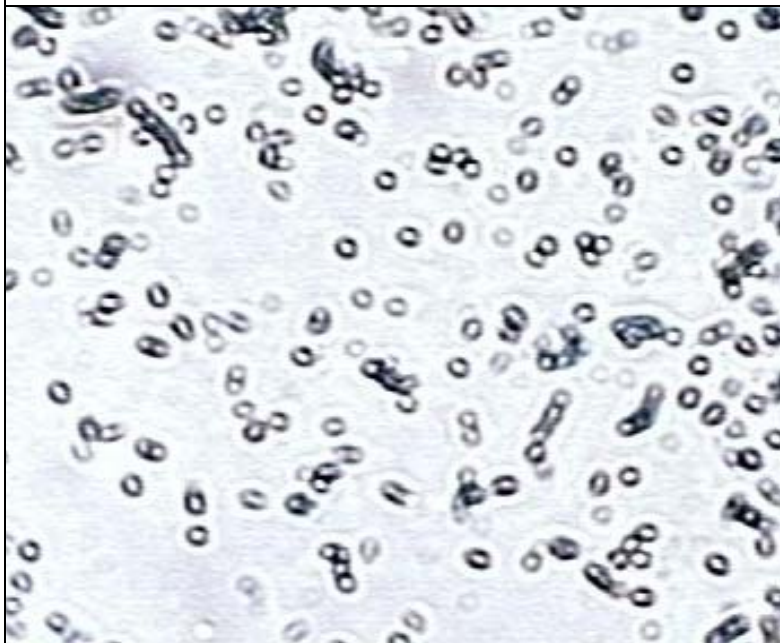
P1 B (40X)

Bactérias gram positivas com formato bacilar. Colônias gelatinosas de coloração rósea.



P2 A (400X)

Bactérias gram
positivas com
formato de
diplococo. Colônias
gelatinosas de
coloração vermelha
intensa.



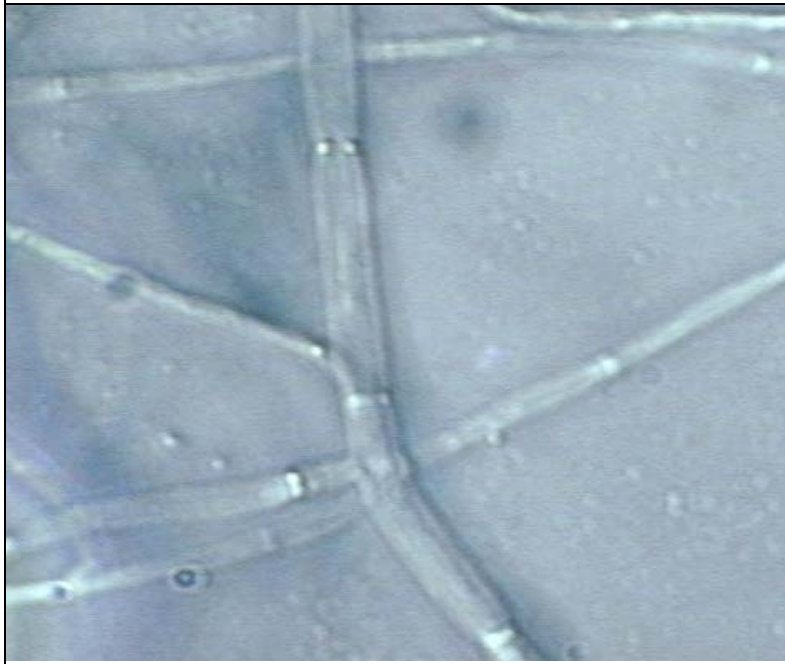
P3 A (400X)

Bactérias gram
positivas com
formato de
diplococo. Colônia
com aspecto
gelatinoso e
coloração branca.



P4 A (40X)

Bactérias gram
positivas com
formato bacilar.
Colônia com
aspecto gelatinoso e
coloração rósea.



P5 A (400X)

Fungo filamentosos
com hifas
segmentadas de
coloração
esverdeada.



P5 B (400X)

Bactérias gram positivas do tipo diplococo. Colônia com aspecto gelatinoso de coloração branca translúcida.



PERIFÍTON A (40X)

Bactérias gram positivas do tipo diplococo. Colônia com aspecto gelatinoso de coloração branca.

Anexo 6 :

Concentrações de fipronil ao longo do tempo nos microcosmos não estéreis ($\mu\text{g L}^{-1}$).

Dias	Água	DP	Sedimento	DP
1	679,91	104,13	95,71	43,22
4	639,10	43,18	135,23	5,56
7	600,67	52,84	249,36	26,23
12	559,84	45,73	290,63	47,75
19	462,03	25,19	278,73	52,42
24	378,96	25,28	325,07	49,06
31	287,13	40,25	38,82	8,72
40	255,07	20,04	12,03	2,88
62	241,53	32,55	14,81	5,70
97	135,61	13,04	1,28	0,23

Concentrações de fipronil ao longo do tempo nos microcosmos estéreis ($\mu\text{g L}^{-1}$).

Dias	água	DP	Sedimento	DP
1	737,99	35,80	90,56	11,82
4	752,39	10,34	147,55	12,94
7	747,89	10,00	311,88	13,09
12	724,72	30,51	371,31	21,99
19	675,54	21,57	487,10	40,40
24	609,71	12,93	620,33	39,88
31	534,87	58,04	837,85	52,36
40	454,24	55,13	825,50	40,28
62	426,22	62,35	920,52	33,90
97	423,85	62,56	1020,31	37,16

Anexo 7 - Médias dos números de colônias de microrganismos provenientes dos microcosmos com e sem fipronil, capazes de utilizar este composto como única fonte de carbono.

Linhagens/Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 Sem fipronil	28,33	209,67	5,67	0,67	0,33	0,33	0,00	6,33	0,00	0,00	0,00
1 Com fipronil	8,83	394,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	16,17	0,33	0,00	0,00
7 Sem fipronil	27,00	319,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67	0,00	0,00
7 Com fipronil	10,00	203,75	7,50	0,50	0,00	0,00	0,00	6,50	0,00	0,00	0,00
19 Sem fipronil	7,67	41,00	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00
19 Com fipronil	11,83	309,00	1,00	0,33	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,17	0,00
31 Sem fipronil	53,33	38,33	6,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
31 Com fipronil	7,33	408,67	1,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,50
97 Sem fipronil	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
97 Com fipronil	1,67	179,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00

Descrições das Linhagens:

1 – Colônias bacterianas brancas leitosas

2 – Colônias bacterianas brancas semi-transparentes

3 – Colônias bacterianas amarelas leitosas

4 – colônias bacterianas de coloração avermelhada intensa

5 – Colônia de fungo com região central cotonosa e hifas semi-translúcidas inseridas no Agar

6 – Colônia de fungo ramificado, deixando o ágar transparente

7 – Colônia de Fungo acinzentado cotonoso. Se espalha no Agar de forma irregular.

8 – Colônias bacterianas de coloração amarelo escura

9 – Colônia bacteriana de coloração violeta intensa

10 – Colônia bacteriana leitosa amarelo-gema

11 - Colônia bacteriana amarronzada, com aparência seca

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)