



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA E BIOLOGIA EVOLUTIVA

HENRIQUE CEZAR ALVES

**ESTUDO BIOLÓGICO DE LINHAGENS DO PROTOZOÁRIO CILIADO
PARAMECIUM CAUDATUM EHRENBERG, 1833 E AVALIAÇÃO
EXPERIMENTAL DO EFEITO TÓXICO DO AGROTÓXICO FIPRONIL**

São Carlos

2010

HENRIQUE CEZAR ALVES

**ESTUDO BIOLÓGICO DE LINHAGENS DO PROTOZOÁRIO CILIADO
PARAMECIUM CAUDATUM EHRENBERG, 1833 E AVALIAÇÃO
EXPERIMENTAL DO EFEITO TÓXICO DO AGROTÓXICO FIPRONIL**

Dissertação submetida à
coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para
obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia

Área de Concentração: Ecotoxicologia Aquática
Orientadores: Profa. Dra. Mirna Helena R. Seleglim
Prof. Dr. José Roberto Ferreira

São Carlos

2010

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

A474eb

Alves, Henrique Cezar.

Estudo biológico de linhagens do protozoário ciliado *Paramecium Caudatum* Ehrenberg, 1833 e avaliação experimental do efeito tóxico do agrotóxico Fipronil / Henrique Cezar Alves. -- São Carlos : UFSCar, 2011. 67 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Biotecnologia. 2. Cultivo monoxênico. 3. Toxicidade testes. 4. Curva de crescimento. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

Henrique Cezar Alves

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Aprovado em: 26/11/2010

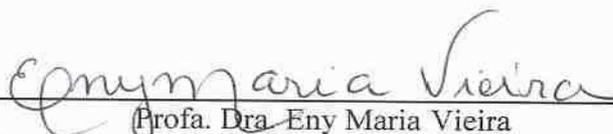
BANCA EXAMINADORA



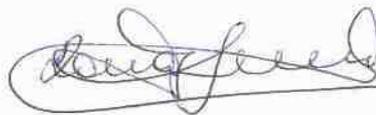
Prof.ª. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim (Orientadora)
DEBE - UFSCar



Prof.ª. Dra. Odete Rocha
DEBE - UFSCar



Prof.ª. Dra. Eny Maria Vieira
Departamento de Química e Física Molecular - USP



Prof. Dr. Donato Seiji Abe
Instituto Internacional de Ecologia

Ele não sabia que era impossível. Foi lá e fez.

(Jean Cocteau)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, à minha irmã, aos meus avós, tios, primos, amigos, que sempre estiveram comigo, mesmo nos momentos mais difíceis, especialmente ao meu querido tio e padrinho Florisvaldo Geminiano Joaquim, um dos grandes responsáveis pela formação do meu caráter e que, mesmo não estando fisicamente entre nós, com certeza, também compartilha a satisfação deste momento.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e coragem para superar todas as dificuldades.

À Profa. Mirna Helena Regali Seleglim e ao Prof. José Roberto Ferreira, pela orientação e confiança.

À minha família, pelo apoio, carinho, incentivo e paciência durante a realização deste projeto.

À Técnica Darci da Consolação Diniz Javaroti, pela paciência no ensinamento das técnicas laboratoriais em microbiologia e pelo carinho.

Ao Técnico Luisinho, pela coleta de amostras.

À Luciana Teresa Dias Cappellini, pelo grande auxílio nas análises cromatográficas.

Ao Marcos Vinícius Ninelli Martins e à Emanuela Cristina de Freitas, pela ajuda nas análises estatísticas.

Às Profas. Odete Rocha, Eny Maria Vieira e ao prof. André Luiz Meleiro Porto por disponibilizarem a infra-estrutura de seus laboratórios.

Aos meus amigos Arthur, Gustavo, Marcos e Rafael Ferri pelo companheirismo.

Ao André M. Peret pelas dicas e sugestões.

Às meninas do Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aquáticos (LEMA) – DEBE/UFSCar: Luciana, Larissa, Erica, Karina, Laine, Mayara, Ana Claudia, Bruna Vacondio, Bruna Bueno e Thaís pela cooperação e convivência durante a execução deste trabalho.

Aos secretários Mauro, Claudia e a todos os profs. do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (PPG – Biotec) que tive a satisfação de conhecer.

À Fapesp pela bolsa concedida.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fórmula estrutural do fipronil (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluormetil)fenil]-4-[(trifluormetil) sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitrila).....	2
Figura 2 – Foto do protozoário ciliado <i>Paramecium caudatum</i> utilizado nos experimentos (fonte: turbinaria.wordpress.com/2009/07/23/protozoa/).....	7
Figura 3 – Imagem aérea da Represa do Córrego Monjolinho (Fonte: www.lapa.ufscar.br/banco_de_fotos/ufscar3.jpg).....	9
Figura 4 – Localização geográfica da Estação Ecológica do Jataí (Fonte: www.lapa.ufscar.br/hidinund.gif)	10
Figura 5 – Tubo de ensaio com meio de cultura para protozoários bacterívoros...	11
Figura 6 – Placa de cultivo de tecidos com 24 cavidades.....	12
Figura 7 – Frascos com as amostras preservadas com os diferentes fixadores testados.....	13
Figura 8 – Tubos de ensaio contendo ágar inclinado, um grão de arroz e 10 mL de uma suspensão da bactéria <i>E. aerogenes</i> na concentração de 10^6 células mL^{-1}	14
Figura 9 – Tubos de ensaio utilizados nos experimentos de otimização de cultivo acondicionados em ambiente escuro no interior de uma câmara de incubação.....	15
Figura 10 - Esferóide prolato (Fonte: http://www.mat.ufrgs.br/~calculoquadrica/elipso.htm).....	15
Figura 11 – Densidade celular média (organismos mL^{-1}) de <i>P. caudatum</i> (linhagem PC1) nos experimentos controle, realizados em várias condições de pH, sendo que no pH3 não houve sobrevivência, contados “a fresco”.....	24
Figura 12 – Comparação da densidade média (organismos mL^{-1}) de <i>P. caudatum</i> (linhagem PC1) nas amostras vivas (controle) e nas fixadas com bouin a 5% após 72 horas de cultivo nos diferentes pH.....	25
Figura 13 – Comparação da densidade média (organismos mL^{-1}) de <i>P. caudatum</i> (linhagem PC1) nas amostras vivas (controle) e nas fixadas com lugol ácido a 1% após 72 horas de cultivo nos diferentes pH.....	25
Figura 14 – Comparação da densidade média (organismos mL^{-1}) de <i>P. caudatum</i> (linhagem PC1) nas amostras vivas (controle) e nas fixadas com Hg Cl_2 a 2,5% após 72 horas de cultivo nos diferentes pH.....	26

Figura 15 – Comparação da densidade média (organismos mL ⁻¹) de <i>P. caudatum</i> (linhagem PC1) nas amostras vivas (controle) e nas fixadas com lugol alcalino a 0,1%/formaldeído a 2%/tiosulfato de sódio a 0,2% após 72 horas de cultivo nos diferentes pH.....	26
Figura 16 – Comparação da densidade média (organismos mL ⁻¹) de <i>P. caudatum</i> (linhagem PC1) nas amostras vivas (controle) e nas fixadas com formaldeído a 2% após 72 horas de cultivo nos diferentes pH.....	27
Figura 17 – Densidade média de indivíduos mL ⁻¹ da linhagem de <i>P. caudatum</i> (PC1) nos pHs 6,7, 8 e 9 após 72h de cultivo a 20° C.....	28
Figura 18 - Densidade média de indivíduos mL ⁻¹ da linhagem de <i>P. caudatum</i> PC1 nos pHs 6,7, 8 e 9 após 72h de cultivo a 25°C.....	28
Figura 19 - Densidade média de indivíduos mL ⁻¹ da linhagem de <i>P. caudatum</i> PC1 nos pHs 6,7, 8 e 9 após 72h de cultivo a 27,5° C.....	29
Figura 20 - Densidade média de indivíduos mL ⁻¹ da linhagem de <i>P. caudatum</i> PC1 nos pHs 6,7, 8 e 9 após 72h de cultivo a 30° C.....	29
Figura 21 – Biovolume celular médio de <i>P. caudatum</i> após 72h de cultivo da linhagem PC1 a 20° C.....	30
Figura 22 – Biovolume celular médio de <i>P. caudatum</i> após 72h de cultivo da linhagem PC1 a 25° C.....	31
Figura 23 – Biovolume celular médio de <i>P. caudatum</i> após 72h de cultivo da linhagem PC1 a 27,5° C.....	31
Figura 24 – Biovolume celular médio de <i>P. caudatum</i> após 72h de cultivo da linhagem PC1 a 30° C.....	32
Figura 25 – Densidade média de organismos mL ⁻¹ da linhagem PC2 nos pHs 6,7, 8 e 9 após 72h de cultivo a 20° C.....	34
Figura 26 – Densidade média de organismos mL ⁻¹ da linhagem PC2 nos pHs 6,7, 8 e 9 após 72h de cultivo a 25° C.....	34
Figura 27 – Densidade média de organismos mL ⁻¹ da linhagem PC2 nos pHs 6,7, 8 e 9 após 72h de cultivo a 27,5° C.....	35
Figura 28 – Densidade média de organismos mL ⁻¹ da linhagem PC2 nos pHs 6,7, 8 e 9 após 72h de cultivo a 30° C.....	35
Figura 29 – Biovolume celular médio após 72h de cultivo da linhagem PC2 a 20°C.....	36

Figura 30 – Biovolume celular médio após 72h de cultivo da linhagem PC2 a 25°C.....	37
Figura 31 – Biovolume celular médio após 72h de cultivo da linhagem PC2 a 27,5° C.....	37
Figura 32 – Biovolume celular médio após 72h de cultivo da linhagem PC2 a 30°C.....	38
Figura 33 – Densidade média de protozoários (<i>P. caudatum</i> – linhagem PC 1 – organismos mL ⁻¹) em diferentes condições de iluminação.....	40
Figura 34 – Densidade média de protozoários (<i>P. caudatum</i> – linhagem PC 2 – organismos mL ⁻¹) em diferentes condições de iluminação.....	41
Figura 35 - Densidade média de protozoários (<i>P. caudatum</i> – linhagem PC1 – em organismos mL ⁻¹) nos cultivos com e sem agitação.....	42
Figura 36 - Densidade média de protozoários (<i>P. caudatum</i> – linhagem PC2 – em organismos mL ⁻¹) nos cultivos com e sem agitação.....	43
Figura 37 – Densidade média mL ⁻¹ de 6 em 6h da linhagem PC1 cultivada a 30° C no pH 9 por 96h.....	44
Figura 38 - Densidade média mL ⁻¹ de 6 em 6h da linhagem PC2 cultivada a 27,5° C no pH 7 por 96h.....	44
Figura 39 – Faixa de sensibilidade da linhagem PC1 ao NaCl após 20h de exposição.....	46
Figura 40 – Faixa de sensibilidade da linhagem PC2 ao NaCl após 20h de exposição.....	47
Figura 41 – Faixa de efeito tóxico do fipronil (confiança de 95%) para a linhagem PC1 após 20h de exposição.....	48
Figura 42 – Faixa de efeito tóxico do fipronil (confiança de 95%) para a linhagem PC 2 após 20h de exposição.....	49
Figura 43 – Cromatograma do branco (amostra sem o fipronil) para avaliação da ocorrência de picos indesejados de contaminantes.....	52
Figura 44 - Curva de calibração entre as escalas mgL ⁻¹ e mAU dos cromatogramas.....	53
Figura 45 – Cromatograma do fipronil na concentração de 3 mgL ⁻¹	54
Figura 46 – Cromatograma do fipronil na concentração de 3,5 mgL ⁻¹	55
Figura 47 – Cromatograma do fipronil na concentração de 5,5 mgL ⁻¹	55
Figura 48 – Cromatograma do fipronil na concentração de 6,5 mgL ⁻¹	56

Figura 49 – Cromatograma do fipronil na concentração de 9,5 mgL ⁻¹	56
Figura 50 – Cromatograma do fipronil na concentração de 10 mgL ⁻¹	57
Figura 51 – Gráfico de Pareto indicando a correlação da temperatura de 20 e 30°C e do pH 6 e 9 no cultivo de PC 1.....	59
Figura 52 - Gráfico de Pareto indicando a correlação da temperatura de 20 e 27,5°C e do pH 7 e 9 no cultivo de PC 2.....	60
Figura 53 - Gráfico de Pareto indicando a correlação da temperatura de 27,5 e 30°C e do pH 7 e 9 no cultivo de PC 2.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Densidade celular média (indivíduos mL ⁻¹) de <i>P. caudatum</i> (linhagem PC1) após 72h de cultivo nos diferentes pHs e temperaturas testados.....	30
Tabela 2 – Valores médios de biovolume celular (em µm ³) de <i>P. caudatum</i> após 72h de cultivo da linhagem PC1.....	32
Tabela 3 - Densidade celular média (indivíduos mL ⁻¹) de <i>P. caudatum</i> (linhagem PC2) após 72h de cultivo nos diferentes pHs e temperaturas testados.....	36
Tabela 4 – Valores médios de biovolume celular (µm ³) de <i>P. caudatum</i> após 72h de cultivo da linhagem PC2.....	38
Tabela 5 - Percentuais de recuperação das aostras de fipronil utilizadas durante os testes de toxicidade.....	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Propriedades físico-químicas do Fipronil (Connelly, 2001).....2

Quadro 2 - Classes de toxicidade aguda de agrotóxicos para organismos aquáticos (Zucker, 1985).....50

Quadro 3 - Concentração média letal ou efetiva (LC ou EC₅₀) do fipronil a diferentes grupos de organismos (em ordem decrescente de tolerância) - Fonte: (1) Trabalho atual; (2) Overmyer *et al.* (2007); (3) Nakagome (2006); (4) Manrique (2009); (5) Konwick (2005); (6) Cary (2004).....51

LISTA DE SIGLAS

P.A. – Padrão analítico

PC 1 – Linhagem de *Paramecium caudatum* obtida da Represa do Monjolinho (São Carlos – SP)

PC 2 - Linhagem de *Paramecium caudatum* obtida da Lagoa do Óleo (Luís Antônio – SP)

n - Número de gerações

N - População total máxima

N_0 - Número de microrganismos inoculados no início do cultivo

g - Tempo de geração

t - Tempo de obtenção da população total máxima

NOEC – Highest Concentration with Non Observed Effect

LOEC – Lowest Concentration with Observed Effect

LC(I)₅₀ - Concentração inicial da substância letal a 50% dos organismos em testes de toxicidade

LC(I)₁₀₀ - Concentração inicial da substância letal a 100% dos organismos em testes de toxicidade

LC₅₀ – Concentração da substância letal a 50% dos organismos em testes de toxicidade

EC₅₀ – Concentração da substância que causa efeito adverso a 50% dos organismos em testes de toxicidade

SPE – Solid Phase Extraction

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

LOQ – Limite de quantificação

TSK – Trimmed – Spearman - Karber

T - Temperatura

RESUMO

Protozoários têm sido propostos como indicadores biológicos de poluição aquática devido à sua sensibilidade a alterações ambientais, ao seu curto ciclo de vida e facilidade para cultivo, o presente trabalho pretendeu estudar duas linhagens do protozoário ciliado *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1833 (PC1, isolada da Represa do Monjolinho - São Carlos-SP e mantida em cultura monoxênica no Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aquáticos da UFSCar e outra, a PC2, que foi isolada da Lagoa do Óleo-Lagoa marginal do Rio Moji-Guaçu- SP). Foram feitos experimentos que tiveram por objetivo estudar o ciclo de vida, obter as melhores condições de cultivo e verificar diferenças na sensibilidade dessas duas linhagens ao fipronil considerando que os locais de origem dessas linhagens possuem diferente histórico prévio de exposição ao agrotóxico. Os experimentos executados também visaram verificar a possibilidade de utilização desses organismos como bioindicadores ambientais em bioensaio padronizado.

As melhores condições de cultivo para a linhagem PC1 foram em pH 9, a 30°C, e para PC2 foram em pH 7, a 27,5°C, sendo que para as duas linhagens o melhor crescimento foi sem iluminação ou agitação e o aumento na escala do cultivo não interferiu significativamente no crescimento. Em cultura foi possível observar que PC2 apresenta reprodução mais lenta, porém atinge maiores densidades que PC1. A linhagem PC2 é mais sensível ao fipronil. Comparadas a outros organismos, as duas linhagens são bastante resistentes ao fipronil, não sendo interessantes como indicadores de contaminação desse agrotóxico no ambiente. Além disso, por serem alimento de níveis tróficos superiores, a resistência apresentada ao agrotóxico nos leva a crer que nos ecossistemas contaminados, esses organismos podem ser importantes para a acumulação do fipronil na rede alimentar onde estão presentes. Entretanto, os ciliados estudados mostraram ser bons organismos-teste para ensaios ecotoxicológicos.

Palavras chave: fixadores, cultivo monoxênico, toxicidade, otimização de cultivo, curva de crescimento, agrotóxico, protozoário

ABSTRACT

Protozoans has been proposed as biological indicators of water pollution due to their sensitivity to environmental changes, their short life cycle and easy cultivation, this work intended to study two strains of the ciliated protozoan *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1833 (PC1 isolated from the Monjolinho Reservoir - São Carlos-SP and maintained in monoxenic culture at the Laboratory of Ecology of Aquatic Microorganisms of UFSCar and PC2 isolated from Óleo Lagoon – an oxbow lake in the Moji-Guaçu River floodplain – Luiz Antônio- SP). Experiments were done aiming to study the life cycle, best cultivation conditions and to verify the toxicity of the pesticide fipronil to these protozoan lineages, considering that the local from which they were isolated have differing history of contamination with the pesticide. The experiments were executed aiming to verify the possibility of the utilization of these organisms as environmental bioindicators in a standardized bioassay.

The best culture condition obtained for PC1 was at pH 9 and 30 °C and for PC2 was at pH 7 and 27.5 °C. For the two lineages the best results were obtained with no light and agitation and the increase of the cultivation scale not interfered significantly in the growth. It was possible to observe that in culture, the PC2 has a slower growth and, in the other hand higher densities than PC1. Compared with other organisms, the two lineages are very resistant to fipronil, and as a result not suitable as bioindicators of environmental contamination by this pesticide. Besides, because they are food items for the higher trophic levels, their resistance to the pesticide led us to consider that in the contaminated ecosystems, these organisms can be important for the fipronil accumulation in the food web. However, the studied ciliates displayed potential to be used as test-organisms for ecotoxicological assays.

Key Words: fixatives, monoxenic culture, toxicity, culture optimization, growth curve, pesticide, protozoan

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
3.1 Os protozoários utilizados nos experimentos.....	7
3.2 Locais de origem dos protozoários.....	8
3.2.1 Represa do Monjolinho.....	8
3.2.2 Lagoa do Óleo.....	9
3.3 Cultivo dos organismos utilizados nos experimentos.....	10
3.4 Testes de fixadores em diferentes condições de pH.....	11
3.5 Experimentos de otimização de cultivo para <i>Paramecium</i>	
<i>caudatum</i>.....	13
3.5.1 Determinação das melhores condições de pH e	
temperatura.....	13
3.5.2 Avaliação da influência do tamanho do frasco de cultivo e da	
iluminação.....	16
3.5.3 Avaliação dos efeitos da agitação.....	17
3.6 Curvas de crescimento.....	17
3.7 Testes de sensibilidade de <i>Paramecium caudatum</i> ao NaCl.....	18
3.8 Testes de toxicidade aguda do fipronil.....	19
3.9 Determinação das concentrações nominais do fipronil.....	20
3.9.1 Extração em fase sólida (SPE).....	20
3.9.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	21
3.9.2.1 Condições cromatográficas.....	21
3.9.3 Limite de Quantificação (LOQ).....	21
3.9.4 Curva de Calibração.....	21
3.9.5 Recuperação.....	22
3.10 Análises estatísticas.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 Testes com diferentes fixadores para a preservação de amostras de	
cultivo do <i>Paramecium caudatum</i>.....	22
4.2 Experimentos de Otimização de cultivo.....	27

4.2.1	Determinação das melhores condições de pH e temperatura.....	27
4.2.2	Avaliação da influência do tamanho do frasco de cultivo e das condições de iluminação.....	40
4.2.3	Avaliação dos efeitos da agitação.....	42
4.3	Curvas de crescimento.....	43
4.4	Testes de sensibilidade de <i>Paramecium caudatum</i> ao NaCl.....	45
4.5	Testes de toxicidade aguda do fipronil.....	47
4.6	Determinação das concentrações nominais do fipronil.....	52
4.6.1	Limite de Quantificação (LOQ).....	52
4.6.2	Curva de Calibração.....	52
4.6.3	Recuperação.....	53
4.7	Análises estatísticas.....	58
5.	CONCLUSÕES.....	61
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

A poluição ambiental crescente e o aparecimento contínuo de novas substâncias químicas levaram a uma preocupação cada vez maior na sociedade acerca dos seus potenciais efeitos, diretos ou indiretos, na saúde humana (Nilsson, 1989). De acordo com Mozeto & Zagatto (2008), há cerca de 10 milhões de substâncias químicas mencionadas na literatura científica, sendo que cerca de 70 mil são de uso cotidiano e de mil a 2 mil novas substâncias são adicionadas a essa lista anualmente. Tendo em vista as dificuldades de estudos, apenas 2 mil dessas substâncias têm seus efeitos tóxicos conhecidos, o que aumenta o desafio de solucionar problemas em casos de contaminações ambientais. Existe, portanto a necessidade de se avaliar, no ambiente e nos seres vivos, os efeitos a curto e longo prazo da exposição e da acumulação dessas substâncias.

Sabe-se que o número de agrotóxicos e rejeitos industriais tem aumentado muito desde a década de 50. Os agrotóxicos possuem uma grande variedade de estruturas químicas, incluindo moléculas orgânicas ou inorgânicas (Baird, 2002) e podem ser introduzidos no ambiente de diversas formas: durante a fabricação, a aplicação ou ainda pela lixiviação (Rand, 1995), afetando os organismos-alvo, ou atuando direta ou indiretamente em outros organismos. Segundo Pimentel & Levitam (1986), em revisão sobre a quantidade de agrotóxicos aplicados, apenas 0,1% do produto atinge os organismos-alvo, sendo que o restante acaba por contaminar os ecossistemas adjacentes ao da aplicação.

Dentre vários agrotóxicos, o fipronil (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluormetil)fenil]-4-[(trifluormetil) sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitrila), Figura 1, é um inseticida do grupo químico dos fenilpirazóis de segunda geração, usado em medicina veterinária contra pulgas e carrapatos (Miranda, 2006) cujas propriedades físico-químicas estão mostradas no Quadro 1. Segundo Gunasekara & Troung (2007), o fipronil é um inseticida moderadamente solúvel em água, lipofílico e, portanto, tem afinidade por lipídeos, óleos, lignina, proteínas e solventes orgânicos. Ele é um potente inibidor do canal de cloro dependente do ácido gama-aminobutírico (GABA), causando a morte do *Arthropoda* pela hiper-excitação, convulsões e por paralisia (Ohi, 2002) e sendo ativo a baixas doses em vários insetos terrestres (Chanton *et al.*, 2001). Por isso, ele também tem sido utilizado na agricultura para

o controle de formigas, cupins, lagartas e ácaros de diversas culturas como, por exemplo: arroz, algodão, batata, milho, soja e cana de açúcar.

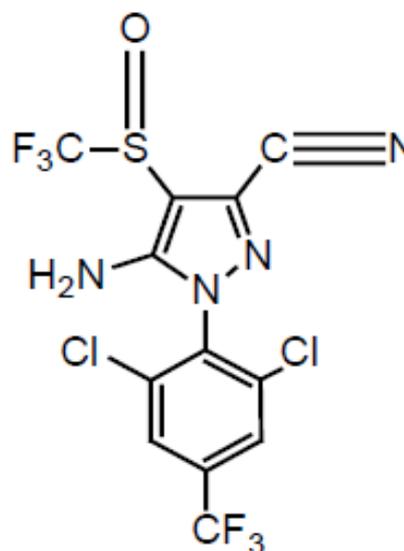


Figura 1 – Fórmula estrutural do fipronil (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluormetil) fenil]-4-[(trifluormetil) sulfínil]-1H-pirazol-3-carbonitrila) (Fonte: Connolly, 2001)

Quadro 1 – Propriedades físico-químicas do Fipronil

Peso molecular	437,2 g mol ⁻¹
Constante de Henry	3,7 x 10 ⁻⁵ Pa m ³ mol ⁻¹
Pressão de vapor	3,7 x 10 ⁻⁴ mPa (a 25° C)
Coefficiente de partição carbono orgânico e água (K _{oc})	803 (valor médio)
Log do coeficiente de partição octanol água (K _{ow})	4,01
Solubilidade em água (pH = 5)	0,0024 g L ⁻¹
Solubilidade em água (pH = 9)	0,0022 g L ⁻¹
Solubilidade em acetona	545,9 g L ⁻¹
Solubilidade em hexano	0,028 g L ⁻¹
Solubilidade em octanol	12,2 g L ⁻¹
Ponto de fusão	195,5 – 203 °C

Fonte: Connolly, 2001

Segundo dados do último Censo Agropecuário realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2006, a área total ocupada pela cultura da soja no Brasil foi de 15,6 milhões de hectares. Dados mais recentes (2008), também do IBGE, mostram uma ocupação de 8,36 milhões de hectares do território nacional pela lavoura de cana de açúcar. No estado de São Paulo, de acordo com o Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (Inpe), na safra de 2004/05 a cultura canavieira ocupava 3,16 milhões de hectares, que representam cerca de 13% de toda a extensão territorial do estado (Rudorff *et al.*, 2004). Dessa

maneira, como o fipronil é bastante utilizado nessas culturas, segundo Romanelli *et al.* (2006), o risco ambiental do uso indiscriminado desse agrotóxico é bastante elevado, pois sua molécula pode atingir os lençóis freáticos, rios e lagoas promovendo a contaminação indireta da fauna aquática quando utilizado para fins agrícolas.

Embora a toxicidade do fipronil para vários *Arthropodas*, como insetos e carrapatos, seja bastante conhecida, sua toxicidade para outros grupos de organismos tem sido alvo de várias pesquisas. Por exemplo, em peixes e crustáceos, Gilles & Péqueux (1983) observaram que, na maioria dos casos, a toxicidade deve-se a capacidade da molécula do agrotóxico associar-se ou ligar-se a metais. Nakagome (2007), em bioensaios com fipronil, obteve o resultado de CL_{50} para o peixe *Danio rerio* de $0,18 \text{ mgL}^{-1}$. Em seu trabalho com o peixe Guaru, *Poecilia reticulata*, Manrique (2009) obteve a LC_{50} para o fipronil entre $0,07$ e $0,1 \text{ mgL}^{-1}$, sendo que esta variação ocorreu devido ao tipo de substrato utilizado. Segundo Wirth *et al.* (2004), o fipronil alterou rapidamente as populações do crustáceo *Palaemonetes pugio*, em experimentos realizados com a concentração de 5000 ngL^{-1} e diminuiu significativamente a sobrevivência dos mesmos, em experimentos de exposição contínua em concentrações entre 355 e 5000 ngL^{-1} durante 28 dias. Konwick *et al.* (2005) realizaram testes de toxicidade com o Cladocera *Ceriodaphnia dubia* utilizando várias formas do fipronil: em mistura racêmica, separando os enantiômeros e o produto de fotodegradação dos mesmos (disulfenil), concluindo que, em testes com e sem iluminação, o enantiômero + foi o mais tóxico de todos. Nakagome *et al.* (2006) testou a toxicidade do fipronil na forma comercial Standak 250 FS para o Cladocera *Daphnia magna*, concluindo que a concentração efetiva (CE_{50}) de ingrediente ativo que eliminou 50% dos organismos foi de $0,15 \text{ mgL}^{-1}$, classificando-o como altamente tóxico em comparação a outros agrotóxicos testados. Chandler *et al.* (2004) utilizaram o fipronil em testes de toxicidade com o Copepoda *Amphiascus tenuiremis*, e concluíram que a concentração de $2,5 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$ causa a total inibição reprodutiva da espécie.

A avaliação da toxicidade de vários compostos pode ser feita utilizando organismos-teste, que são considerados como modelos das respostas de quaisquer seres vivos a esses compostos, tendo sempre a saúde humana e ambiental como objetivos principais. Experimentos de toxicidade “in vitro” podem

ser feitos com a exposição direta dos organismos-teste a diferentes concentrações de reagentes químicos puros, misturas de reagentes definidos para verificar possíveis sinergismos/antagonismos ou misturas químicas indefinidas, como amostras brutas de despejo de diferentes indústrias.

Segundo Niemeyer *et al.*, (2009), esses ensaios requerem organismos-teste que tenham reprodução rápida, gerem um número suficiente de descendentes, sejam de fácil obtenção em campo e sejam bem adaptados à manipulação em laboratório. Além disso, segundo Domingues & Bertoletti (2008), é preciso que a espécie seja bastante sensível a uma diversidade de agentes químicos. Sua sensibilidade deve ser relativamente constante, de maneira que possibilite a obtenção de resultados precisos, garantindo, assim, boa repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados. Para tanto, são necessários conhecimentos prévios da biologia da espécie, como reprodução, hábitos alimentares, fisiologia e comportamento, tanto para o cultivo quanto para realização dos testes. Quando a espécie apresenta condições ou possibilidade de manutenção, ou existem técnicas disponíveis de cultivo em laboratório, seu uso se torna altamente recomendável.

Protozoários são organismos eucariotos componentes de comunidades microbianas planctônicas e bentônicas de ambientes aquáticos, onde desempenham papéis críticos tanto qualitativa quanto quantitativamente (Fenchel, 1987). É sabido atualmente que os protozoários são importantes elos nas cadeias tróficas que pertencem, onde mediam o fluxo de substâncias e energia de um nível trófico ao seguinte (Sherr *et al.*, 1988). São muito sensíveis a mudanças ambientais, sendo, portanto, ideais como indicadores de alerta precoce da deterioração de ecossistemas aquáticos e como organismos-teste para ensaios toxicológicos (Logar, 2007).

Devido à sua sensibilidade a alterações ambientais, ao seu curto ciclo de vida, facilidade para cultivo e manutenção, os protozoários têm sido utilizados em estudos toxicológicos e propostos como indicadores biológicos de poluição aquática (Nicolau *et al.*, 1999; Nalecz-Jawecki & Sawicki, 2002; Dias *et al.*, 2003; Nalecz-Jawecki, 2004). Os protozoários mais utilizados em experimentos de toxicidade são os ciliados, especialmente os do gênero *Tetrahymena*, em cultura axênica. Estes foram testados frente a 57 diferentes reagentes químicos (Yoshioka *et al.*, 1985); metais potencialmente tóxicos, certas drogas e surfactantes (Nilsson, 1989; Nicolau, Mota & Lima, 1999; Dias, Mortara & Lima, 2003); micotoxinas

(Benitez et al., 1994); xenobióticos (Sauvant *et al.*, 1995) e elementos inorgânicos como Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ge, Hg, Mn, Nb, Pb, Sb, Sn, Ti, V e Zn (Sauvant, 1997).

Entretanto, são também utilizados ciliados mantidos em culturas monoxênicas em experimentos para avaliar a toxicidade de diferentes poluentes como detergentes (Dryl & Mehr, 1976), metais (Martín-González *et al.*, 2006; Miyoshi *et al.*, 2003), substâncias carcinogênicas, herbicidas, inseticidas, fungicidas, antimicrobianos e solventes orgânicos (Miyoshi *et al.*, 2003) ou holoxênicas frente à metais potencialmente tóxicos, agrotóxicos, derivados de fenol e benzenos (Twagilimana *et al.*, 1998; Nalecz-Jawecki & Sawicki, 1999, 2002; Nalecz-Jawecki, 2004).

O estudo da sensibilidade dos protozoários ciliados, a um grande número de substâncias tóxicas, pode fornecer um padrão de medida para identificar a intensidade e o potencial de danos ecológicos causado por descargas antropogênicas de poluentes, nas águas de superfície (Madoni & Romeo, 2006). Protozoários são frequentemente usados como bioindicadoras de poluição química, especialmente em ambiente aquoso (Rao, 2006). O ciliado *Paramecium caudatum*, utilizado no presente estudo, é um dos protozoários mais conhecidos, sendo normalmente encontrado no hipolímnio, podendo estar associado a raízes de macrófitas e, segundo Miyoshi *et al.* (2003), um dos exemplares de ciliados mais comumente usado em pesquisas laboratoriais. Rao *et al.* (2006) utilizou esta espécie em testes de toxicidade aguda com o agrotóxico acefato, obtendo a LC₅₀ entre 300 a 500 mgL⁻¹, dependendo do tempo de duração. Segundo Amanchi & Bhagavathi (2009) a toxicidade aguda (LC₅₀) do agrotóxico Delfin também para *P. caudatum* foi em torno de 250 mgL⁻¹. Ohashi (2010), em testes de toxicidade aguda, ao arsenito (As³⁺) e arsenato (As⁵⁺), com a mesma linhagem (PC1) utilizada neste trabalho, após 20h de exposição obteve os seguintes valores de LC₅₀: 0,69 mgL⁻¹ para As³⁺ e 2,42 mgL⁻¹ para As⁵⁺.

Dessa maneira, o presente trabalho utilizou experimentos para avaliar a toxicidade do agrotóxico fipronil em duas linhagens do protozoário ciliado *Paramecium caudatum*: uma isolada da Represa do Monjolinho (São Carlos-SP) e mantida em cultura monoxênica no Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aquáticos da UFSCar, à qual foi atribuído o código PC1, e a outra que foi isolada

da Lagoa do Óleo - Lagoa marginal do Rio Moji-Guaçu – Luiz Antonio-SP, que recebeu o código PC2.

Com esses experimentos pretendemos verificar se há diferença na sensibilidade das diferentes linhagens de *Paramecium caudatum* ao fipronil, uma vez que a Represa do Monjolinho não tem histórico prévio de exposição a esse agrotóxico enquanto que a Lagoa do Óleo, segundo Peret *et al.* (2010) tem sido frequentemente contaminada pelo fipronil devido à extensivas plantações de cana-de-açúcar em sua proximidade. Além disso, como os protozoários têm ampla distribuição nos ambientes aquáticos e têm o papel de elos entre as bactérias e os organismos zooplanctônicos nos níveis tróficos superiores (Porter *et al.* 1985), pretende-se, por meio desses experimentos, avaliar indiretamente o impacto do fipronil nas comunidades aquáticas microbianas. Pretende-se, por fim, verificar a possibilidade da utilização desse protozoário como bioindicador ambiental em um bioensaio padronizado.

2. OBJETIVOS

- Determinação experimental do melhor tipo de fixador a ser utilizado na preservação dos protozoários que serão utilizados nos experimentos de otimização de cultivo, de tempo de geração e de toxicidade do fipronil, utilizando o *Paramecium caudatum* isolado da Represa do Monjolinho como modelo;
- Levantamento de dados sobre a biologia (melhores condições de cultivo e tempo de geração) de duas linhagens do protozoário ciliado *Paramecium caudatum* isoladas de diferentes ambientes: PC1 isolada de um ambiente não contaminado por fipronil (Represa do Monjolinho - São Carlos-SP) e PC2 isolada de um ambiente contaminado por fipronil (Lagoa do Óleo - Luiz Antonio-SP);
- Realizar testes de toxicidade com o agrotóxico fipronil de padrão analítico (p. a.) com as duas linhagens de *P. caudatum*
- Verificar se a linhagem PC2 apresenta maior resistência ao inseticida que a PC1 devido à sua exposição prévia ao agrotóxico no seu ambiente natural de origem;

Avaliar a adequação de ambas as linhagens para serem utilizadas como bioindicadoras de contaminação pelo agrotóxico fipronil.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 O protozoário utilizado nos experimentos

O ciliado *Paramecium caudatum* utilizado no presente estudo, é um dos protozoários mais conhecidos, sendo normalmente encontrado no hipólímnio, sedimento e associado às raízes de macrófitas em ambientes aquáticos (Figura 2). Ele pode se alimentar de bactérias e foi escolhido para o estudo, dentre outros protozoários, por ser comum na maioria dos ambientes aquáticos; ser de fácil cultivo e manutenção em cultura; e ser considerado um bom modelo para testes de toxicidade (Rouabhi *et al.*, 2006).



Figura 2 - Foto do protozoário ciliado *Paramecium caudatum* utilizado nos experimentos (fonte: turbina.wordpress.com/2009/07/23/protozoa/).

3.2 Locais de origem dos protozoários

Foram utilizadas duas linhagens do protozoário ciliado *Paramecium caudatum*, uma isolada da Represa do Monjolinho (São Carlos-SP) e mantida em cultura monoxênica no Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aquáticos da UFSCar, à qual foi atribuído o código PC1, e a outra que foi isolada da Lagoa do

Óleo - Lagoa marginal do Rio Moji-Guaçu – Luiz Antonio-SP, que recebeu o código PC2.

Amostras de água e sedimento dos dois ambientes foram analisadas em microscópio visando o isolamento dos protozoários. A linhagem PC1 foi isolada a partir de uma amostra de água enquanto que a linhagem PC2 foi obtida em uma amostra de sedimento. A triagem e a introdução dos organismos para meios de cultura foram feitas com o auxílio de microcapilares de vidro, sob microscopia ótica. Após a confirmação do crescimento dos protozoários, e da pureza das culturas, foi iniciada uma cultura utilizando como inóculo apenas 1 indivíduo. Essas culturas, iniciadas com apenas 1 indivíduo, feitas para PC1 e PC2, foram utilizadas como inóculo das culturas utilizadas nos experimentos realizados nesse trabalho. Tal cuidado foi tomado com o objetivo de reduzir a variabilidade nas populações utilizadas nos experimentos e garantir a reprodutibilidade nos experimentos.

3.2.1 Represa do Monjolinho

A Represa do Monjolinho (São Carlos-SP) fica no campus da Universidade Federal de São Carlos (22° 01' 03" S e 47° 53' 27" W), um local sem histórico de contaminação por fipronil (Figura 3), possuindo em suas margens um bosque de *Pinus* sp. e áreas gramadas.



Figura 3 – Imagem aérea da Represa do Córrego Monjolinho (Fonte: www.lapa.ufscar.br/banco_de_fotos/ufscar3.jpg).

3.2.2 Lagoa do Óleo

A Lagoa do Óleo (lagoa marginal do Rio Moji-Guaçu) se situa na Estação Ecológica do Jataí (Figura 4), no município de Luiz Antônio – SP. O entorno da Estação Ecológica é ocupado principalmente pelo cultivo de cana-de-açúcar, que demandam grandes quantidades de agotóxicos. Nesta região, os agotóxicos são comumente aplicados com aviões adaptados para este fim, atingindo também, desta forma, os ecossistemas adjacentes devido à dispersão do produto pelo vento, além da contaminação ocorrida pela lixiviação e o carreamento superficial, proporcionados pelas chuvas. Segundo Peret *at al.* (2010) o agrotóxico fipronil foi encontrado na Lagoa do Óleo, na concentração de $4,3 \mu\text{g L}^{-1}$ (desvio padrão de $0,061 \mu\text{g L}^{-1}$), no sedimento de um ponto de coleta. Segundo esse autor, o ponto onde o fipronil foi encontrado recebe águas subsuperficiais do rio Moji-Guaçu, por meio das quais o agrotóxico pode ter entrado na lagoa.

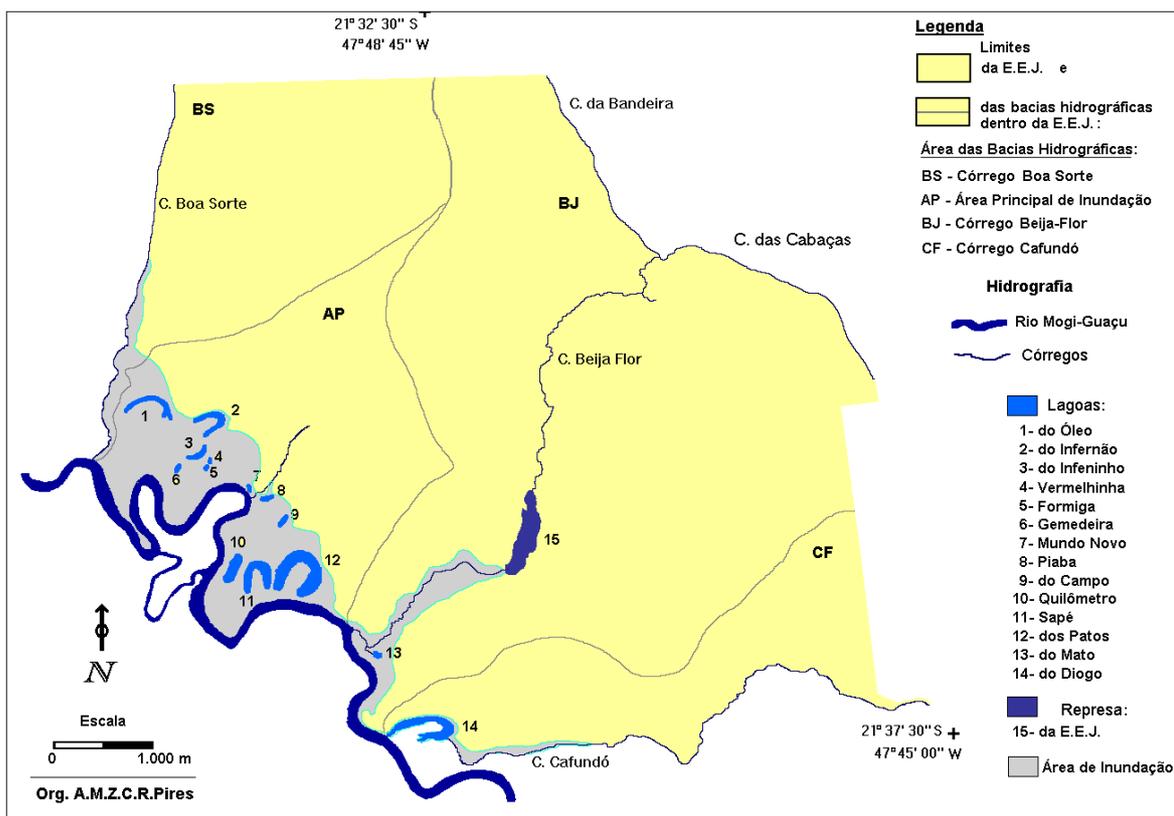


Figura 4 - Localização geográfica da Estação Ecológica do Jataí (Fonte: www.lapa.ufscar.br/hidinund.gif).

3.3 Cultivo dos protozoários

Para o cultivo dos protozoários foram utilizados tubos de ensaio contendo ágar inclinado a 2% e um grão de arroz com casca, previamente fervido e autoclavado (Figura 5) com 10 mL de uma suspensão da bactéria *Enterobacter aerogenes*, na concentração de 10^6 células mL^{-1} , feita com água mineral Minalba® (composição: cálcio $17,14 \text{ mgL}^{-1}$; magnésio $9,83 \text{ mgL}^{-1}$; sódio $1,10 \text{ mgL}^{-1}$; cloretos $0,13 \text{ mgL}^{-1}$; nitratos $0,8 \text{ mgL}^{-1}$; sulfatos $0,2 \text{ mgL}^{-1}$; bicarbonatos $105,15 \text{ mgL}^{-1}$; fluoretos $0,05 \text{ mgL}^{-1}$; Bário $0,024 \text{ mgL}^{-1}$ e estrôncio $0,020 \text{ mgL}^{-1}$) que possui composição mais próxima à da água mineral francesa Volvic®, frequentemente utilizada para o cultivo de protozoários (e.g. Packroff *et al.*, 2002; Bass *et al.*, 2007; Wickham & Gugenberger, 2008)

Esse meio de cultura é adequado para protozoários bacterívoros, onde o protozoário se alimenta da bactéria *E. aerogenes* que, por sua vez, utiliza o grão de arroz. As linhagens (PC1 e PC2) foram repicadas para meios de cultura novos, pelo menos uma vez ao mês, para sua manutenção, sempre utilizando como origem as culturas resultantes daquelas obtidas à partir do inóculo de 1 organismo.

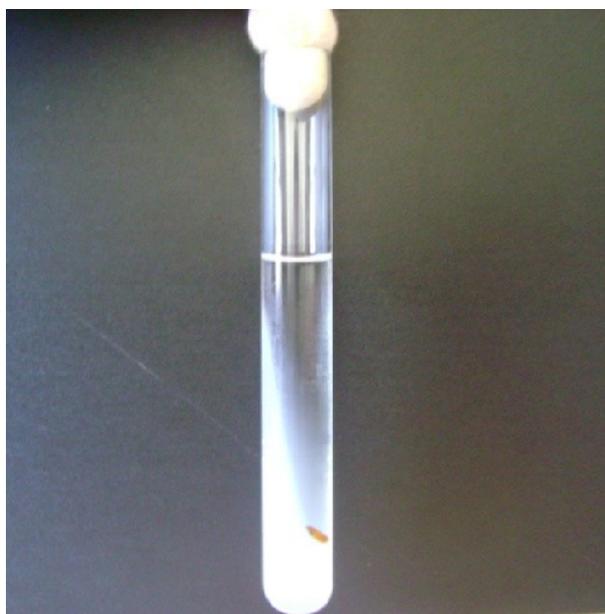


Figura 5 – Tubo de ensaio com meio de cultura para protozoários bacterívoros.

3.4 Testes com fixadores diversos em diferentes condições de pH

Devido ao fato dos protozoários serem organismos pequenos, com grande mobilidade e sensíveis à manipulação (pela ausência de parede celular), existem

grandes problemas associados à identificação, medida ou contagem dos mesmos em amostras vivas ambientais e de experimentos laboratoriais. Para se tentar superar essas dificuldades, uma alternativa para viabilizar e/ou facilitar esses estudos é a utilização de fixadores para a preservação das amostras. Apesar de vários fixadores serem mencionados na literatura, não existe consenso quanto ao melhor.

Um dos objetivos desse experimento foi testar “in vitro” a eficiência de alguns fixadores em diferentes pHs para poder ser utilizado com segurança nos experimentos posteriores propostos, em especial aqueles visando a obtenção de melhores condições de cultivo, onde o pH é uma das variáveis testadas. Os fixadores testados foram utilizados segundo Sherr & Sherr (1993): formaldeído a 2%, bouin a 5%, solução saturada de cloreto de mercúrio a 2,5%, lugol ácido a 1% e a mistura de lugol alcalino (0,1%) / formaldeído (2%) / tiosulfato de sódio (0,2%). Esse experimento foi feito, em triplicatas para cada fixador testado utilizando apenas a linhagem PC1 de *Paramecium caudatum*.

Em cada poço de placas de cultivo de tecido de poliestireno (Costar®) com 24 cavidades (Figura 6), foram colocados cinco protozoários com um grão de arroz com casca (previamente fervido e autoclavado) e 1 mL de uma suspensão da bactéria *Enterobacter aerogenes* (na concentração de 10^6 células mL⁻¹) feita com água mineral (Minalba®) assepticamente corrigida para diferentes pHs (3, 5, 7, 9 e 11) utilizando HCl 1N ou NaOH 1N. Essas placas foram incubadas a 30°C e após 72 horas, o conteúdo das mesmas foi retirado e preservado com diferentes fixadores. As amostras de ciliados fixados foram estocadas em frascos de vidro de 5 mL (Figura 7) até contagem em microscópio ótico Leica DM/LS (aumento de 100 X) utilizando uma câmara de Sedgewick-Rafter de 1 mL. Com o objetivo de se avaliar isoladamente o efeito do pH na densidade e sobrevivência dos organismos, foram feitos cultivos controle simultâneos (3 placas), em condições idênticas às anteriormente citadas, também em triplicatas, para serem analisados após 24, 48 e 72 horas, sem a fixação dos protozoários. Após esses tempos de incubação as amostras integrais foram utilizadas para contagens “a fresco”, por meio de microgotas, em microscópio ótico Leica DM/LS em aumento de 40 X.



Figura 6 – Placa de cultivo de tecidos com 24 cavidades.



Figura 7 – Frascos com as amostras preservadas com os diferentes fixadores testados.

3.5 Experimentos de otimização de cultivo para *Paramecium caudatum*

Foram feitos testes para verificar as condições de maior crescimento das duas linhagens de *Paramecium caudatum* (PC1 e PC2) em relação ao ambiente físico-químico (pH, temperatura, iluminação, tamanho dos frascos de cultivo e agitação). Numa primeira etapa os experimentos foram realizados em tubos de ensaio de vidro com 10 mL de meio de cultura, variando o pH dos mesmos (ajustados assepticamente com soluções de HCl ou NaOH 1N) e as temperaturas de incubação. Após a determinação das melhores condições, para estas duas variáveis, os cultivos foram realizados em maior escala utilizando frascos cujo volume total era de 140 mL (garrafas utilizadas para diluição em análises microbiológicas de leite), nas condições pré-definidas, no experimento anterior, de pH e temperatura, sendo variados os fotoperíodos. Por último foi testado o efeito da presença ou ausência da agitação nos cultivos, que também foram realizados

em frascos de 140 mL, porém já nas melhores condições de pH, temperatura e fotoperíodo obtidas para cada linhagem.

3.5.1 Determinação das melhores condições de pH e temperatura

Para esses ensaios foram testadas, para as duas linhagens de *Paramecium caudatum* (PC1 e PC2), quatro condições de pH (6, 7, 8 e 9) e temperatura (20, 25, 27,5 e 30°C). A água mineral (Minalba®) utilizada nos meios de cultura foi esterilizada em autoclave e posteriormente ajustada para cada pH, assepticamente, pois foi verificado que este processo de esterilização por autoclavagem eleva significativamente o pH da água mineral utilizada. Foram preparados cultivos em tubos de ensaio contendo ágar inclinado a 2% e um grão de arroz com casca, previamente fervido e autoclavado em 10 mL de uma suspensão da bactéria *Enterobacter aerogenes* feita com água mineral Minalba®, na concentração de 10^6 células mL⁻¹ (Figura 8). Em cada frasco de cultivo foram inoculados cinco protozoários. Para cada condição de pH e temperatura, combinadas duas a duas, foram preparadas três réplicas, sendo um total de doze cultivos distribuídos igualmente em cada temperatura (20, 25, 27,5 e 30°C). A duração deste experimento foi pré-definida para 72h, sendo que durante a sua realização todos os tubos foram cobertos com papel alumínio para serem mantidos no escuro (Figura 9).



Figura 8 – Tubos de ensaio contendo ágar inclinado, um grão de arroz e 10 mL de uma suspensão da bactéria *E. aerogenes* na concentração de 10^6 células mL^{-1} .



Figura 9 – Tubos de ensaio utilizados nos experimentos de otimização de cultivo acondicionados em ambiente escuro no interior de uma câmara de incubação.

Ao final desse período, três alíquotas de 1 mL, de cada frasco, foram fixadas com solução saturada de HgCl_2 e coradas com solução 0,04% de azul de bromofenol (Pace & Orcutt, 1981) até a contagem em microscópio óptico, em aumento de 100X, utilizando câmaras de Sedgewick-Rafter. Os protozoários contidos nas amostras foram contados e foram feitas medidas lineares

(comprimento e largura) de todos os organismos de cada condição, ou até atingir um total de 40 indivíduos. As medidas foram utilizadas para o cálculo do biovolume celular médio, através da fórmula do sólido geométrico (Figura 10) cuja forma mais se assemelha à do *Paramecium caudatum*, denominado esferóide prolato (parábola rotacionada sobre seu menor eixo). A fórmula utilizada foi:

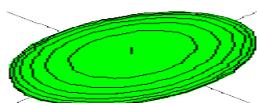


Figura 10 – Esferóide prolato (Fonte: <http://www.mat.ufrgs.br/~calculoquadrica/elipso.htm>).

$$\frac{4}{3}\pi a b^2,$$

Onde: “a” é o comprimento do semi-eixo maior;

“b” é o comprimento do semi-eixo menor.

Após a contagem das amostras, as condições ideais foram definidas em função daquelas que tivessem apresentado o maior número de células com o maior biovolume celular.

3.5.2 Avaliação da influência do tamanho do frasco de cultivo e das condições de iluminação

As duas linhagens (PC1 e PC2) foram estudadas quanto à influência do tamanho do frasco, devido à possível alteração na oxigenação do meio, que pode ser prejudicial aos organismos que normalmente são oriundos de ambientes hipóxicos, e da iluminação, feita por três lâmpadas fluorescentes da marca Philips® de 30 cm, totalizando a intensidade de 1350 lux, no cultivo. Foram estabelecidas três condições de iluminação (claro 24h por dia, escuro 24h por dia

e 12h claro:12 h escuro por dia). Após a inoculação de sessenta organismos em cada frasco de 140 mL (garrafas de diluição de leite), contendo 120 mL da mesma suspensão bacteriana utilizada no experimento anterior e uma base de ágar a 2%, os frascos foram incubados por 72h nas condições pré-determinadas (no experimento anterior) de pH e temperatura. Este experimento também foi realizado em triplicata, sendo, portanto, três garrafas de cada linhagem em cada condição de iluminação, perfazendo um total de nove garrafas para cada linhagem. Ao final das 72h, três alíquotas de 1 mL, de cada frasco, foram fixadas, coradas e contadas da mesma forma descrita anteriormente.

Após a contagem das amostras, a condição mais favorável para cada linhagem foi definida em função daquela que tivesse apresentado o maior número de células.

3.5.3 Avaliação dos efeitos da agitação

Neste experimento foi avaliada a influência da agitação, nos cultivos das duas linhagens de *Paramecium caudatum*, em shaker que foi de 70 RPM, pois abaixo desta frequência o líquido praticamente não se movimentava e acima este movimento seria muito brusco e talvez poderia causar lise celular. Também foram utilizadas garrafas de diluição de leite, com 120 mL de meio de cultivo e sessenta células de protozoários, sendo que para cada linhagem o meio foi preparado no pH adequado e as três garrafas (triplicatas) de cada condição, com e sem agitação, foram incubadas nas devidas condições de temperatura e iluminação, conforme os resultados anteriores.

3.6 Curva de crescimento e obtenção de tempo de geração

Para a realização desses experimentos, para cada linhagem, foram utilizadas três frascos de 140 mL (garrafas do tipo de diluição de leite) contendo 120 mL do meio de cultura padrão e uma base de ágar, nas condições ótimas definidas nos experimentos anteriores, sendo que em cada um foram inoculados sessenta organismos, e os experimentos foram acompanhados por 96 horas,

retirando-se assepticamente 11 alíquotas de 1 mL, em intervalos de tempo de 6 em 6h a partir de 36h do início. As alíquotas foram imediatamente fixadas com solução saturada de HgCl₂, coradas com solução de azul de bromofenol a 0,04% segundo Pace & Orcutt (1981), e posteriormente contadas em microscópio óptico (aumento de 100X) em câmaras de Sedgewick-Rafter para a obtenção da curva de crescimento dos protozoários.

Os dados foram plotados em um gráfico de densidade pelo tempo. O tempo de geração foi calculado a partir do crescimento máximo encontrado na fase logarítmica (log) da curva (polinomial de terceira ordem) obtida, de acordo com a metodologia descrita por Pelczar Jr. *et al.*, (1997), utilizando as fórmulas:

$$n = 3,3 (\log N - \log N_0) \quad e \quad g = t/n$$

onde: n = número de gerações

N = população total máxima

N₀ = número de microrganismos inoculados no início do cultivo

g = tempo de geração

t = tempo de obtenção de N

n = número de gerações

3.7 Testes de sensibilidade de *Paramecium caudatum* ao NaCl

Para ambas as linhagens foram realizados testes de sensibilidade a cloreto de sódio, substância de referência em bioensaios, seguindo as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2004; 2005) para o Cladocera *Ceriodaphnia spp.*, organismo-padrão em testes toxicológicos.

Foi preparada uma solução estoque de NaCl na concentração de 10 gL⁻¹, que foi diluída em água de cultivo (Minalba®), previamente corrigida para o pH mais favorável para cada linhagem de *Paramecium caudatum*, em diversas concentrações para avaliação da sensibilidade dos organismos. Os testes foram

realizados em placas de cultivo de tecidos, idênticas às usadas nos cultivos realizados para avaliação de fixadores, sendo que em cada cavidade foi colocado 1 mL de solução de NaCl e cinco ciliados, com auxílio de microscópio estereoscópio e microcapilar de vidro. Foram feitas triplicatas das diferentes concentrações testadas.

Durante estes bioensaios, com duração de 20h (pois foi observado que este é o tempo em que não há reprodução no controle) as placas foram mantidas em incubadora sem iluminação e os organismos não foram alimentados. Ao final deste período as cavidades foram observadas novamente para avaliação do efeito letal aos protozoários, Em seguida foram determinadas: a maior concentração inicial sem efeito observado (sigla em inglês – NOEC(I)), a menor concentração com efeito observado (sigla em inglês – LOEC(I)), a concentração mediana letal a 50% dos indivíduos presentes no teste ($LC(I)_{50}$ em inglês) e a menor concentração letal a 100% dos organismos (em inglês $LC(I)_{100}$). Em paralelo foram sempre feitos controles positivos, somente com água de cultivo (Minalba®), sendo que quando mais de um indivíduo desta condição morria, o teste era desconsiderado (mortalidade superior a 10% - CETESB, 1992 e ABNT, 2005). Após estes testes preliminares a faixa de sensibilidade foi definida após dez repetições sucessivas destes bioensaios nas condições pré definidas, sendo que a $LC(I)_{50}$ média e a faixa de sensibilidade média, com confiança de 95%, foram estatisticamente estimadas utilizando o programa Trimmed – Spearman – Karber (TSK).

Concomitante aos testes de toxicidade estes testes, para avaliação da sensibilidade do lote de microrganismos utilizados, eram realizados, para ambas as linhagens, com intuito de validar os testes com o toxicante escolhido, ou seja, quando os ciliados estavam muito ou pouco sensíveis o resultado do bioensaio de toxicidade nem era avaliado.

3.8 Testes de toxicidade aguda do Fipronil

Os testes de toxicidade aguda foram feitos com o agrotóxico fipronil (Figura 1), da empresa Sigma – Aldrich, com 99% de pureza. A solução estoque foi preparada na concentração de 100 mgL^{-1} , em solvente acetoneitrila (J. T. Baker p.

a.) devido à baixa solubilidade do agrotóxico em água. Esta solução era mantida em frasco totalmente escuro e em freezer comum (-15°C) com intuito de evitar a degradação do agroquímico e a evaporação do solvente antes de fazer as diluições desejadas.

Estes testes também foram feitos em placas de cultivo de tecidos, do mesmo tipo citado anteriormente, sendo que a solução estoque do agrotóxico era diluída em 1 mL da água de cultivo (Minalba® - também com o pH acertado para cada linhagem) em cada cavidade das mesmas, sendo que após este procedimento a placa era colocada aberta por 30 minutos em câmara de fluxo laminar para que, após a evaporação completa da acetonitrila, utilizada como veículo para a solubilização do fipronil, esta não exercesse efeito tóxico aos organismos e finalmente se obtivesse a concentração desejada do agrotóxico.

Em seguida foram colocados cinco protozoários, oriundos de uma cultura em fase logarítmica após 72h de incubação, em cada cavidade da placa de cultivo que continha somente água mineral pura (Minalba®) ou solução, da maneira já descrita, e o recipiente incubado na temperatura mais favorável, de acordo com a linhagem do ciliado. Foram feitos dois tipos de controle positivo: um contendo apenas a água mineral de cultivo com o pH corrigido para cada linhagem e outro contendo esta mesma água acrescida da maior quantidade de acetonitrila (pura) necessária para diluição do agrotóxico na maior concentração utilizada nos testes, sendo também posteriormente evaporada. Os testes eram invalidados quando a letalidade dos organismos, também providos de cultivo em fase exponencial de crescimento, nos controles fosse superior a 10% (CETESB, 1992 e ABNT, 2005) e, tanto os controles quanto os testes, em todas as concentrações foram realizados em triplicatas. A duração dos testes foi de 20h, pois foi observado que este é o tempo em que não há reprodução no controle.

Após a realização de testes preliminares, conforme descrito anteriormente, em concentrações que variaram de 1 a 12 mg.L⁻¹ de fipronil, para as determinações da LOEC(I), da LC(I)₅₀ (aproximada) e da LC(I)100, os mesmos foram repetidos dez vezes, nestas concentrações determinadas para confirmação das mesmas. Para o último deles, as soluções foram preparadas em volumes maiores, sendo que o excedente (50 mL) foi armazenado em freezer comum e posteriormente em embalagem térmica contendo gelo, durante o transporte até o laboratório em que foram realizadas as análises cromatográficas

(aproximadamente 1 hora depois do preparo das soluções), por HPLC, com intuito de se confirmar a concentração do fipronil nas mesmas.

O cálculo estatístico da $LC(I)_{50}$, com intervalo de confiança de 95%, também foi calculado pelo programa TSK.

3.9 Determinação das concentrações nominais do fipronil

3.9.1 Extração em fase sólida (SPE)

Nesta etapa foram utilizados cartuchos com 500 mg fase estacionária C18 da marca SampliQ de 6 mL de volume. Um volume de 50 mL de cada amostra, proveniente dos experimentos de toxicidade com fipronil, era passada por um novo cartucho, pré-condicionado com 10 mL de acetato de etila (p. a.) e 10 mL de água ultra pura deixando o analito retido. Em seguida o mesmo era eluído com 20 mL de acetato de etila (p. a.) posteriormente evaporado com gás nitrogênio até a total secura. Quando estas amostras não eram analisadas imediatamente, conforme a etapa seguinte, elas eram estocadas em freezer comum.

3.9.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

3.9.2.1 Condições cromatográficas

Para a determinação das concentrações do agrotóxico presente nos experimentos de toxicidade foi utilizado um cromatógrafo a líquido da marca Agilent Technologies 1200 Series, com coluna Zorbax SB C18, detector UV – DAD (Diodearray) G 1315 D, bomba G 1311 A Quaternary. A temperatura ambiente foi mantida em 25°C e o eluente, utilizado nas análises, foi constituído por 70% de acetonitrila (J. T. Baker – grau HPLC) e 30% de água ultra pura.

No momento das análises por HPLC, após a secagem do acetato de etila, os analitos foram reconstituídos com 2,5 mL de acetonitrila (J. T. Baker – grau HPLC), de forma que a quantidade de fipronil presente na amostra inicial (50 mL) foi concentrada 20 X. O volume utilizado nas injeções, isocráticas, foi de 20 μ L em fluxo de 1,2 mLmin⁻¹, com pressão de 112 bar. A análise do cromatográfica foi feita com comprimento de onda de 230 nm em corridas de 8 minutos e tempo de retenção de 5,5 minutos.

3.9.3 Limite de Quantificação (LOQ)

O limite de quantificação foi determinado de acordo com a menor escala de concentração necessária para garantir a confiabilidade do método (HPLC) em determinar a concentração nominal em relação à teórica. Como controles foram injetadas amostras sem o fipronil (branco) para serem feitas comparações.

3.9.4 Curva de calibração

A curva de calibração foi feita com intuito de verificar se os valores obtidos para as bases dos picos cromatográficos, em escala mAU, correspondem, aproximadamente, aos valores teóricos em mgL^{-1} multiplicados por mil, ou seja, para uma solução de 10 mgL^{-1} a área da base do pico cromatográfico deve ser próxima a 10000 mAU.

Os dados para a sua confecção foram obtidos através de injeções, no aparelho de HPLC, de amostras (triplicatas) de várias concentrações de fipronil, preparadas a partir de diluições, em água ultra pura, de uma solução estoque, de concentração conhecida, de fipronil solubilizada em acetonitrila (p. a.). O valor mínimo e máximo desta curva foi determinado a partir dos resultados da menor e da maior concentração utilizadas durante os testes de toxicidade, com margem de segurança acima e abaixo destes.

3.9.5 Recuperação

Para a verificação da eficiência da recuperação, foram dopadas soluções, em triplicatas, com concentrações conhecidas do fipronil e após isto, estas foram percoladas através de cartuchos contendo C18 como adsorvente. Estas amostras de concentrações conhecidas foram preparadas através da diluição de uma solução estoque de concentração conhecida (5000 mgL^{-1} de fipronil solubilizados em acetonitrila) no extrato dos controles (amostras de água ultra pura, sem o agrotóxico, passadas pelo mesmo tipo de adsorvente pré-condicionado - branco). Como controles foram analisadas as mesmas amostras de extrato sem o analito (branco), também em triplicata, para serem feitas comparações. As amostras recuperadas dos cartuchos bem como as soluções dopadas com concentrações

conhecidas foram injetadas em corridas independentes em HPLC e as áreas da base dos picos cromatográficos obtidos em cada cromatograma foram comparadas para se verificar a eficiência da recuperação.

3.10 Análises estatísticas

A otimização de cultivo foi definida através de planejamento fatorial, utilizando o software Estatística® 9.1. Nos testes de sensibilidade e de toxicidade os valores de $LC(I)_{50}$, bem como os intervalos de segurança de 95% para esta variável foram estimados pelo programa Trimmed – Spearman – Karber (TSK).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes com diferentes fixadores em diferentes pHs

A Figura 11 mostra as densidades médias de *P. caudatum* (linhagem PC1) nos experimentos de pH ao longo do tempo obtidos pela contagem direta do material não fixado. Foi observado que os ciliados não sobreviveram ao pH 3 após as 72 horas de experimento, embora em um teste preliminar de menor duração (24h) alguns indivíduos tivessem sobrevivido. A maior média de densidade celular após 24h de cultivo foi obtida no pH 5 (28,67 células mL⁻¹), após 48h no pH 7 (94,67 células mL⁻¹) e após 72h no pH 11 (132,00 células mL⁻¹). Entre 0 e 48h houve aumento na densidade populacional de todos os cultivos, Com exceção do pH 3, entretanto, entre 48 e 72h houve decréscimo no número médio de indivíduos cultivados nos pHs 5, 7 e 9, sendo que apenas nos cultivos do pH 11 a média populacional aumentou (Figura 11). Tais resultados indicam que esse protozoário tem ampla faixa de tolerância de pH (do pH 5 a 11) e que, com o passar do tempo de cultivo, provavelmente o acúmulo de metabólitos nas culturas dos experimentos reduz o pH do meio favorecendo, a longo prazo, os cultivos iniciados com pH maior. A redução de pH ao longo do experimento foi checada e confirmada pela utilização de tiras de papel indicador de pH (Merck®) no final do experimento.

As Figuras 12 a 16 mostram as densidades médias obtidas de *P. caudatum* (linhagem PC1), após 72 horas de cultivo nos diferentes pHs (5,7,9 e 11), nas amostras vivas (controle) e nas fixadas pelos diferentes reagentes testados. Foi notado que, para as diferentes condições de pH, o fixador mais eficiente não foi

sempre o mesmo. Por exemplo, no pH 5, o bouin a 5% (Figura 12), foi o que preservou, em média, o maior número de células. No pH 7 o melhor foi o lugol ácido a 1% (Figura 13), seguido pelo Bouin a 5% (Figura 12). Já nos pHs 9 e 11 a solução saturada de cloreto de mercúrio a 2,5% (Figura 14) fixou a maior quantidade de organismos. Os outros dois fixadores testados, lugol alcalino a 0,1%/formaldeído a 2%/tiosulfato de sódio a 0,2% (Figura 15) e formaldeído a 2% (Figura 16), em média, preservaram menor número de indivíduos que os demais fixadores em todas as condições de pH.

O fato de encontrarmos maiores densidades nos experimentos preservados com alguns fixadores (HgCl_2 , Lugol Ácido e Bouin) em comparação aos controles mostra a eficiência desses métodos de fixação e as deficiências do método de contagem direta, provavelmente pelo fato dos protozoários serem sensíveis à manipulação da amostra. Sime-Ngando (1990), analisando amostras de água de um lago, também obteve densidades médias inferiores em contagens a fresco ($14,067 \pm 2,730 \text{ célulasL}^{-1}$) em comparação às densidades obtidas com material fixado com solução saturada de cloreto de mercúrio a 2,5% ($21,238 \pm 2,338 \text{ células.L}^{-1}$) e com lugol ácido a 1% ($17,345 \pm 3,963 \text{ célulasL}^{-1}$), sendo que com o formaldeído a 2% ($13,219 \pm \text{ célulasL}^{-1}$) a situação se inverteu, ou seja, a quantidade média de ciliados preservados por este fixador foi inferior à obtida sem fixação, sendo um resultado semelhante ao obtido no presente trabalho, como pode ser observado na Figura 16.

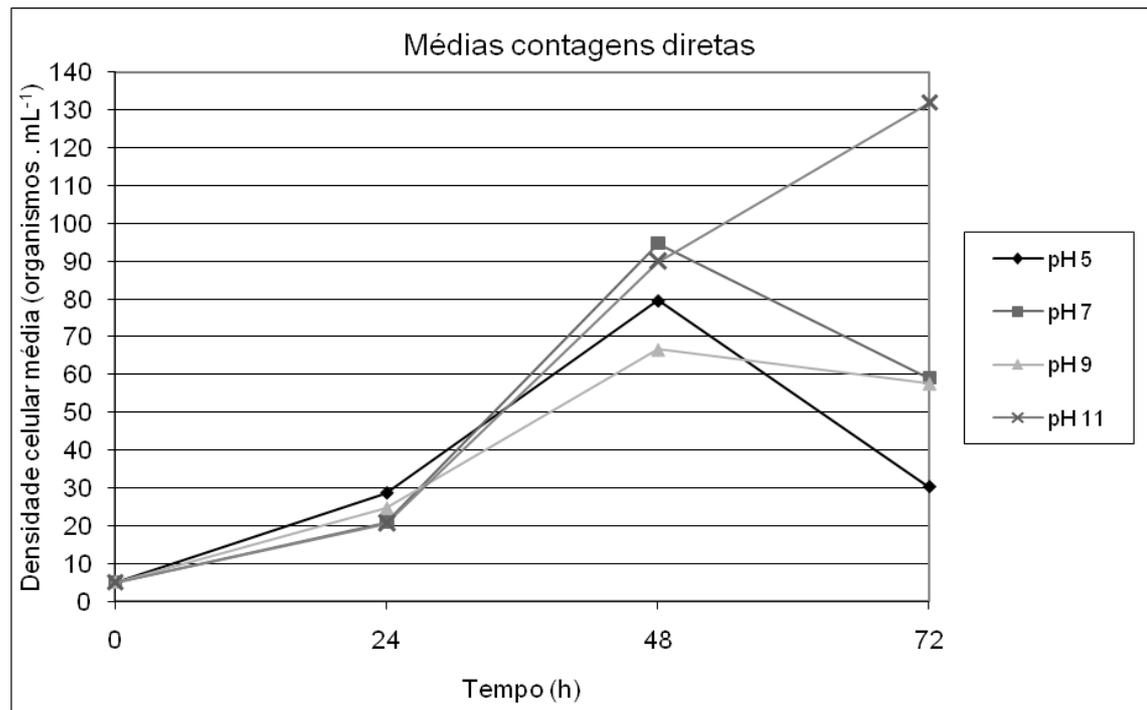


Figura 11 – Densidade celular média (organismos mL⁻¹) de *P. caudatum* (linhagem PC1) nos experimentos controle, realizados em várias condições de pH, sendo que no pH3 não houve sobrevivência, contados “a fresco”.

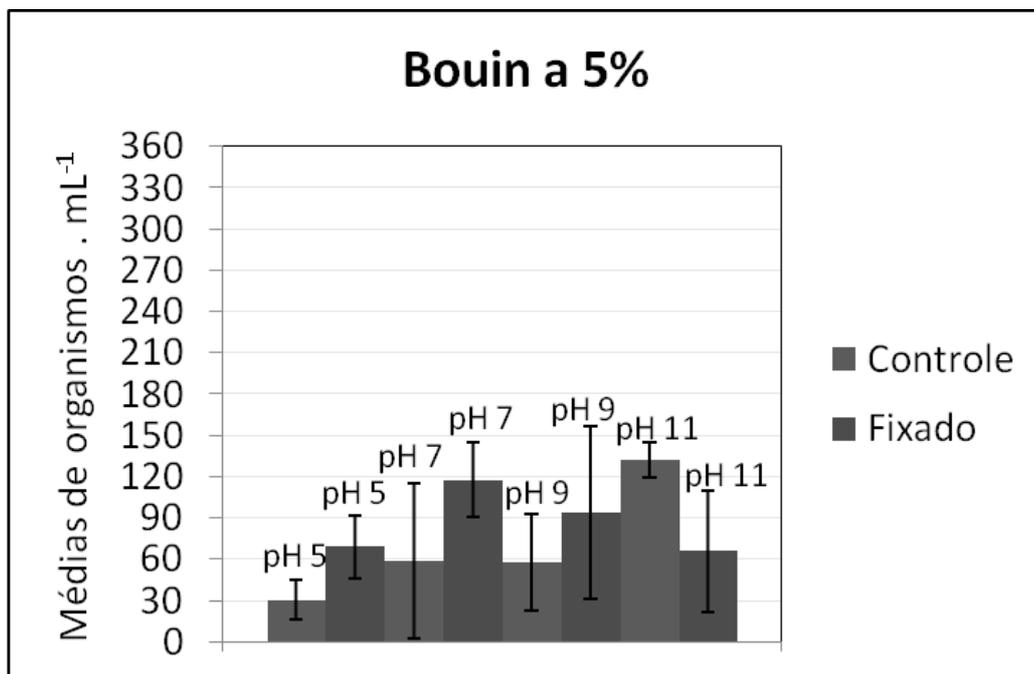


Figura 12 – Comparação da densidade média (organismos mL⁻¹) de *P. caudatum* (linhagem PC1) nas amostras vivas (controle) e nas fixadas com bouin a 5% após 72 horas de cultivo nos diferentes pH.

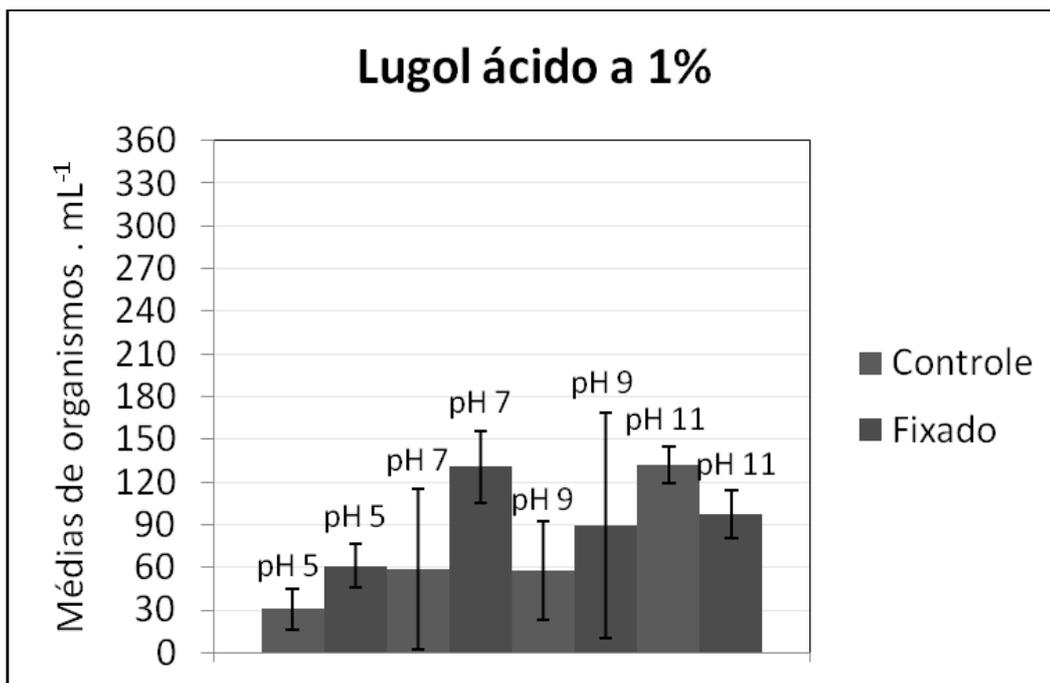


Figura 13 – Comparação da densidade média (organismos mL⁻¹) de *P. caudatum* (linhagem PC1) nas amostras vivas (controle) e nas fixadas com lugol ácido a 1% após 72 horas de cultivo nos diferentes pH.

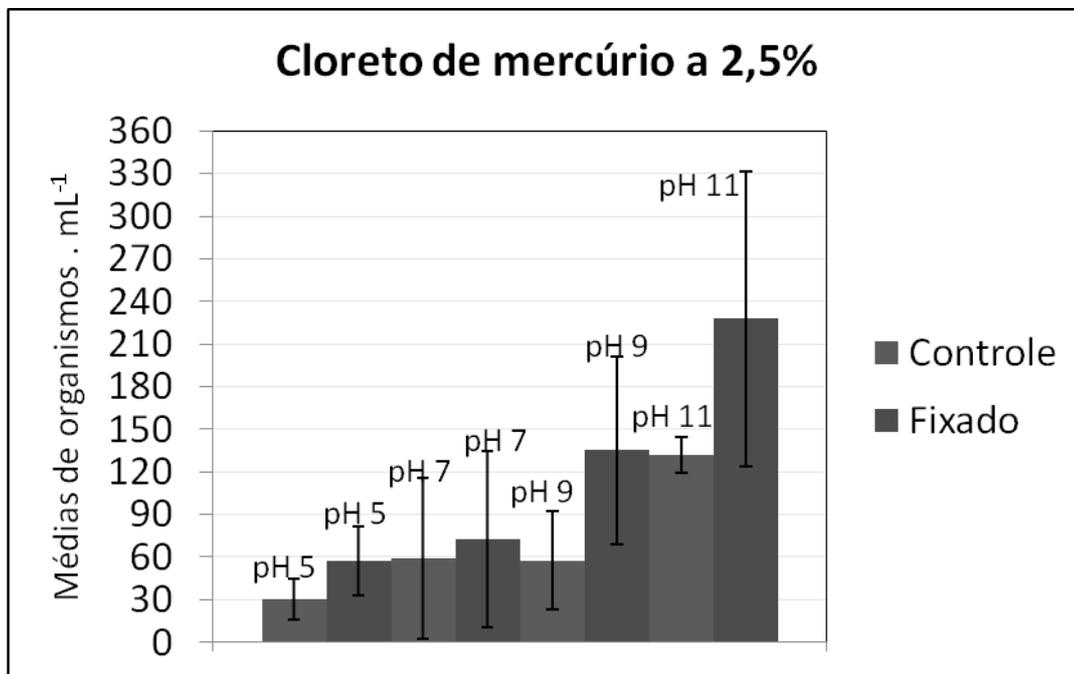


Figura 14 – Comparação da densidade média (organismos mL⁻¹) de *P. caudatum* (linhagem PC1) nas amostras vivas (controle) e nas fixadas com Hg Cl₂ a 2,5% após 72 horas de cultivo nos diferentes pH.

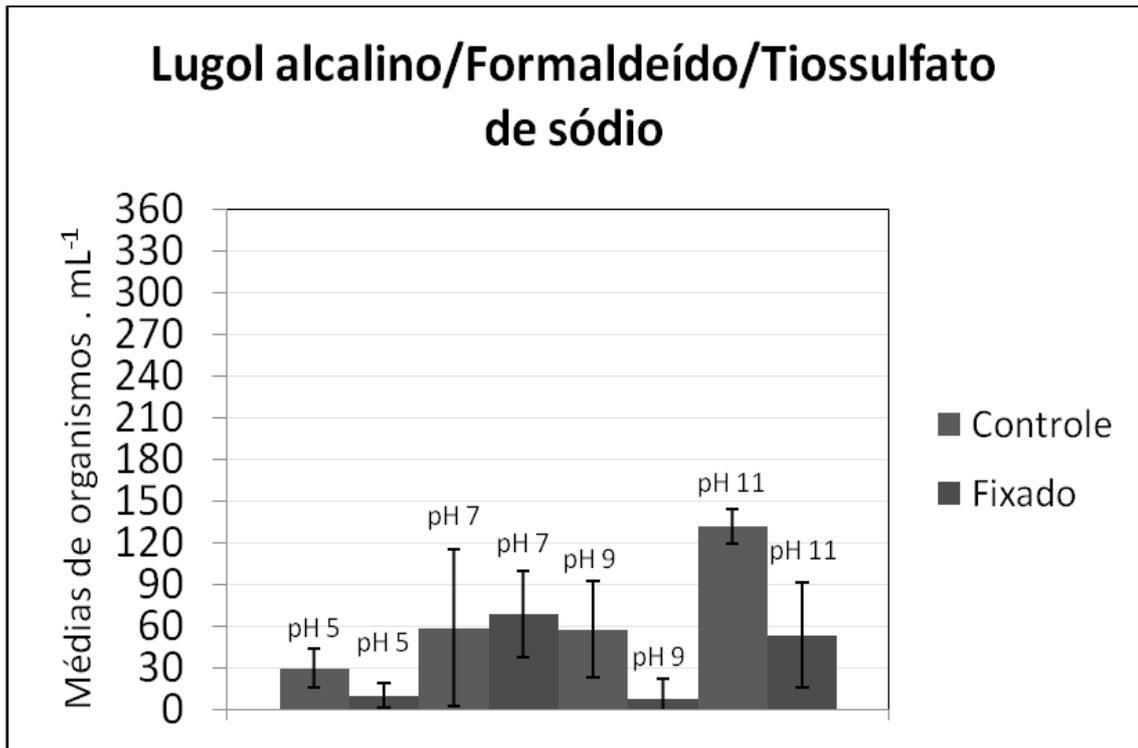


Figura 15 – Comparação da densidade média (organismos mL⁻¹) de *P. caudatum* (linhagem PC1) nas amostras vivas (controle) e nas fixadas com lugol alcalino a 0,1%/formaldeído a 2%/tiosulfato de sódio a 0,2% após 72 horas de cultivo nos diferentes pH.

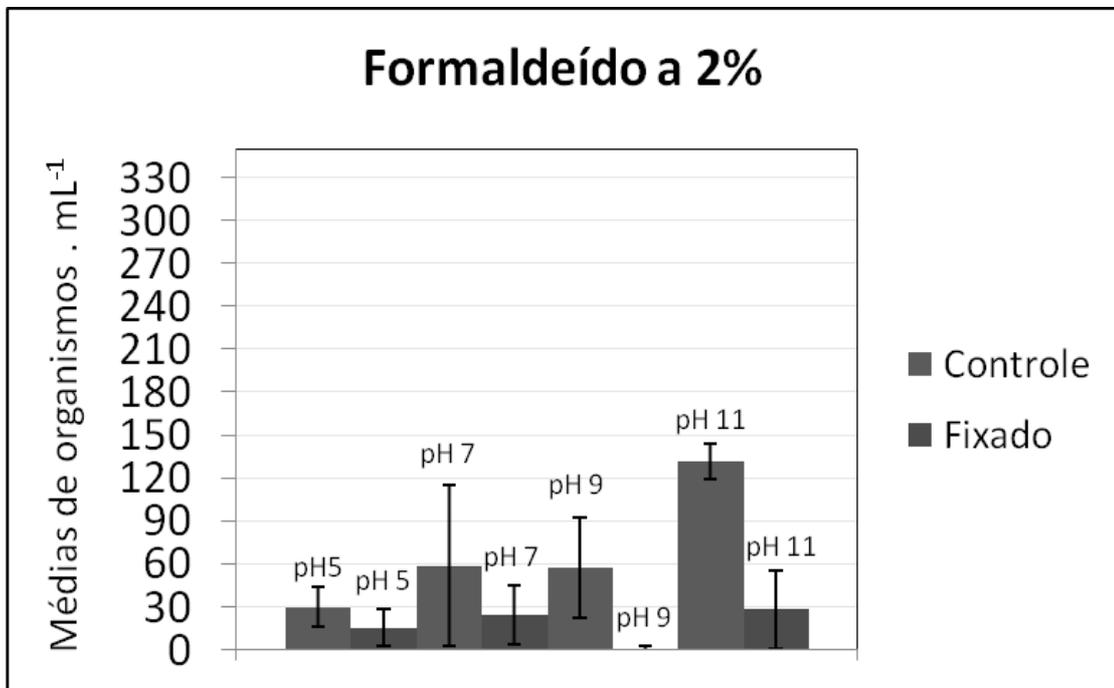


Figura 16 – Comparação da densidade média (organismos mL⁻¹) de *P. caudatum* (linhagem PC1) nas amostras vivas (controle) e nas fixadas com formaldeído a 2% após 72 horas de cultivo nos diferentes pH.

4.2 Experimentos de Otimização de cultivo

4.2.1 Determinação das melhores condições de pH e temperatura

➤ Linhagem de *Paramecium caudatum* da Represa do Monjolinho (PC1)

As Figuras 17 a 20 mostram as densidades médias de organismos fixados, da linhagem PC1, obtidas após 72h de cultivo em tubos de ensaio, em diferentes condições de temperatura e pH. À temperatura de 20°C, condição esta que apresentou maiores densidades de *P. caudatum* no pH 8 e menores densidades no pH 7 (Figura 17). À 25°C, em todos os pH testados, as médias em número de organismos, foram bem menores que as obtidas nas outras temperaturas e por isso, apenas neste gráfico, a escala precisou ser alterada, com intuito de favorecer a visualização dos detalhes (Figura 18). A 27,5°C, a condição que apresentou maiores densidades foi novamente o pH 8 e a condição com menores densidades foi no pH 6 (Figura 19). Finalmente a 30°C (Figura 20), a melhor condição, foi no pH 9 e a pior foi no pH 6.

Comparando todos os resultados obtidos nas quatro temperaturas (20, 25, 27,5 e 30°C) e quatro pH (6, 7, 8 e 9) testados, com relação à densidade de organismos para a linhagem PC 1, as melhores condições foram a 30°C no pH 9 (Figura 20), onde a média obtida foi de 70,44 indivíduos mL⁻¹ (Tabela 1) e a 27,5°C no pH 8 (Figura 17), cuja média foi de 63,56 indivíduos mL⁻¹ (Tabela 1). Ainda considerando as densidades obtidas, a pior condição foi a 25°C no pH 9 (Figura 18), pois a densidade média de indivíduos foi de apenas 4,33 indivíduos mL⁻¹ (Tabela 1).

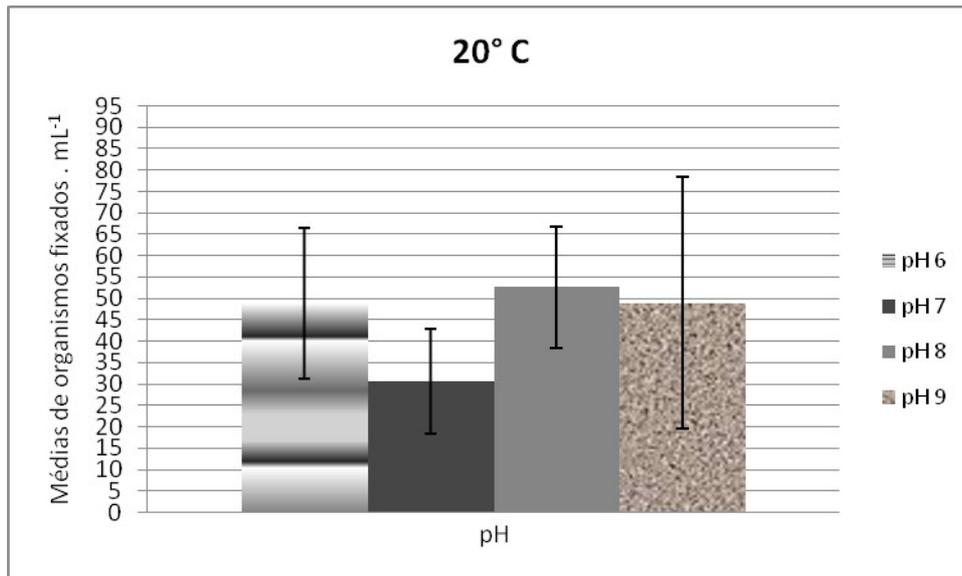


Figura 17 – Densidade média de indivíduos mL⁻¹ da linhagem de *P. caudatum* (PC1) nos pHs 6,7, 8 e 9 após 72h de cultivo a 20° C.

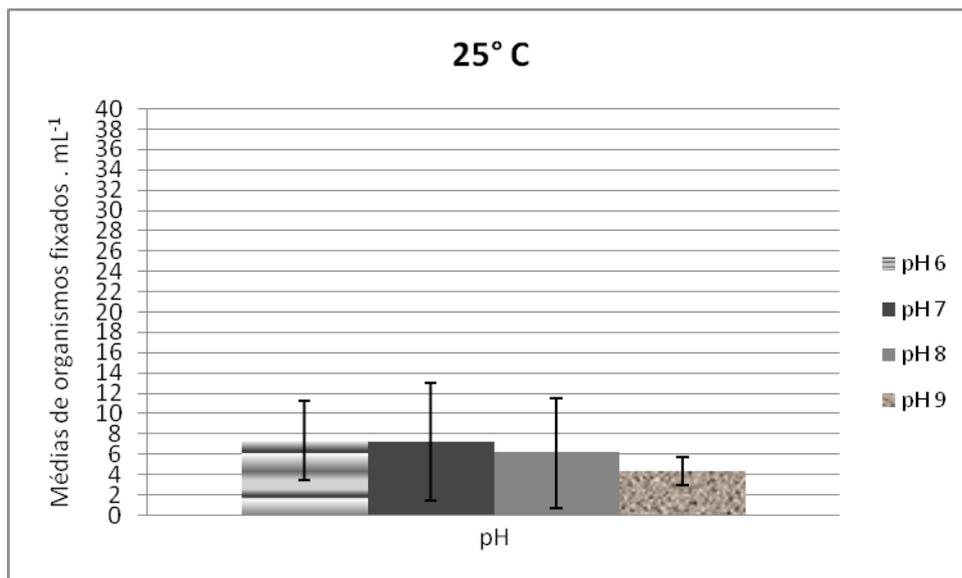


Figura 18 - Densidade média de indivíduos mL⁻¹ da linhagem de *P. caudatum* PC1 nos pHs 6,7, 8 e 9 após 72h de cultivo a 25°C

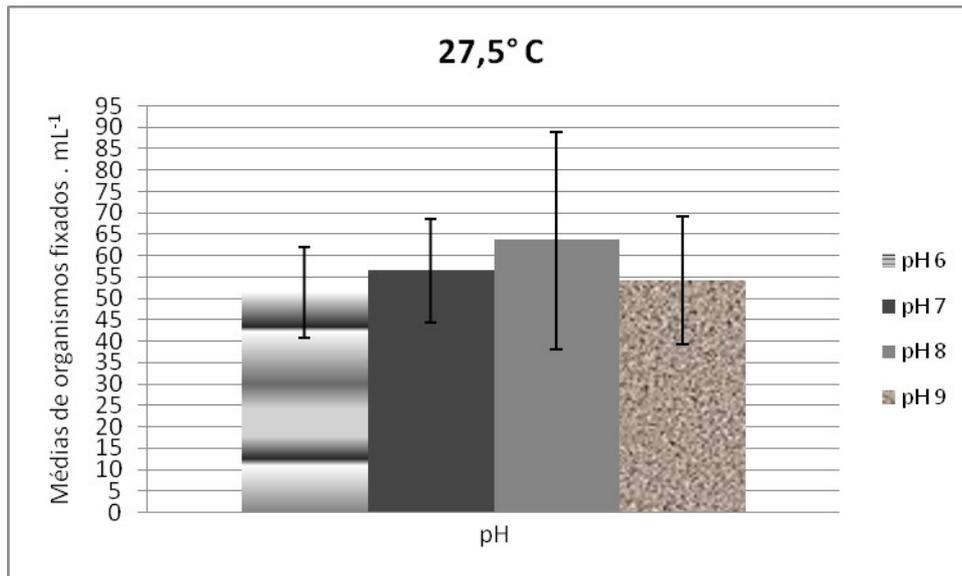


Figura 19 - Densidade média de indivíduos mL⁻¹ da linhagem de *P. caudatum* PC1 nos pHs 6,7, 8 e 9 após 72h de cultivo a 27,5°C

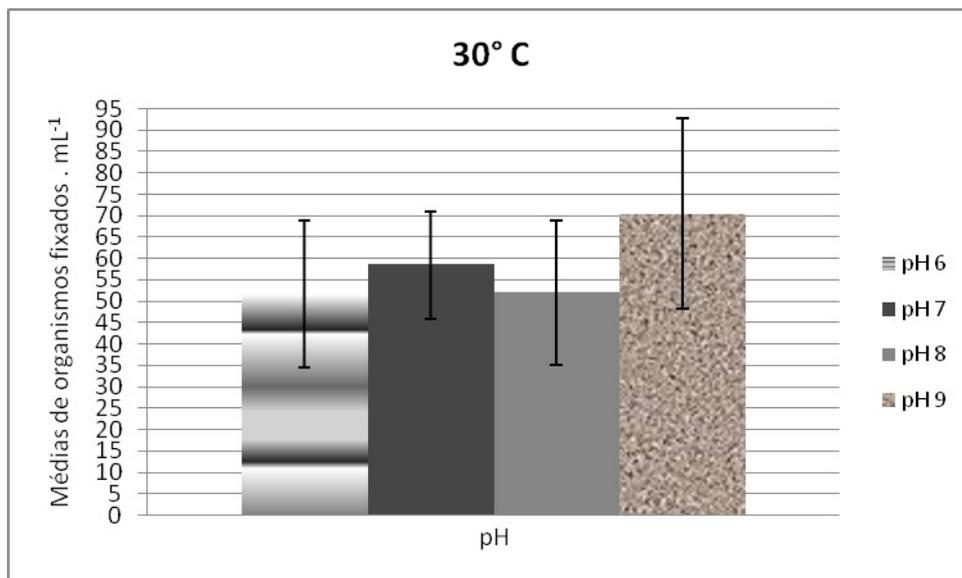


Figura 20 - Densidade média de indivíduos mL⁻¹ da linhagem de *P. caudatum* PC1 nos pHs 6,7, 8 e 9 após 72h de cultivo a 30°C

Tabela 1 - Densidade celular média (indivíduos mL⁻¹) de *P. caudatum* (linhagem PC1) após 72h de cultivo nos diferentes pHs e temperaturas testados

pH/Temperatura	<i>P.caudatum</i> (PC1) (média de indivíduos mL ⁻¹)			
	20°C	25°C	27,5°C	30°C
6	48,78	7,33	51,44	51,67
7	30,56	7,22	56,33	58,44
8	52,56	6,11	63,56	52,00
9	48,89	4,33	54,22	70,44

As Figuras 21 a 24 mostram os biovolumes celulares médios, calculados nas mesmas condições de pH e temperatura anteriormente citadas. A 20°C (Figura 21), 27,5°C (Figura 23) e a 30°C (Figura 24) os maiores biovolumes médios foram obtidos no pH 8, entretanto, a 25°C (Figura 22) os maiores biovolumes médios foram obtidos no pH 9. Apesar do pH 8 ser o melhor para as três temperaturas, a condição de cultivo com pH 9 a 25°C se destacou pelo fato de serem obtidos nessas condições o maior valor médio do biovolume celular que foi de 848634,3 μm³, conforme observado na Tabela 2. Em contrapartida, a pior condição, ou seja, onde foi obtido o menor biovolume celular médio da linhagem PC1, foi no pH 7 a 30° C (Figura 24), cujo valor foi de 543065,0 μm³.

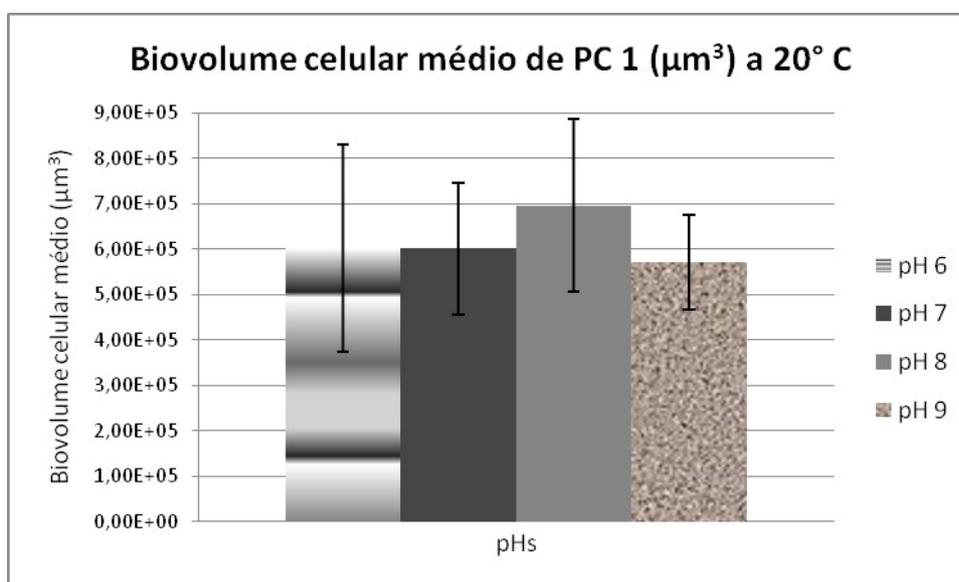


Figura 21 – Biovolume celular médio de *P. caudatum* após 72h de cultivo da linhagem PC1 a 20°C

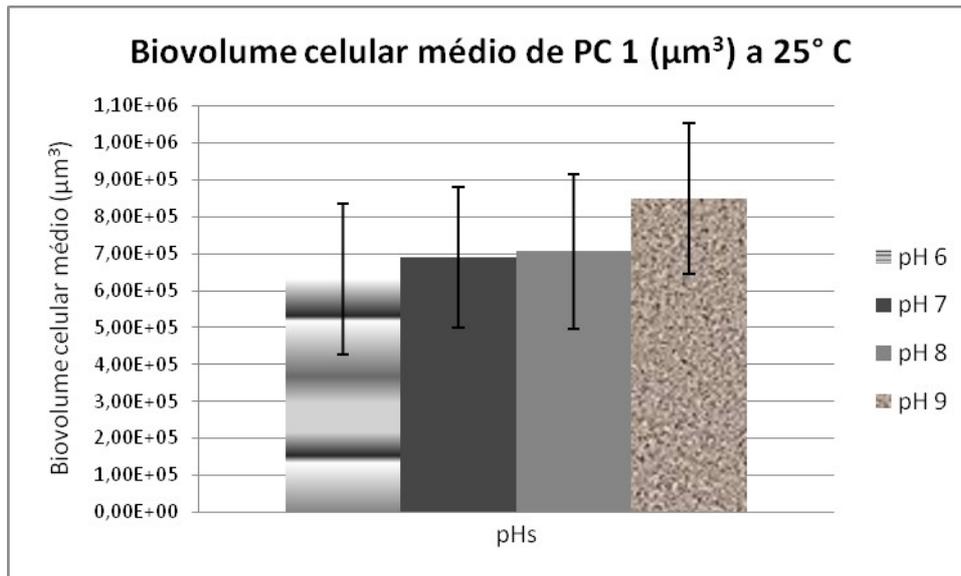


Figura 22 – Biovolume celular médio de *P. caudatum* após 72h de cultivo da linhagem PC1 a 25° C

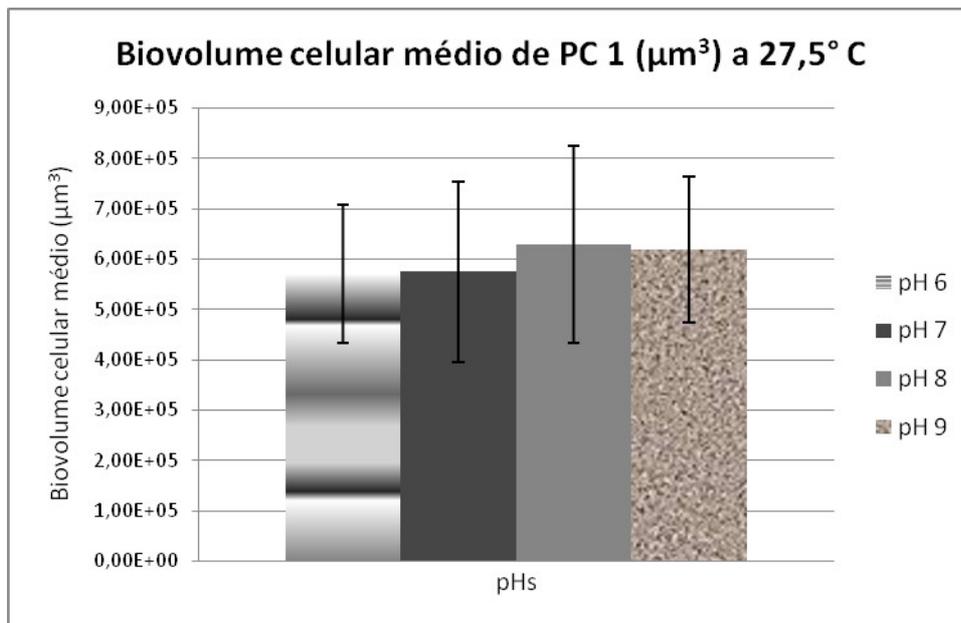


Figura 23 – Biovolume celular médio de *P. caudatum* após 72h de cultivo da linhagem PC1 a 27,5°C

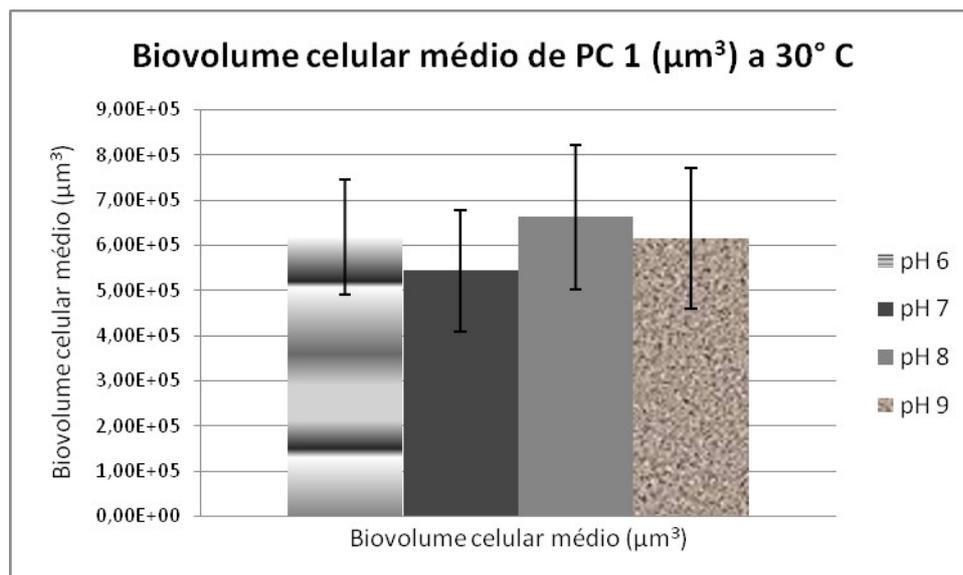


Figura 24 – Biovolume celular médio de *P. caudatum* após 72h de cultivo da linhagem PC1 a 30°C

Tabela 2 – Valores médios de biovolume celular (em µm³) de *P. caudatum* após 72h de cultivo da linhagem PC1

Biovolume celular médio de <i>P. caudatum</i> (PC1) (µm³)				
pH/Temperatura	20°C	25°C	27,5°C	30°C
6	6,02 . 10 ⁵	6,30 . 10 ⁵	5,70 . 10 ⁵	6,19 . 10 ⁵
7	6,01 . 10 ⁵	6,91 . 10 ⁵	5,74 . 10 ⁵	5,43 . 10 ⁵
8	6,96 . 10 ⁵	7,06 . 10 ⁵	6,28 . 10 ⁵	6,61 . 10 ⁵
9	5,71 . 10 ⁵	8,49 . 10 ⁵	6,18 . 10 ⁵	6,16 . 10 ⁵

Fazendo uma comparação entre os resultados obtidos, tanto para a densidade quanto para o biovolume celular, é possível notar que, na mesma condição de temperatura e pH, em que houve o menor crescimento populacional (25°C e pH 9, Figura 18) foi obtido o maior biovolume celular médio (Figura 22). Tal fato nos leva a crer que a energia obtida pelos organismos foi menos utilizada para realização da divisão celular e investida majoritariamente no crescimento e desenvolvimento das células, acarretando um maior volume corporal dos indivíduos que se encontravam nesta situação.

Nota-se também na comparação entre os resultados obtidos, tanto para densidade quanto para biovolume celular, que os melhores pHs para essa linhagem ficaram entre 8 e 9. Com relação à temperatura, as menores (20 e 25°C) forneceram os maiores biovolumes enquanto que nas temperaturas mais elevadas

(27,5 e 30°C) obtivemos as maiores densidades, mostrando uma estratégia de aumento da reprodução, devida à aceleração metabólica que ocorre em maiores temperaturas, enquanto que em baixas temperaturas o organismo parece favorecer o aumento do tamanho celular indicando uma estratégia visando a estocagem de energia para superar as condições mais estressantes causadas pelas temperaturas mais baixas.

Depois do anteriormente exposto fica claro então que as melhores condições de cultivo para a linhagem PC1 são pH 9 a 30°C. Apesar do valor obtido para biovolume celular médio (Tabela 3) para esta última condição (pH 9 a 30°C: biovolume médio de 615 750,00 μm^3) ser um pouco inferior (aproximadamente 2,05%) ao da segunda melhor condição em termos de densidade (pH 8 a 27,5°C: biovolume médio de 628 364,00 μm^3), o valor obtido para a densidade celular média (Tabela 2) a 30°C no pH 9 (70,44 indivíduos mL^{-1}) supera consideravelmente (aproximadamente em 10,8%) o valor obtido para esta mesma variável a 27,5°C no pH 8 (63,56 indivíduos mL^{-1}). ■

➤ **Linhagem de *Paramecium caudatum* da Lagoa do Óleo (PC 2)**

As Figuras 25 a 28 mostram as densidades médias de organismos fixados, da linhagem PC2, obtidas após cultivos, com duração de 72h, em diferentes condições de temperatura e pH. A 20°C, em todos os pHs testados, os números médios de organismos foram menores que os obtidos nas outras temperaturas. Nessa temperatura, apesar dos baixos valores encontrados, a melhor condição de pH foi 7 e a pior foi pH 8. O destaque ficou para os cultivos realizados a 27,5°C, pois, exceto no pH 6, foi a temperatura em que se obteve as maiores densidades encontradas (Figura 27), sendo que a escala do gráfico precisou ser ampliada em 4 vezes. A 30°C, a melhor condição de cultivo foi em pH 7, terceira melhor de todas, e a pior condição foi em pH 9.

Comparando todos os resultados de densidade obtidos nas quatro temperaturas (20, 25, 27,5 e 30°C) e quatro pHs (6, 7, 8 e 9) testados para a linhagem PC2, as melhores condições foram, indiscutivelmente, a 27,5°C no pH 7 (Figura 27), cuja média foi de 24,00 indivíduos mL^{-1} (Tabela 3). A pior condição foi a 20°C no pH 8 (Figura 25), pois a densidade média de indivíduos foi de apenas 0,75 indivíduos mL^{-1} (Tabela 3).

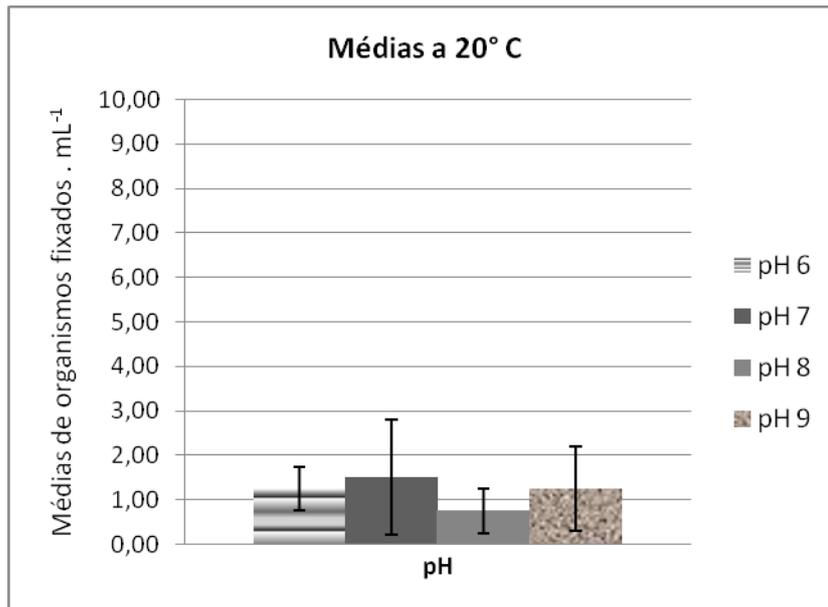


Figura 25 – Densidade média de organismos mL⁻¹ da linhagem PC2 nos pHs 6,7, 8 e 9 após 72h de cultivo a 20°C.

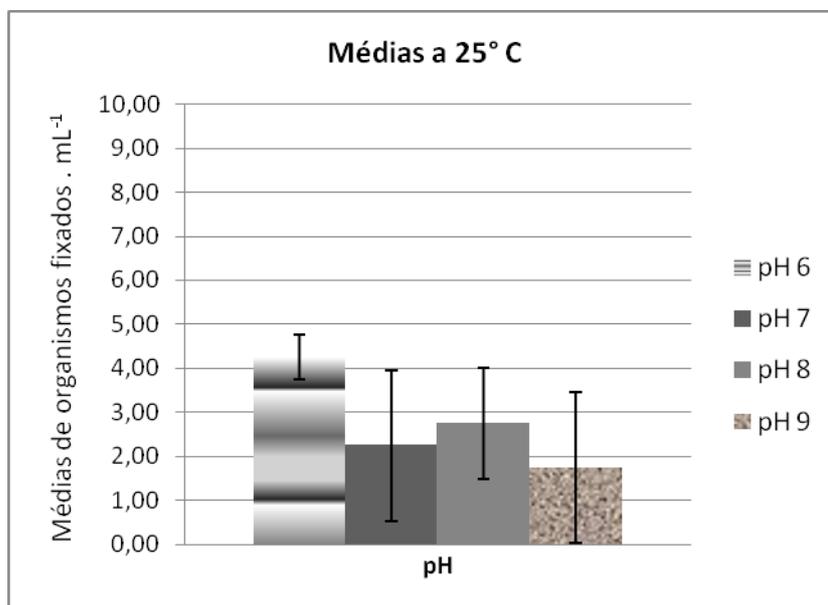


Figura 26 – Densidade média de organismos mL⁻¹ da linhagem PC2 nos pHs 6,7, 8 e 9 após 72h de cultivo a 25°C.

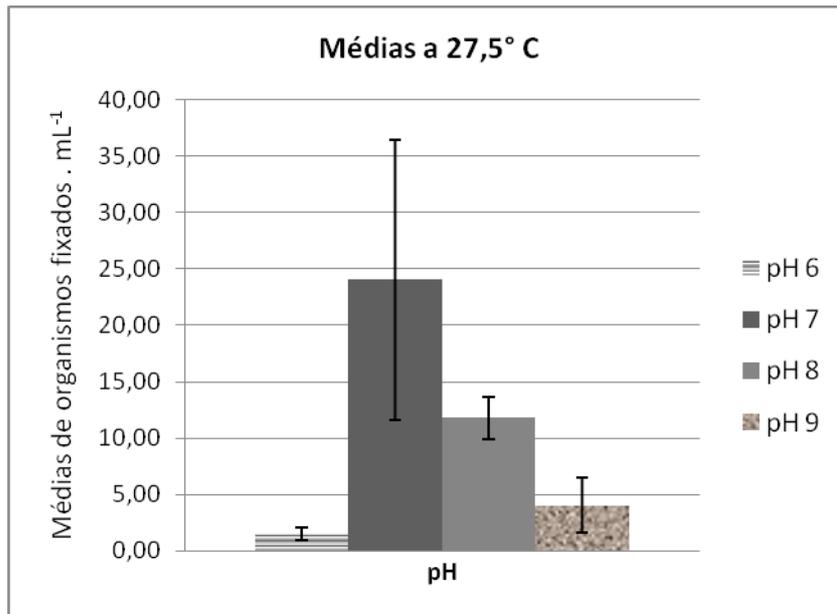


Figura 27 – Densidade média de organismos mL⁻¹ da linhagem PC2 nos pHs 6,7, 8 e 9 após 72h de cultivo a 27,5°C.

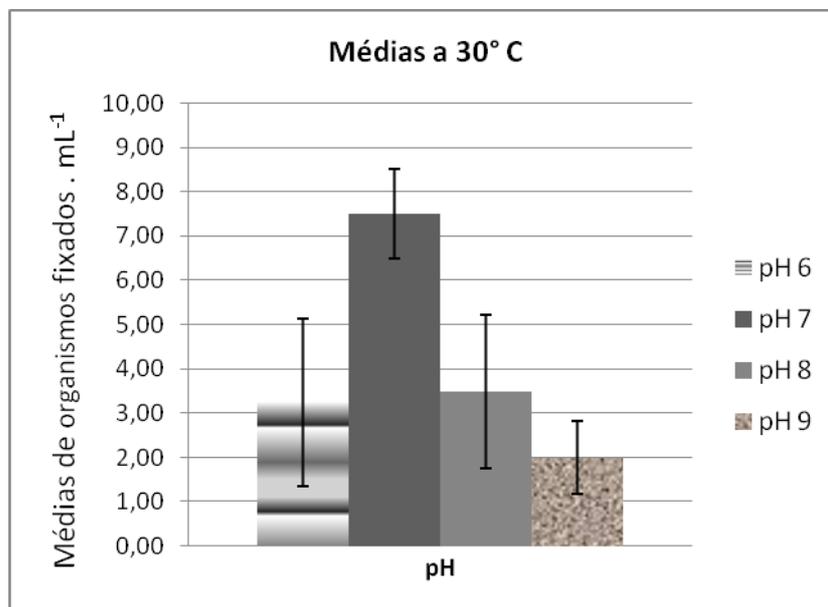


Figura 28 – Densidade média de organismos mL⁻¹ da linhagem PC2 nos pHs 6,7, 8 e 9 após 72h de cultivo a 30°C.

Tabela 3 - Densidade celular média (indivíduos mL⁻¹) de *P. caudatum* (linhagem PC2) após 72h de cultivo nos diferentes pHs e temperaturas testados

pH/Temperatura	<i>P.caudatum</i> (PC2) (indivíduos mL ⁻¹)			
	20°C	25°C	27,5°C	30°C
6	1,25	4,25	1,50	3,25
7	1,50	2,25	24,00	7,50
8	0,75	2,75	11,75	3,50
9	1,25	1,75	4,00	2,00

As Figuras 29 a 32 mostram os biovolumes celulares médios, calculados nas mesmas condições de pH e temperatura anteriormente citadas. A 20°C (Figura 29) e a 25°C (Figura 30) as maiores médias de biovolume foram obtidas no pH 8, já a 27,5°C (Figura 31) foi no pH7 e a 30°C (Figura 32) foi no pH 6. O maior destaque de todos ficou para o pH 8 a 20°C (Figura 29) com valor médio do biovolume celular de 79730,1 μm^3 (Tabela 4). Em contrapartida, a pior condição, ou seja, onde foi obtido o menor biovolume celular médio, da linhagem PC2, foi no pH 6 a 27,5°C (Figura 31), cujo valor foi de 480 045,20 μm^3 (Tabela 4).

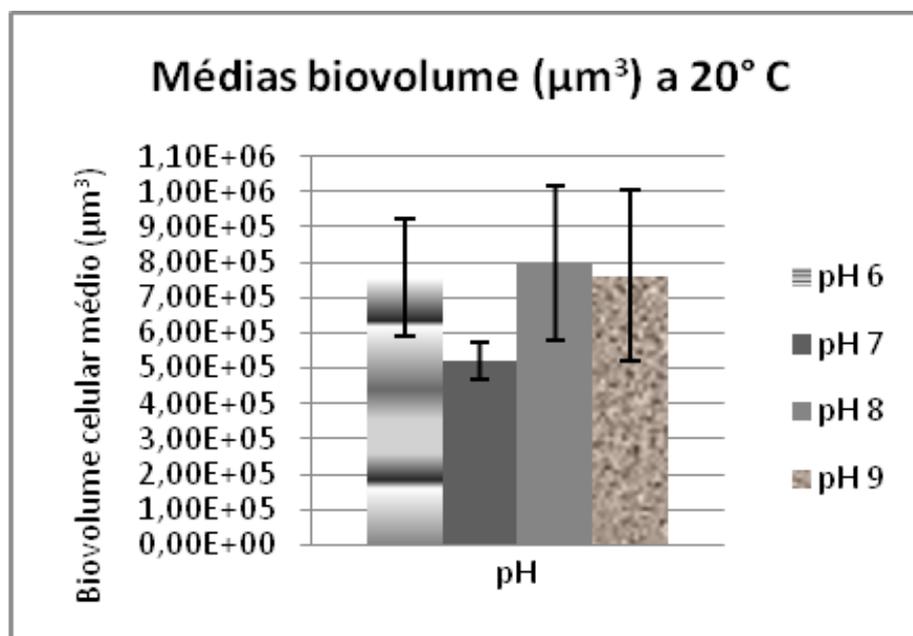


Figura 29 – Biovolume celular médio após 72h de cultivo da linhagem PC2 a 20°C.

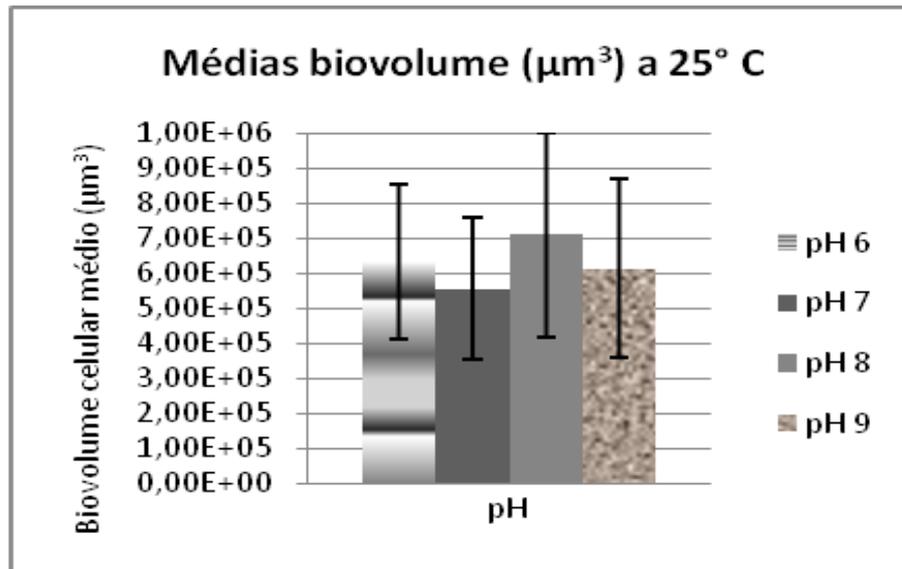


Figura 30 – Biovolume celular médio após 72h de cultivo da linhagem PC2 a 25°C.

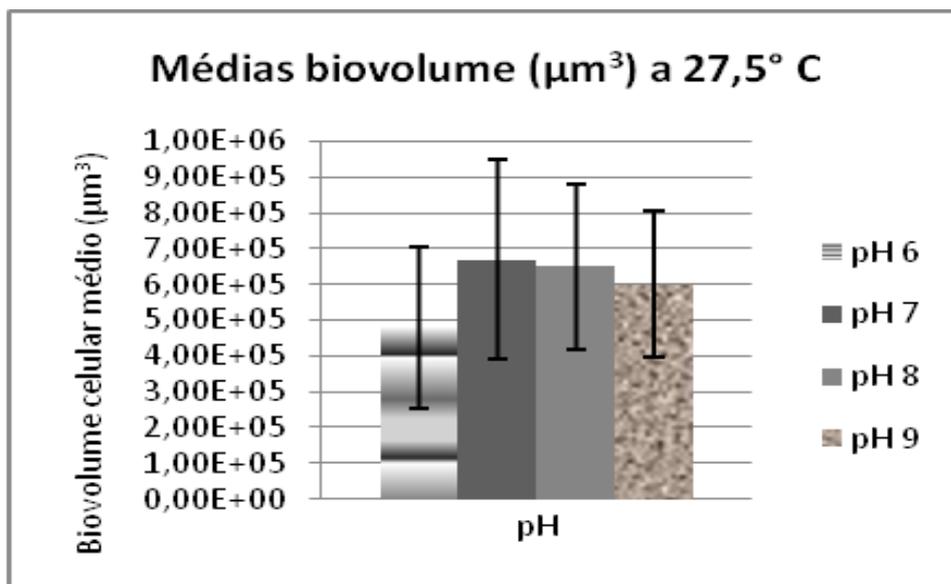


Figura 31 – Biovolume celular médio após 72h de cultivo da linhagem PC2 a 27,5°C.

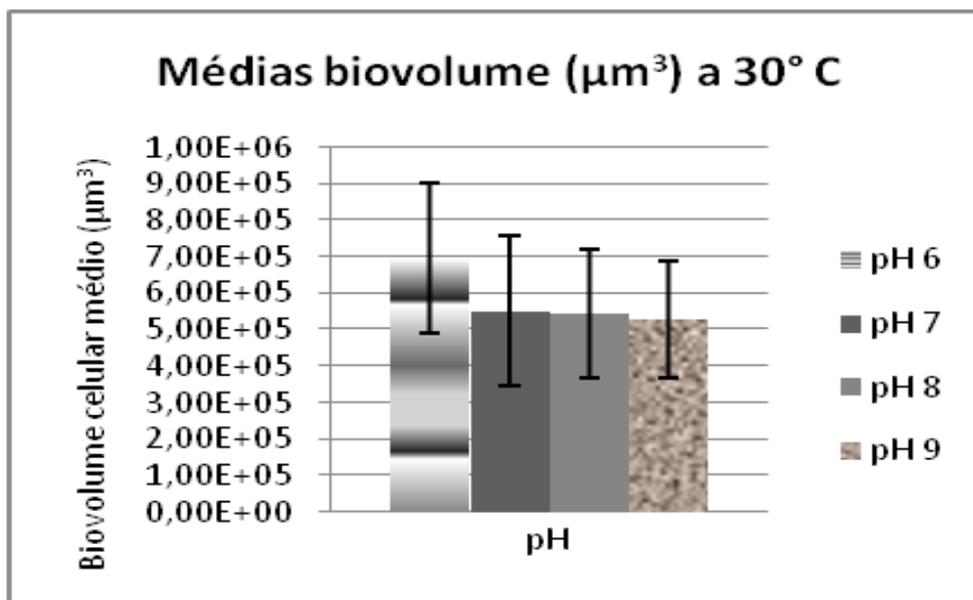


Figura 32 – Biovolume celular médio após 72h de cultivo da linhagem PC2 a 30°C

Tabela 4 – Valores médios de biovolume celular (µm³) de *P. caudatum* após 72h de cultivo da linhagem PC2

pH/Temperatura	Biovolume celular médio de <i>P.caudatum</i> (PC2) (µm³)			
	20°C	25°C	27,5°C	30°C
6	7,56 . 10 ⁵	6,33 . 10 ⁵	4,80 . 10 ⁵	6,96 . 10 ⁵
7	5,22 . 10 ⁵	5,57 . 10 ⁵	6,68 . 10 ⁵	5,53 . 10 ⁵
8	7,97 . 10 ⁵	7,10 . 10 ⁵	6,49 . 10 ⁵	5,45 . 10 ⁵
9	7,61 . 10 ⁵	6,14 . 10 ⁵	6,00 . 10 ⁵	5,28 . 10 ⁵

Considerando os dados de densidade e biovolume encontrados para PC2 nas diferentes condições, as mais favoráveis ao cultivo dessa linhagem foram em pH7 a 27,5° C que foram próximas às encontradas por Rao *et al.* (2006): pH de 7,5 a 8 e temperatura de 25± 2°C. Fazendo uma comparação entre os resultados obtidos, tanto para densidade quanto para biovolume celular, foi possível notar que na mesma condição de temperatura (20° C) na qual ocorreram as menores densidades populacionais em todos os pHs testados (Figura 25) foram obtidos também os maiores biovolumes celulares médios, com exceção do pH 7 (Figura 29). Isso por que, provavelmente a energia obtida pelos organismos foi utilizada em menor escala para realização da divisão celular e foi majoritariamente investida em crescimento e desenvolvimento celular, acarretando um maior volume dos indivíduos que se encontravam nestas situações.

Nota-se também na comparação entre os resultados obtidos, que para densidade o melhor pH foi o 7 e para biovolume celular, o melhor pH foi o 8. Com

relação à temperatura, foram notados padrões semelhantes aos ocorridos em PC1, mas de forma não tão intensa. A menor temperatura (20°C) forneceu os maiores biovolumes enquanto que nas temperaturas mais altas (25°C, 27,5°C e 30°C) obtivemos as maiores densidades, mostrando uma estratégia de aumento da reprodução em maiores temperaturas, enquanto que em baixas temperaturas o organismo parece favorecer o aumento do tamanho celular indicando estocagem de energia para superar as condições menos favoráveis causadas pelas temperaturas mais baixas. De acordo com Pelczar (1997), para microrganismos, em temperaturas mais favoráveis para o crescimento, o número de divisões celulares por hora geralmente dobra para cada aumento de temperatura de 10°C e esse comportamento é similar ao da maioria das reações catalisadas por enzimas. No presente experimento foi possível observar, para ambas as linhagens, que em condições de temperatura mais baixas elas diminuíram a frequência das divisões celulares e investiram sua energia no crescimento e desenvolvimento dos indivíduos, resultando em biovolumes maiores.

Depois do previamente exposto fica claro então que as melhores condições de cultivo para a linhagem PC2 são pH 7 a 27,5°C. Apesar do valor do biovolume celular médio (Tabela 4) nessa condição (668 151,24 μm^3) ser apenas um pouco superior (aproximadamente 2,89%) ao encontrado em pH 8 a 27,5°C (649 375,75 μm^3), segunda melhor condição para densidade, o valor da densidade celular média (Tabela 3) a 27,5°C no pH 7 (24,00 indivíduos mL^{-1}) supera consideravelmente (204,25%) o valor obtido no pH 8 (11,75 indivíduos mL^{-1} para ambos os pHs).

Comparando as melhores condições de cultivo para as duas linhagens de *P. caudatum* avaliadas (PC1 e PC2), foi possível observar que, em termos de densidade celular, a PC1 (70,44 indivíduos mL^{-1}) supera em mais de 2,9 vezes a linhagem PC2 (24,00 indivíduos mL^{-1}). Por outro lado, em relação ao biovolume celular médio, a linhagem PC1 (615 750,00 μm^3) foi aproximadamente 8,51% menor que PC2 (668 151,24 μm^3), o que nos leva a crer que estas linhagens tenham estratégias diferentes em termos de reprodução, ou seja, PC1 investe mais energia em multiplicação e PC2 em desenvolvimento celular.

4.2.2 Avaliação da influência do tamanho do frasco de cultivo e das condições de iluminação

➤ **Linhagem de *Paramecium caudatum* da Represa do Monjolinho (PC1)**

A condição escolhida para avaliação da influência do tamanho do frasco de cultivo e do fotoperíodo foi de 30°C no pH 9, pois conforme exposto anteriormente foi a melhor para esta linhagem com relação a essas variáveis.

Com os frascos de cultivo maiores (frascos de diluição de leite de 140 mL de volume) a melhor condição obtida, para a linhagem PC1, foi sem iluminação (densidade média de 67,83 indivíduos mL⁻¹), conforme apresentado na Figura 33. Em comparação aos cultivos realizados no experimento anterior, que foram feitos em tubos de ensaio, esta densidade celular média obtida foi praticamente a mesma (67,83 contra 70,44 indivíduos mL⁻¹) e que aumento da escala de cultivo não fez qualquer diferença no resultado final se considerarmos os desvios padrão (Figura 33).

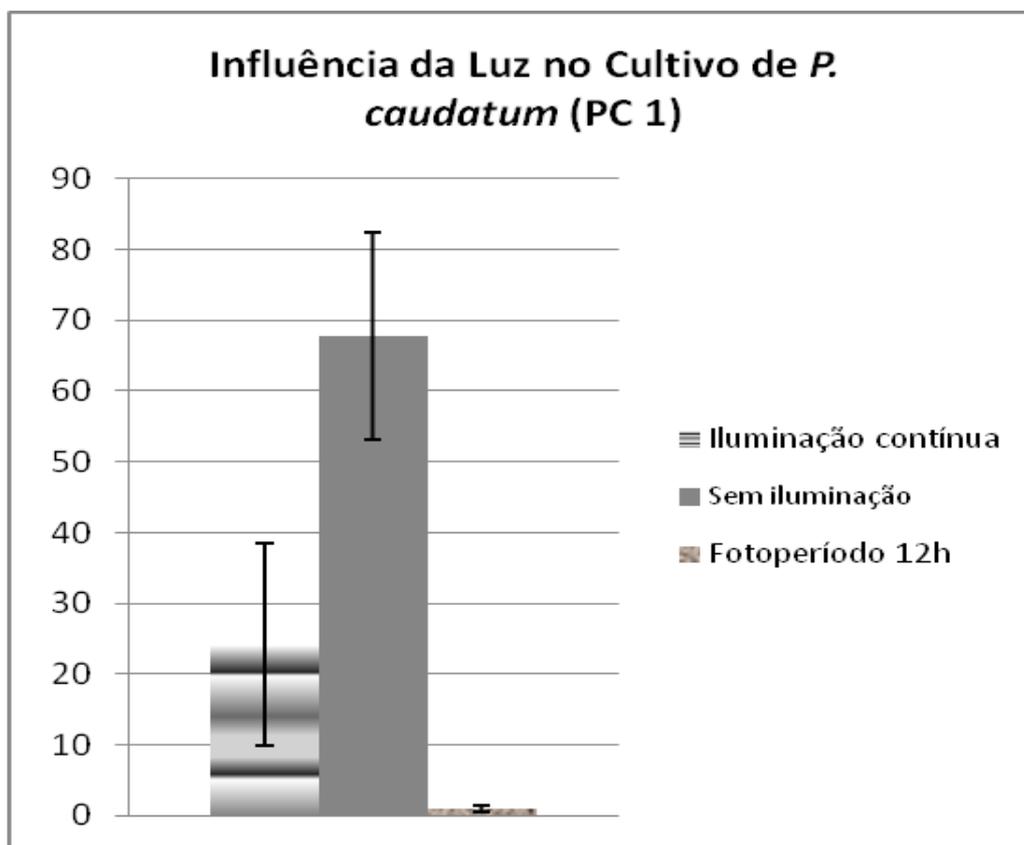


Figura 33 – Densidade média de protozoários (*P. caudatum* – linhagem PC 1 – organismos mL⁻¹) em diferentes condições de iluminação

➤ **Linhagem de *Paramecium caudatum* da Lagoa do Óleo (PC 2)**

A condição escolhida para avaliação da influência do tamanho do frasco de cultivo e do fotoperíodo foi de 27,5°C no pH 7, pois conforme exposto anteriormente foi a melhor para esta linhagem com relação a essas variáveis.

Com os recipientes de cultivo maiores (frascos de 140 mL de volume) a melhor condição obtida, para a linhagem PC2, foi sem iluminação (densidade média de 20,83 indivíduos mL⁻¹), conforme apresentado na Figura 34. Em comparação aos cultivos realizados no experimento anterior, que foram feitos em tubos de ensaio, esta densidade celular média obtida foi praticamente a mesma (20,83 contra 24,00 indivíduos mL⁻¹) e o aumento da escala de cultivo não fez qualquer diferença no resultado final se considerarmos os desvios padrão.

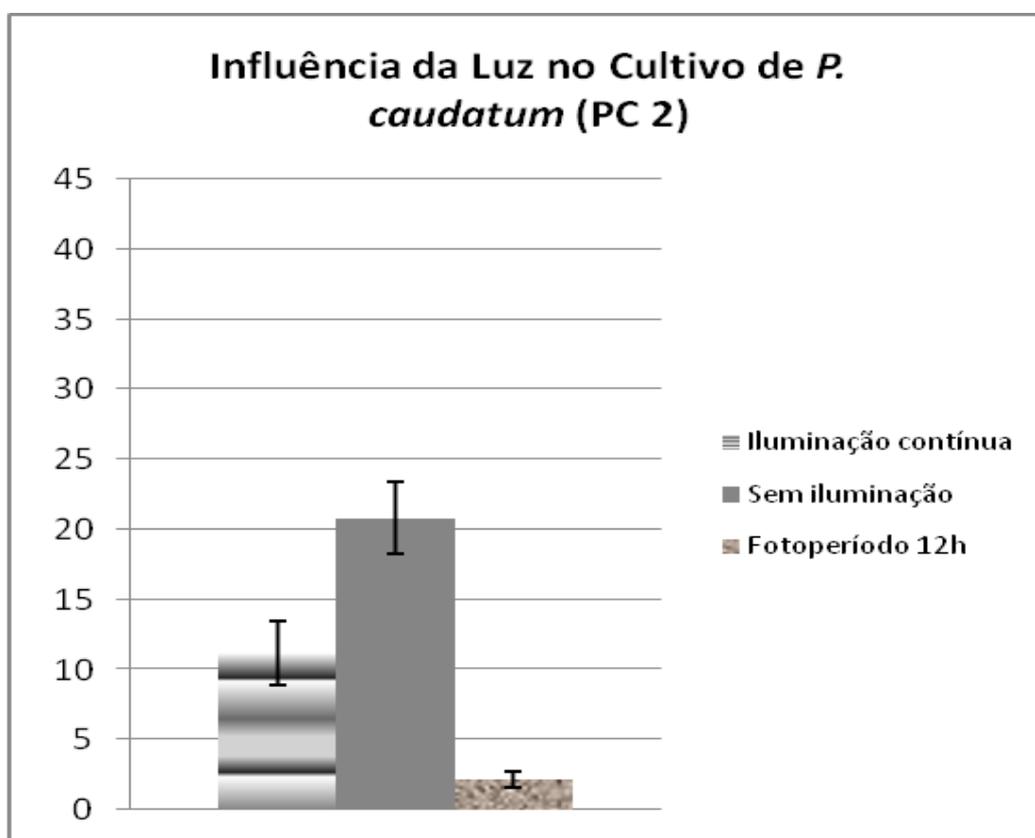


Figura 34 – Densidade média de protozoários (*P. caudatum* – linhagem PC 2 – organismos mL⁻¹) em diferentes condições de iluminação

4.2.3 Avaliação dos efeitos da agitação

Este experimento foi realizado em condições de pH e temperatura idênticas às do experimento anterior para ambas as linhagens, porém somente no escuro, sendo que três réplicas para cada linhagem foram submetidas à agitação e três foram incubadas estaticamente. Para PC1 a média no cultivo com agitação (Figura 35) foi de 1,16 indivíduos mL⁻¹ e sem agitação 10,33 indivíduos mL⁻¹, ou seja, quase 9 vezes superior.

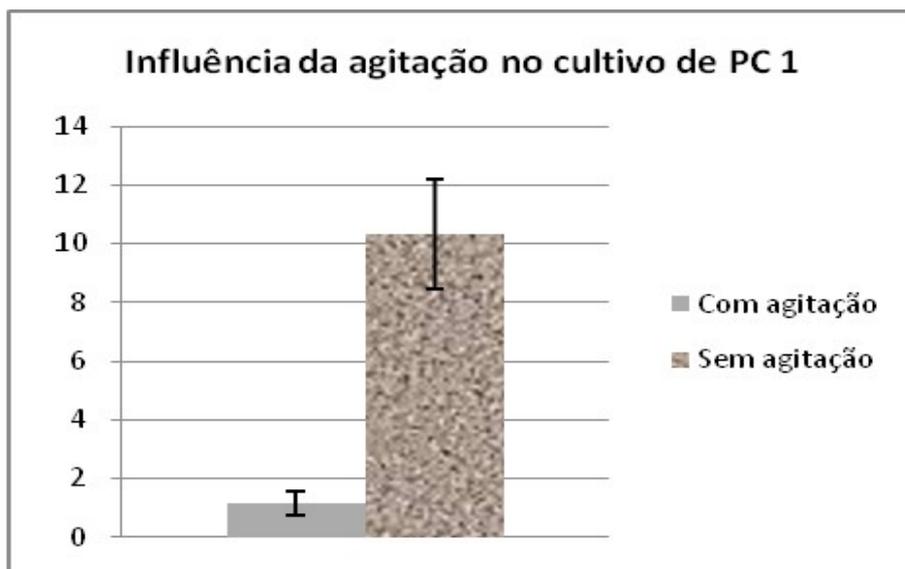


Figura 35 - Densidade média de protozoários (*P. caudatum* – linhagem PC1 – em organismos mL⁻¹) nos cultivos com e sem agitação.

Para PC2 (Figura 36) as médias foram bem mais próximas: 51,5 indivíduos mL⁻¹ com agitação e 60,75 indivíduos mL⁻¹ sem agitação, apenas aproximadamente 18% maior.

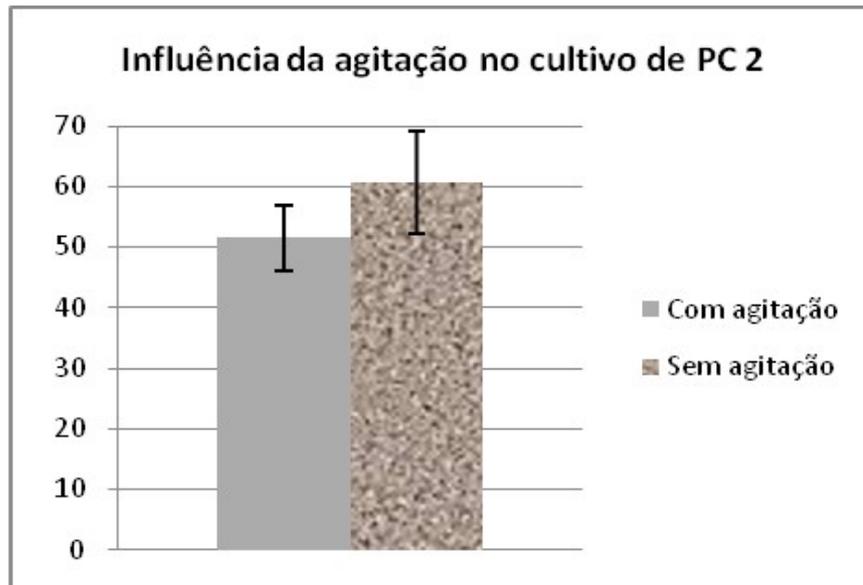


Figura 36 - Densidade média de protozoários (*P. caudatum* – linhagem PC2 – em organismos mL⁻¹) nos cultivos com e sem agitação.

Conforme pôde ser observado, para ambas as linhagens, a agitação é uma condição que prejudica os cultivos, em especial para a PC1.

4.3 Curvas de crescimento

A Figura 37 mostra a curva de crescimento da linhagem PC1, que foi realizada em garrafas de diluição de leite, a 30°C, em pH 9, no escuro durante todo o período e sem agitação, seguindo a metodologia descrita anteriormente, e que foi plotada a partir da média obtida entre as três réplicas. Já a Figura 38 mostra a curva de crescimento da linhagem PC2, que também foi preparada em garrafas de diluição de leite, porém em pH 7 a 27,5°C, no escuro durante todo o período e sem agitação, também seguindo a metodologia descrita anteriormente, também sendo descrita a partir da média obtida entre as três réplicas.

A linhagem PC2 (Figura 38) apresentou uma fase de crescimento logarítmico um pouco mais tardia, porém mais duradoura, que a linhagem PC1 (Figura 37), atingindo densidades médias superiores às obtidas por PC1 a partir de 72h de cultivo, momento no qual PC1 já se encontrava, precocemente, em fase estacionária. Por outro lado, a fase estaconária em PC2 somente pôde ser claramente observada com 84h, momento em que o cultivo de PC1 já se encontrava em declínio. O declínio de PC2 só foi evidente após passadas 96h do início do experimento.

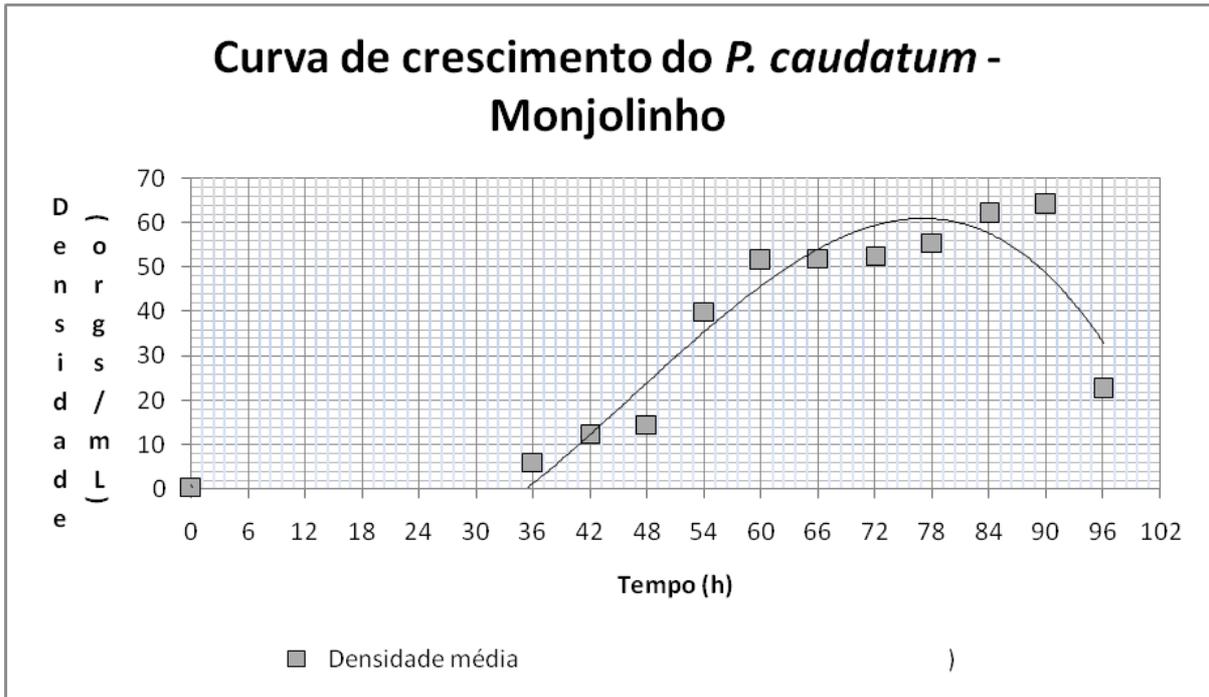


Figura 37 – Densidade média mL⁻¹ de 6 em 6h da linhagem PC1 cultivada a 30°C no pH 9 por 96h.

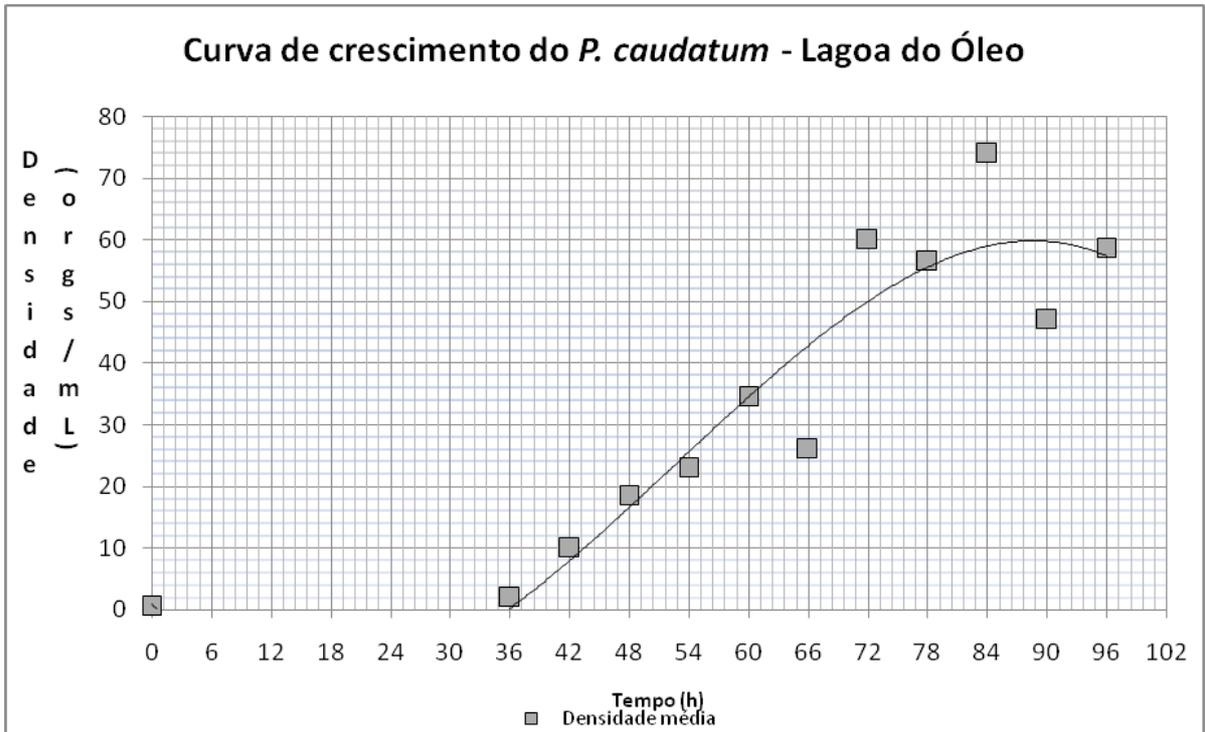


Figura 38 - Densidade média mL⁻¹ de 6 em 6h da linhagem PC2 cultivada a 27,5°C no pH 7 por 96h.

O tempo de geração para as duas linhagens foi obtido através das fórmulas descritas anteriormente (Pelczar Jr. *et al.*, 1997), sendo que o valor obtido foi

calculado pela média do número de organismos entre as três réplicas de cada linhagem no tempo em que a densidade foi máxima.

Como pode ser observado, na curva de crescimento da linhagem PC1 (Figura 37), a fase lag é menos perceptível do que para PC2. A fase logarítmica foi iniciada antes das primeiras 36h de incubação e terminou próximo de 72h, quando se iniciou a fase estacionária, sendo que o declínio no crescimento da cultura foi observado entre 84 e 90h. Na Figura 38, a fase lag da curva de crescimento da linhagem PC2 terminou pouco antes de 36h, pois a densidade neste ponto ainda era baixa, quando teve início a fase exponencial cujo auge ocorreu em torno de 84h. A partir daí ocorreu uma curta fase estacionária que só se encerrou próxima das 96h.

Portanto, para a linhagem PC1, a densidade máxima total nos frascos foi de 6528 organismos, em média, após 90h, o valor aproximado de gerações (n) foi de 13,391 e tempo de geração (g) de aproximadamente 6,7 horas. Para a linhagem PC2, a máxima densidade total em média foi de 7 548 organismos no tempo de 84h, obtendo-se o valor aproximado de 11,019 gerações (n) e o tempo de geração (g) de aproximadamente 7,6 horas. Estes valores são inferiores mas próximos ao obtido por Rao (1967), que foi de 8h, a 27°C, embora no meio de cultura esse autor usou infusão de alface no lugar do arroz com casca, com a mesma bactéria (*E. aerogenes*). Em comparação com a linhagem PC1, a PC2 teve uma reprodução um pouco mais lenta, entretanto sua densidade máxima superou a de PC1 em mais de mil organismos mL⁻¹, o que indica que o início mais tardio da reprodução pode ser compensado pela maior eficiência desta.

4.4 Testes de sensibilidade de *Paramecium caudatum* ao NaCl

Os testes de sensibilidade realizados com NaCl mostraram que para PC1 as médias da NOEC(I), LOEC(I), LC(I)₅₀ (Figura 39) e LC(I)₁₀₀ foram, respectivamente 2,250, 2,500, 2,953 e 3,375 gL⁻¹, sendo que para PC2 estes valores foram respectivamente de 2,625, 2,875, 3,455 (Figura 40) e 3,750 gL⁻¹.

As faixas de sensibilidade, Figuras 39 e 40, definidas pelas médias, calculadas no programa TSK, após dez repetições destes testes, serviram para avaliar se os lotes de protozoários, das duas linhagens, estavam dentro dos parâmetros estipulados, para validação dos testes de toxicidade, que foram realizados simultaneamente, ou seja, quando os organismos se apresentavam muito ou pouco sensíveis ao NaCl os testes com fipronil eram desconsiderados. No caso de PC1 a faixa de sensibilidade ficou entre 2,765 e 3,148 gL⁻¹ e para PC2 estes valores oscilaram entre 3,268 e 3,650 gL⁻¹ de NaCl. Ohashi (2010) também determinou uma faixa de sensibilidade da linhagem PC1, ao NaCl, seguindo a mesma metodologia (ABNT 2004; 2005), sendo que os valores obtidos variaram entre 3,0 e 3,7 gL⁻¹. As diferenças entre estes resultados obtidos para a mesma linhagem, em épocas diferentes, reforçam a importância da constante avaliação da sensibilidade dos organismos paralelamente aos testes de toxicidade.

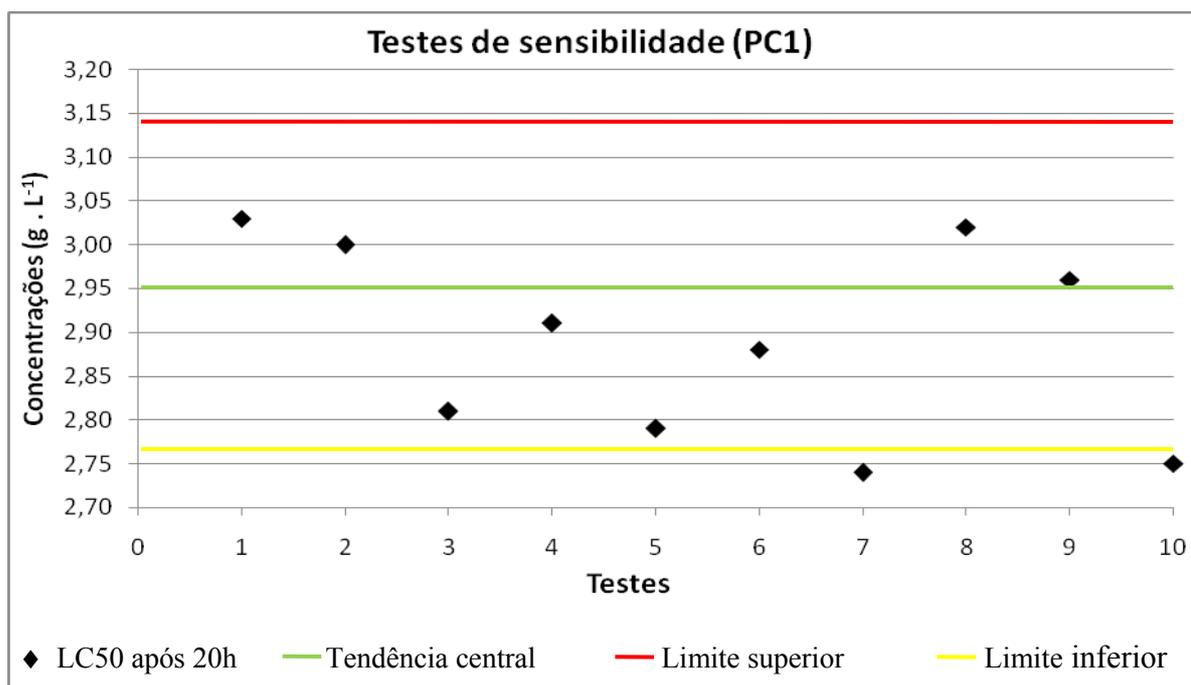


Figura 39 – Faixa de sensibilidade da linhagem PC1 ao NaCl após 20h de exposição.

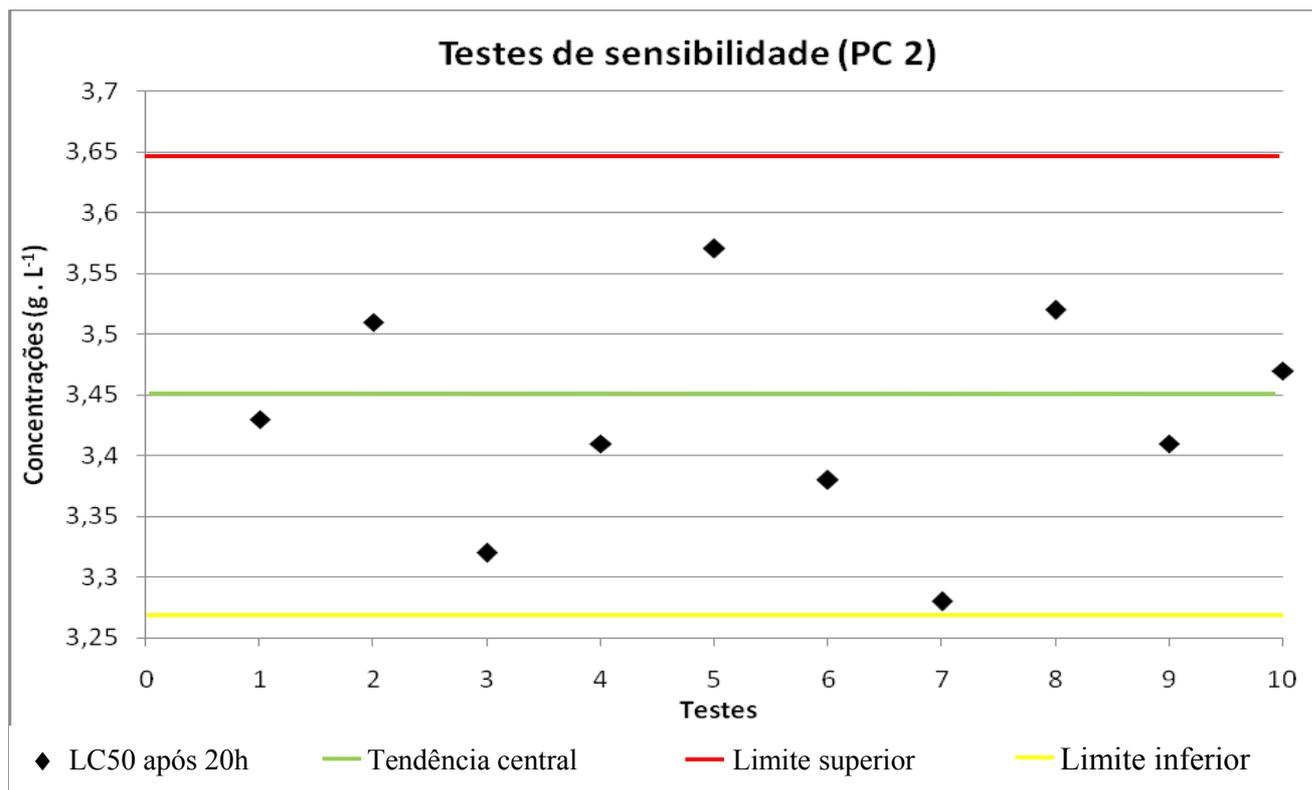


Figura 40 – Faixa de sensibilidade da linhagem PC2 ao NaCl após 20h de exposição.

4.5 Testes de toxicidade aguda do fipronil

Nestes testes de toxicidade realizados com fipronil as médias da NOEC(I), LOEC(I), LC(I)₅₀ (Figura 41) e LC(I)₁₀₀ para PC1 foram, (em mgL⁻¹), respectivamente: 2,750, 3,125, 5,460 e 9,250 mgL⁻¹, sendo que para PC2 estas concentrações médias foram respectivamente de 3,250, 3,625, 6,428 (Figura 42) e 9,875 mgL⁻¹.

A faixa de efeito tóxico para PC1 (Figura 41) e PC2 (Figura 42) ficaram, respectivamente, entre 4,284 e 6,914 mg L⁻¹ e 5,148 e 8,046 mg L⁻¹. Estes dados estimados através do software TSK servem para demonstrar as concentrações mínimas e máximas, com confiança de 95%, que seriam letais para 50% dos organismos destas linhagens.

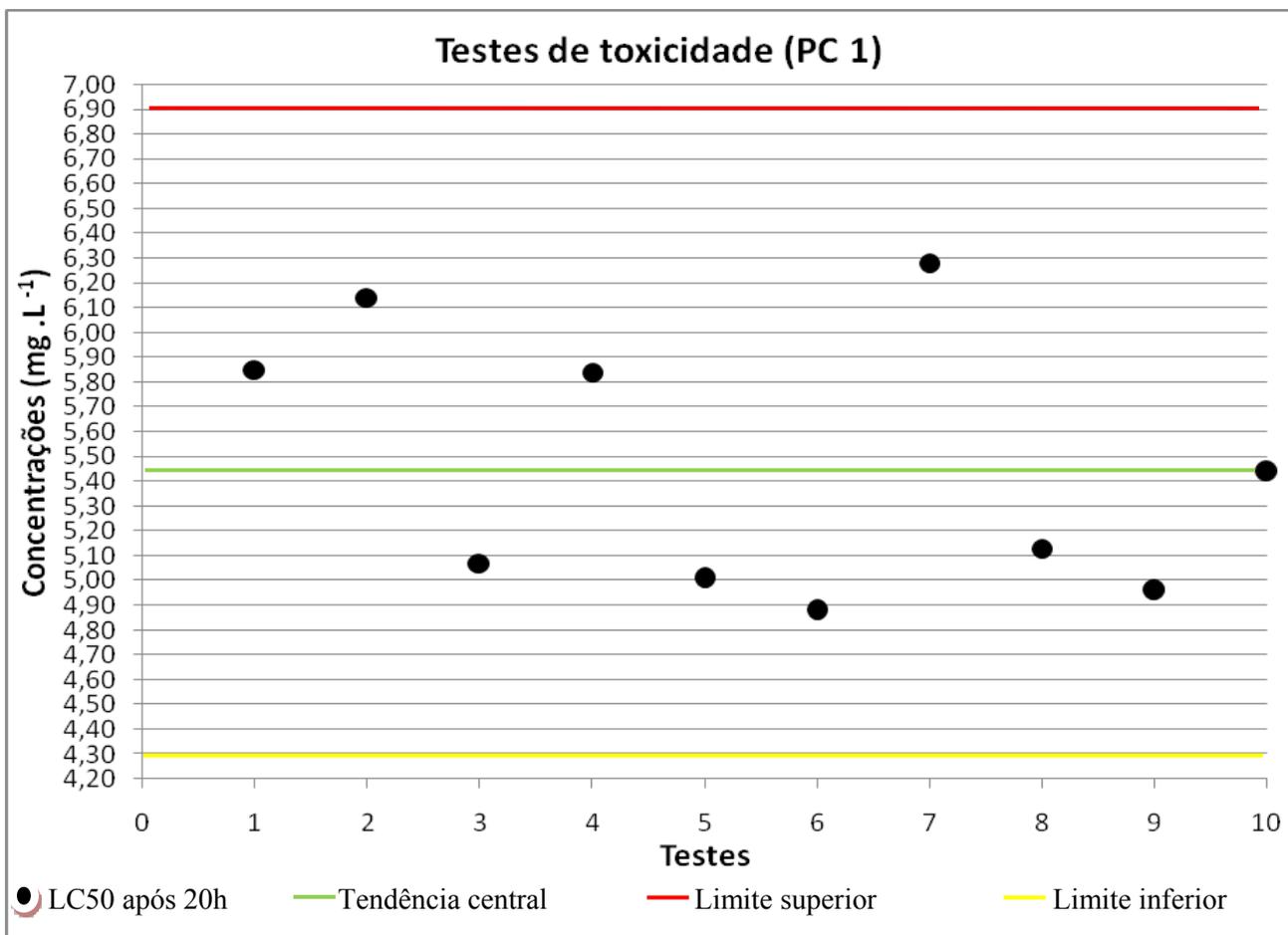


Figura 41 – Faixa de efeito tóxico do fipronil (confiança de 95%) para a linhagem PC1 após 20h de exposição.

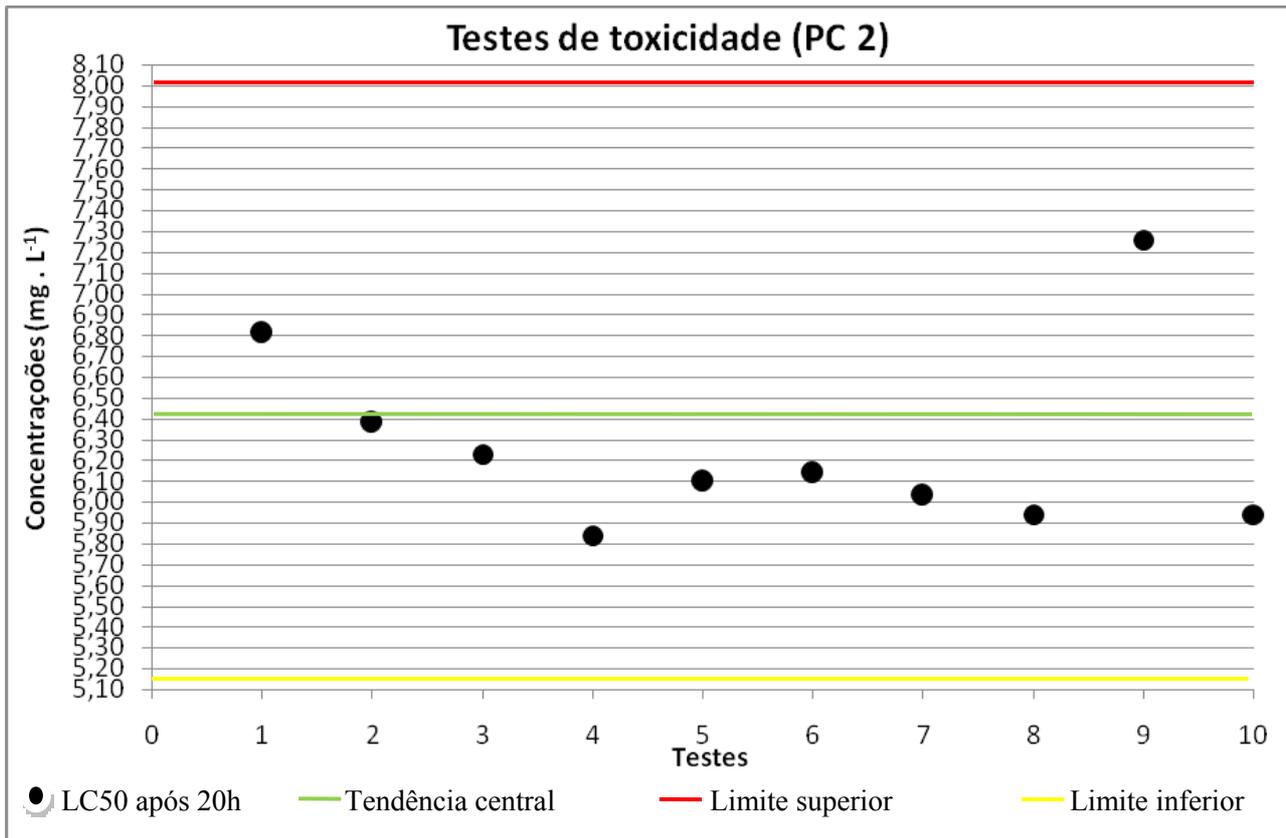


Figura 42 – Faixa de efeito tóxico do fipronil (confiança de 95%) para a linhagem PC 2 após 20h de exposição.

De acordo com Peret (2009) a concentração de fipronil obtida na Lagoa do Óleo (local de origem da linhagem PC2), em amostra de sedimento de um ponto de coleta superficial, retirada entre setembro e dezembro de 2007, foi de 0,00423 mgL⁻¹, valor muito abaixo da LOEC para ambas as linhagens de *Paramecium caudatum* (3,125 e 3,625 mgL⁻¹, respectivamente para PC1 e PC2) de acordo com os resultados do presente trabalho. O Quadro 2 mostra uma classificação dos agrotóxicos, segundo (Zucker, 1985), em relação às suas classes de toxicidade. De acordo com este quadro, o fipronil pode ser considerado moderadamente tóxico para *Paramecium caudatum* segundo os resultados obtidos neste trabalho.

Quadro 2 - Classes de toxicidade aguda de agrotóxicos para organismos aquáticos

Classe de toxicidade	CL50 ou CE50 (mg.L ⁻¹)
Extremamente tóxico	< 0,1
Altamente tóxico	0,1 a 1,0
Moderadamente tóxico	> 1,0 a < 10
Ligeiramente tóxico	> 10 a < 100
Praticamente não-tóxico	> 100

Fonte: Zucker, 1985.

Em comparação com *Dunaliella tertiolecta* (Quadro 3), o *P. caudatum* é menos sensível ao fipronil. Segundo Overmeyer (2007) a CE₅₀ (concentração que causa efeito adverso em 50% dos organismos) é de 0,63 mgL⁻¹, valor bem inferior ao obtido para PC1, por exemplo, que foi em torno de 5,460 mgL⁻¹. Nakagome (2006), em testes com *Daphnia magna* (Quadro 3), obteve a CE₅₀, também para fipronil, de apenas 0,15 mgL⁻¹. Quando se compara com o peixe *Poecilia reticulata* (guarú) percebemos que a sensibilidade a este agrotóxico é maior que a dos outros organismos apresentados: cerca de 0,07 e 0,10 mgL⁻¹ (Quadro 3), segundo Manrique (2009), o que nos levaria a crer que, quanto mais desenvolvido o sistema nervoso do organismo, mais sensível seria ao fipronil, devido à sua neurotoxicidade, porém, Cary (2004) mostrou em seu trabalho que, também com relação a este inseticida, a LC₅₀ para o Copepoda *Amphiascus tenuiremis* foi de apenas 2,5 . 10⁻³ mgL⁻¹ (Quadro 3).

O *Paramecium caudatum* sendo mais resistentes a esta substância, certamente irá acumulá-la e transferi-la para níveis tróficos superiores, podendo causar efeitos indiretos aos organismos consumidores.

Quadro 3 - Concentração média letal ou efetiva (LC ou EC₅₀) do fipronil a diferentes grupos de organismos (em ordem decrescente de tolerância)

Organismo	Grupo Taxonômico	LC ou EC ₅₀ (mgL ⁻¹)
<i>Paramecium caudatum</i> (PC2)	Protozoa	6,43 ⁽¹⁾
<i>Paramecium caudatum</i> (PC1)	Protozoa	5,46 ⁽¹⁾
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Algae	0,63 ⁽²⁾
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Molusca	0,18 ⁽²⁾
<i>Daphnia magna</i>	Cladocera	0,15 ⁽³⁾
<i>Poecilia reticulata</i>	Osteichthyes	0,07 a 0,10 ⁽⁴⁾
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Cladocera	0,02 ⁽⁵⁾
<i>Amphiascus tenuiremis</i>	Copepoda	2,5 . 10 ⁻³ ⁽⁶⁾

Fonte: (1) Trabalho atual; (2) Overmyer *et al.* (2007); (3) Nakagome (2006); (4) Manrique (2009); (5) Konwick (2005); (6) Cary (2004).

De acordo com estes resultados foi possível observar que PC2, tanto com relação à sensibilidade ao NaCl quanto à resistência ao toxicante testado, conforme esperado, apresentou limites superiores aos obtidos para PC1, pois em seu ambiente natural já havia sido exposta a outros agentes tóxicos como o próprio fipronil, segundo descrito por Peret (2009) e Peret *et al.* (2010). Pela presença do agrotóxico no ambiente, provavelmente linhagens menos sensíveis ao agrotóxico podem ter sido selecionadas, o que poderia explicar as características encontradas no organismo isolado da Lagoa do óleo.

As concentrações relativamente baixas de LC(I)₅₀ obtidas para PC1 e 2 (5,46 e 6,43 mgL⁻¹ respectivamente) mostraram que o fipronil é bastante perigoso quando comparado a outros agrotóxicos como Chlorex, MCPA, Dichlorprop, Matrigon e Sumicidin que, segundo Schreiber & Brink (1989), para o ciliado *Colpoda cucullus* apresentaram, respectivamente, os seguintes valores de LC₅₀: 320, 100 e superior a 100 mgL⁻¹ para os três últimos. De acordo com Amanchi & Bhagavathi (2009) testes também realizados com *Paramecium caudatum* mostraram que a LC₅₀ do inseticida Delfin foi de 250,17±15,33 mgL⁻¹, concentração quase 39 X maior que a obtida para PC2 exposto ao fipronil (a mais resistente dentre as duas linhagens comparadas neste trabalho).

4.6 Determinação das concentrações nominais do fipronil

4.6.1 Limite de quantificação (LOQ)

De acordo com os parâmetros utilizados nesta etapa do projeto, a menor escala do limite de quantificação (LOQ) foi estipulada em $0,25 \text{ mgL}^{-1}$.

Como controles foram injetadas amostras de água ultra pura sem o fipronil (branco – Figura 43) filtradas no mesmo tipo de cartucho (C18), também condicionado, para serem avaliados os possíveis picos dos solventes ou de interferentes, que no caso não ocorreram.

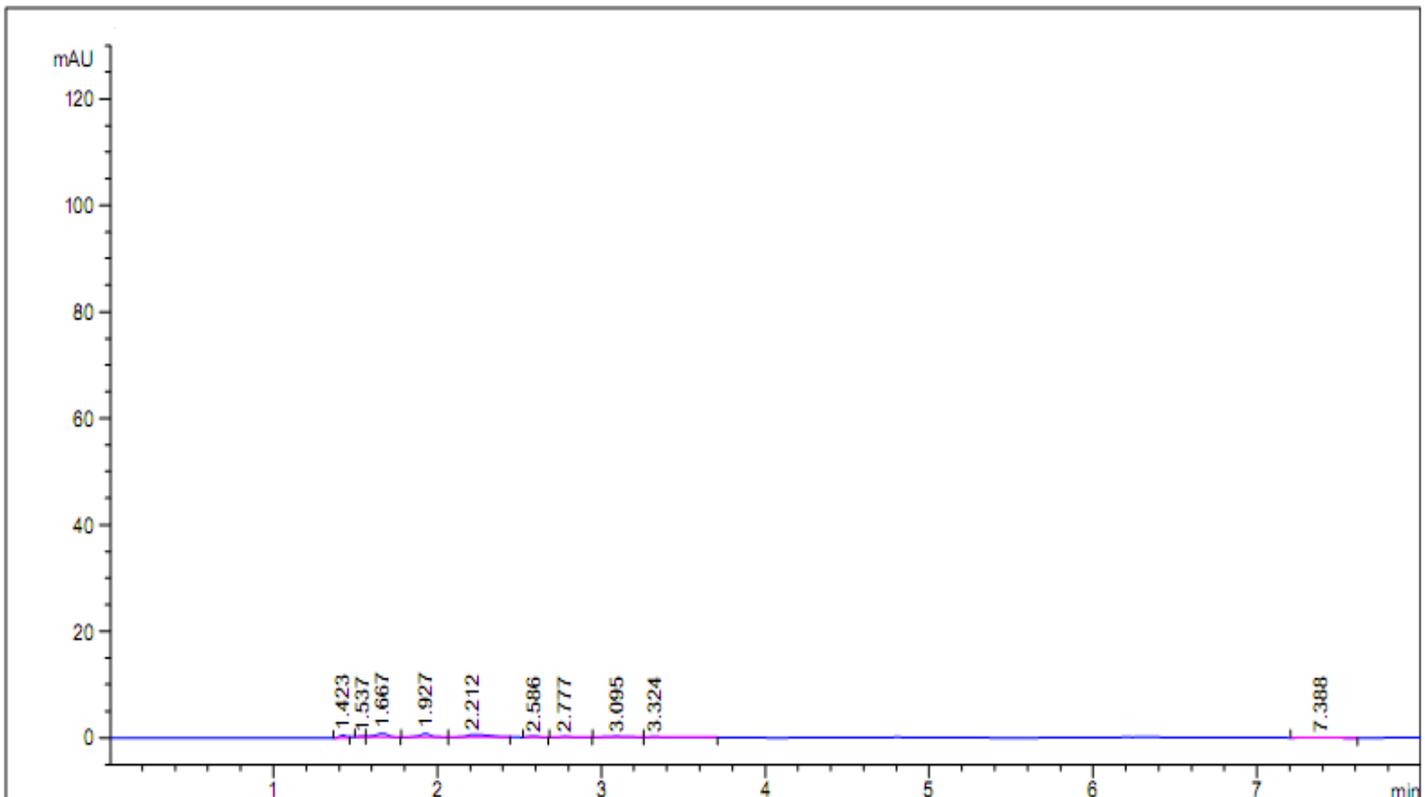


Figura 43 – Cromatograma referente ao branco (amostra sem o fipronil) para avaliação da ocorrência de picos indesejados de contaminantes.

4.6.2 Curva de calibração

Conforme dito anteriormente a curva de calibração (Figura 44) foi feita com valores abaixo e acima (margem de segurança) dos testados nos bioensaios de toxicidade, ou seja, abaixo de 3 e acima de 10 mgL^{-1} de fipronil. No gráfico abaixo (Figura 44) é possível observar que é feita uma comparação entre os valores das áreas de base dos picos cromatográficos (eixo y – em escala da unidade mAU,

que corresponde a aproximadamente 1000X o valor em mgL^{-1}) e a escala das concentrações de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 (eixo x, cuja unidade é mgL^{-1}).

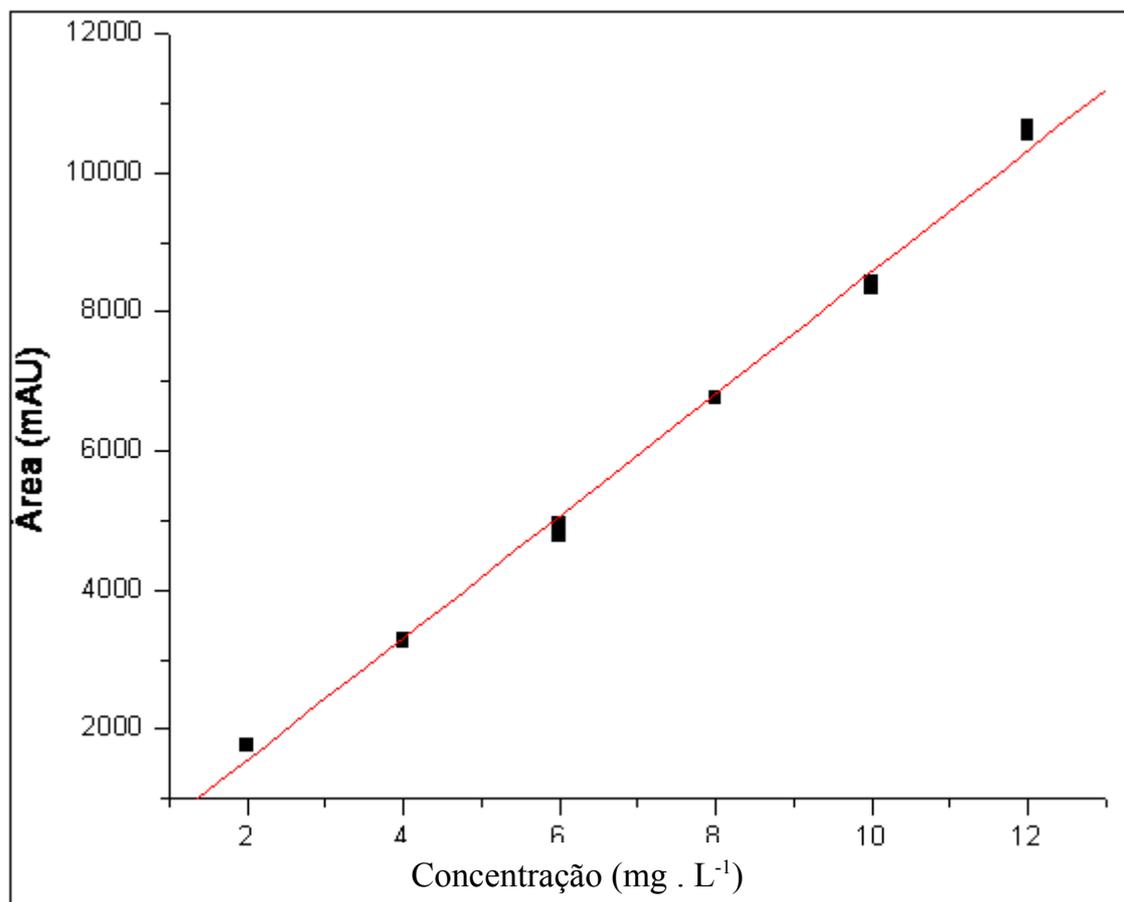


Figura 44 - Curva de calibração entre as escalas mgL^{-1} e mAU dos cromatogramas.

4.6.3 Recuperação

Os valores escolhidos para realização da avaliação da recuperação do fipronil (analito) foram baseados nos mais próximos aos da LOEC, LC_{50} e LC_{100} para PC1 e 2, ou seja, respectivamente 3,0, 5,5 e 9,5 mgL^{-1} para PC1 e 3,5, 6,5 e 10,0 mgL^{-1} para PC2.

O intuito desta avaliação foi confirmar se os valores destas concentrações realmente se confirmavam. Para isto era necessário calcular a porcentagem de recuperação, que foi feita através da divisão das médias (entre as três réplicas) das áreas das bases dos picos cromatográficos, já com a unidade transformada

para mg.L^{-1} , pelo correspondente valor esperado. Os resultados foram considerados satisfatórios quando os valores obtidos ficavam entre 70 e 120% do valor esperado (EPA, 2001).

As Figuras 45 a 50 mostram um exemplo de cromatograma de cada concentração analisada.

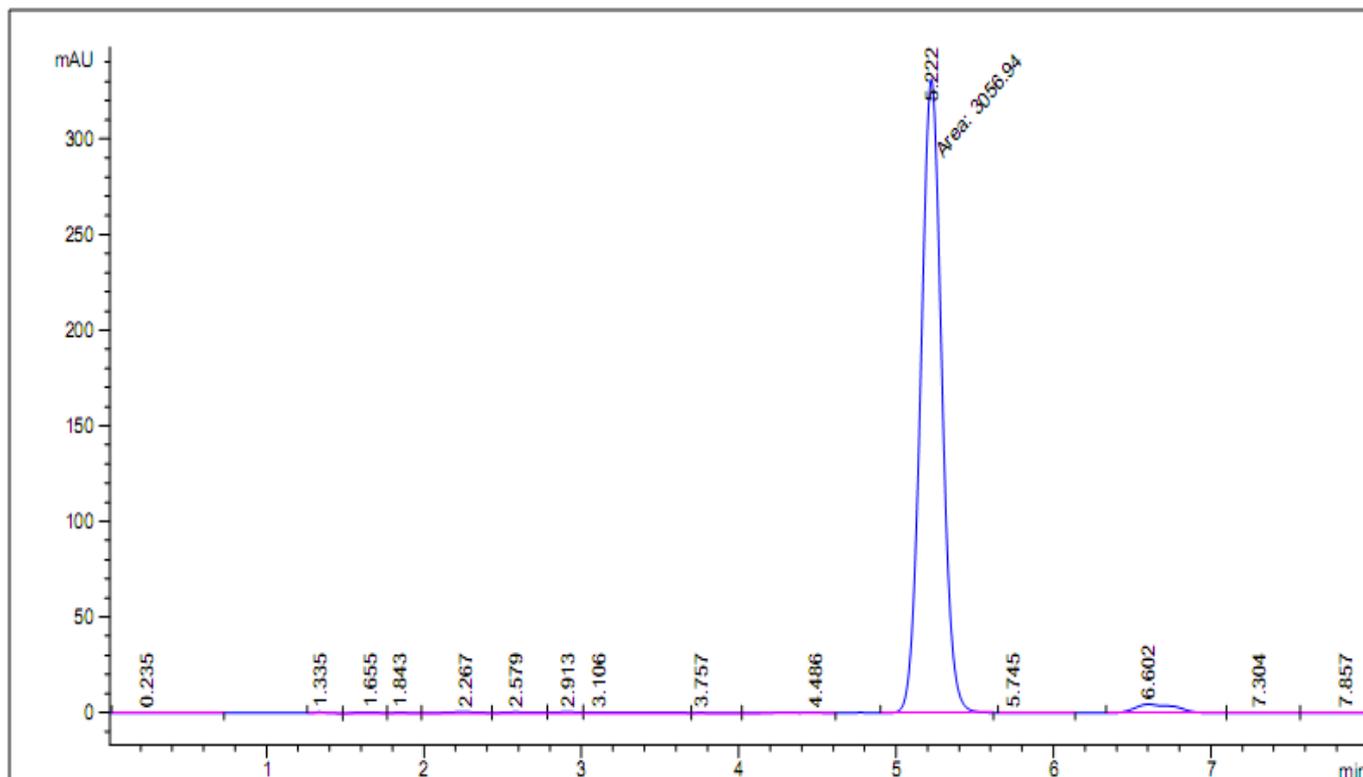


Figura 45 – Cromatograma do fipronil na concentração de 3 mgL^{-1} .

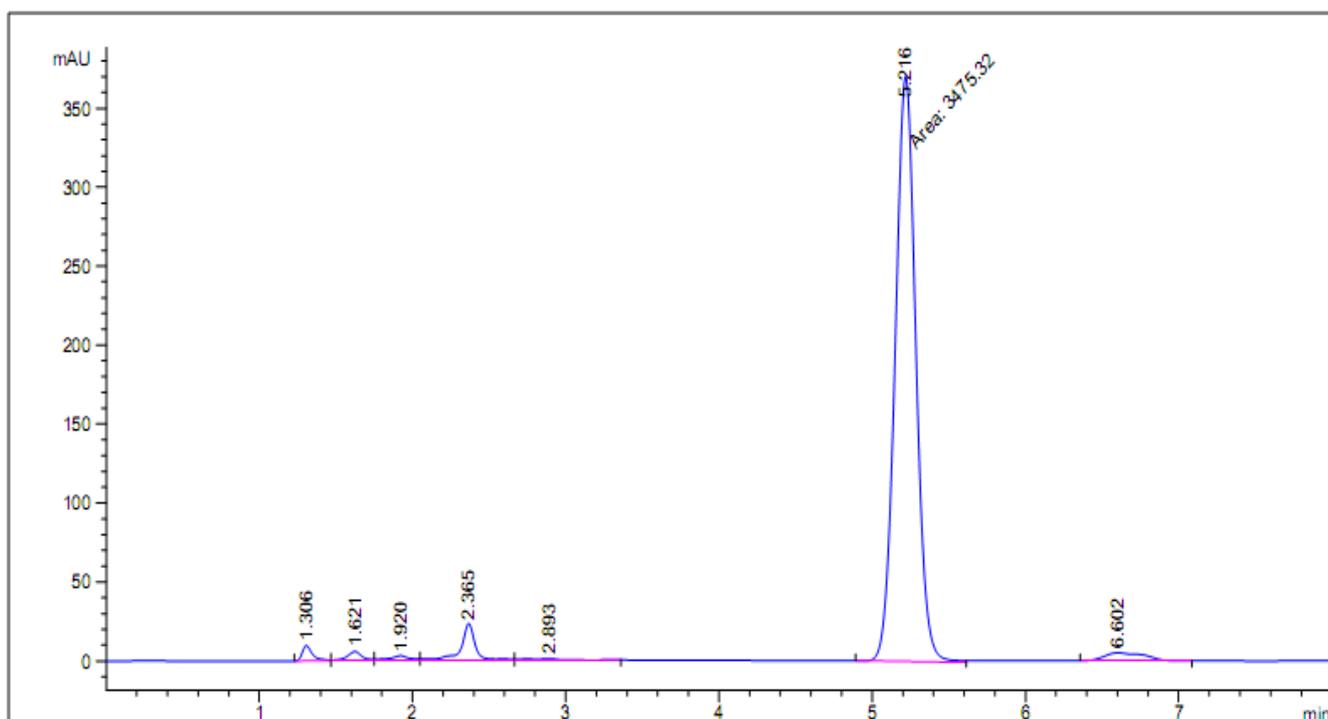


Figura 46 – Cromatograma do fipronil na concentração de 3,5 mgL⁻¹.

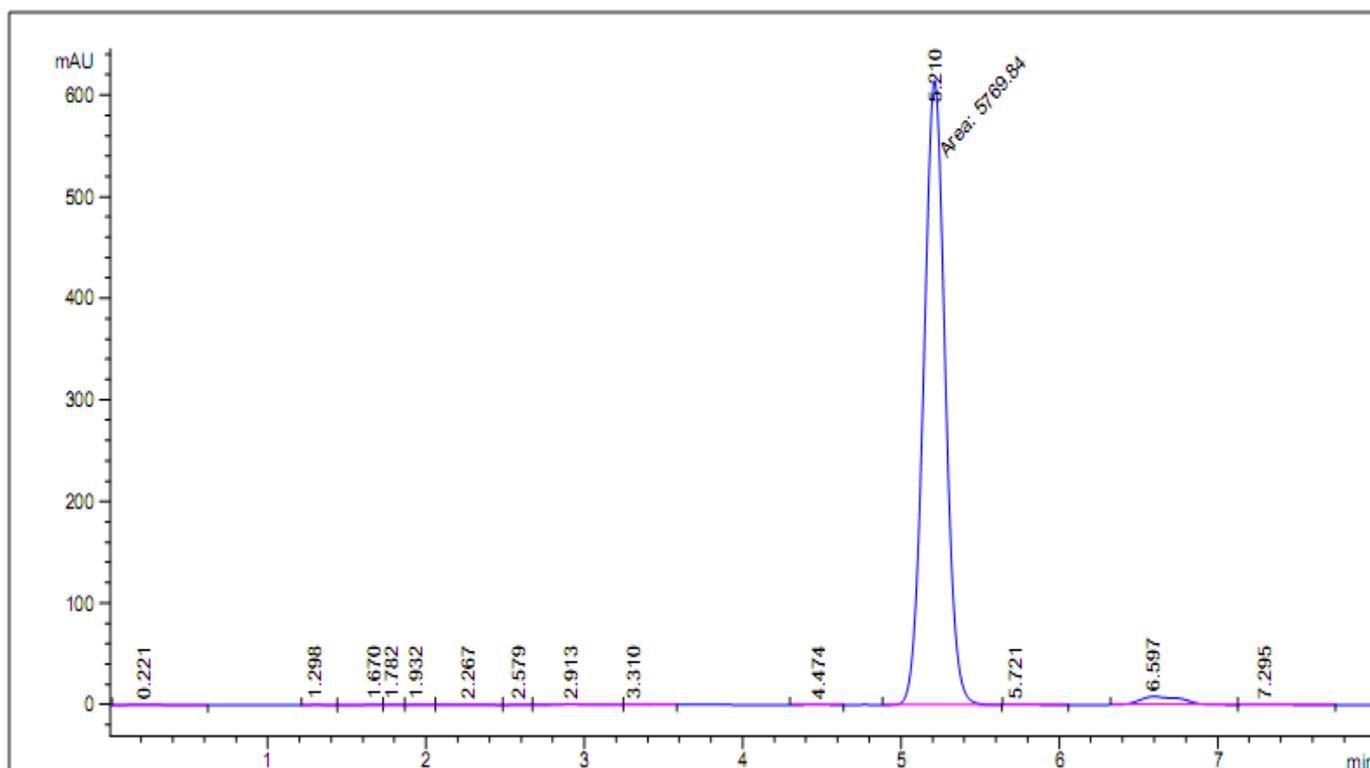


Figura 47 – Cromatograma do fipronil na concentração de 5,5 mgL⁻¹.

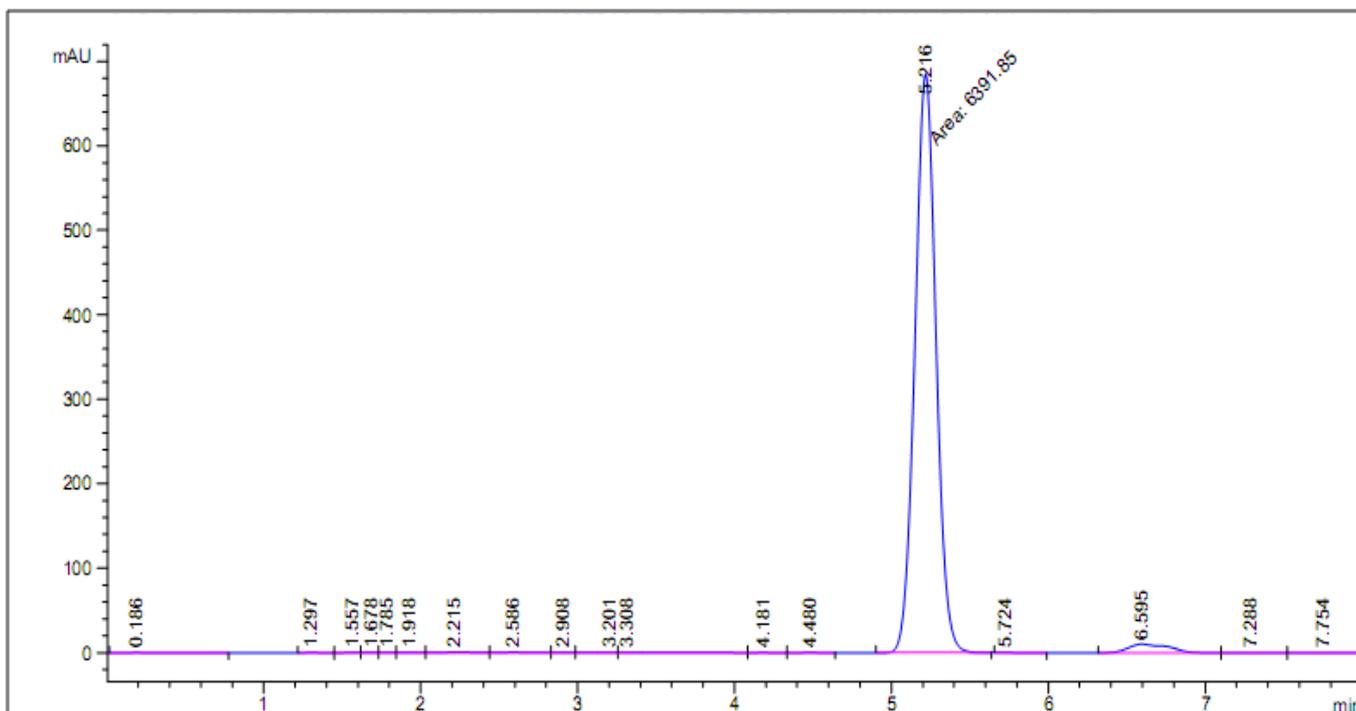


Figura 48 – Cromatograma do fipronil na concentração de 6,5 mgL⁻¹.

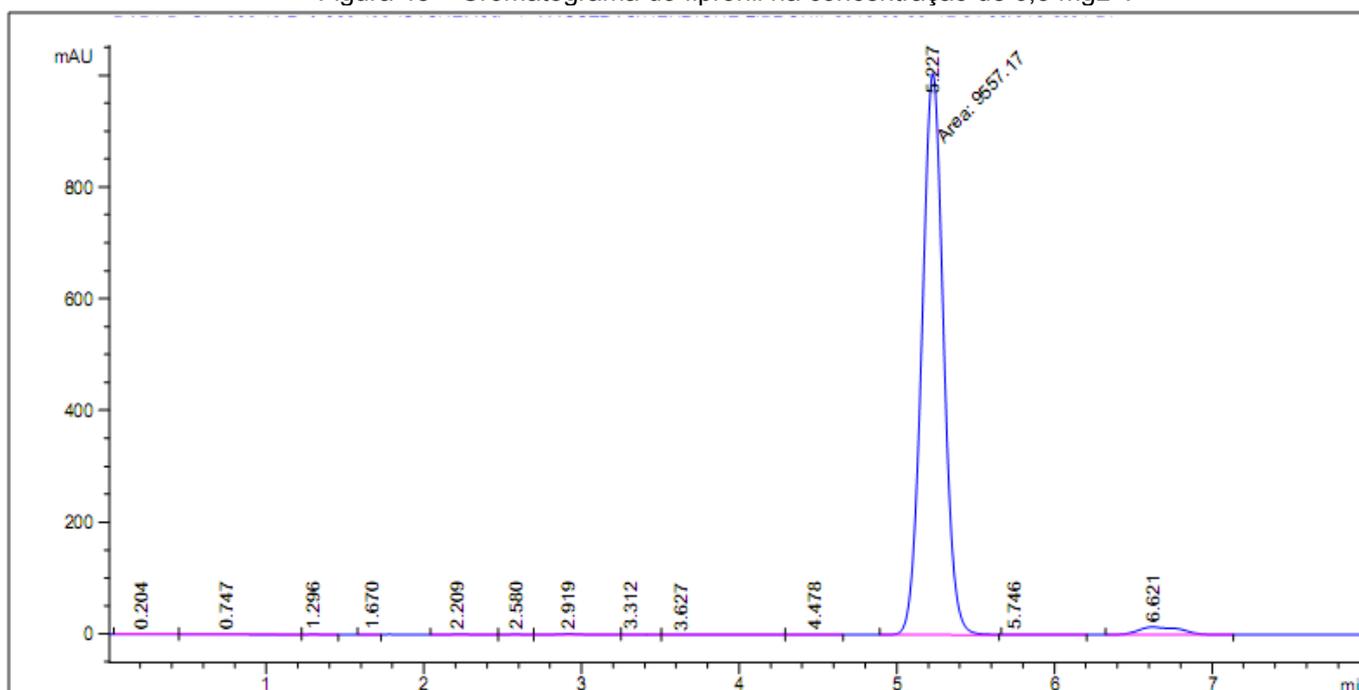


Figura 49 – Cromatograma do fipronil na concentração de 9,5 mgL⁻¹.

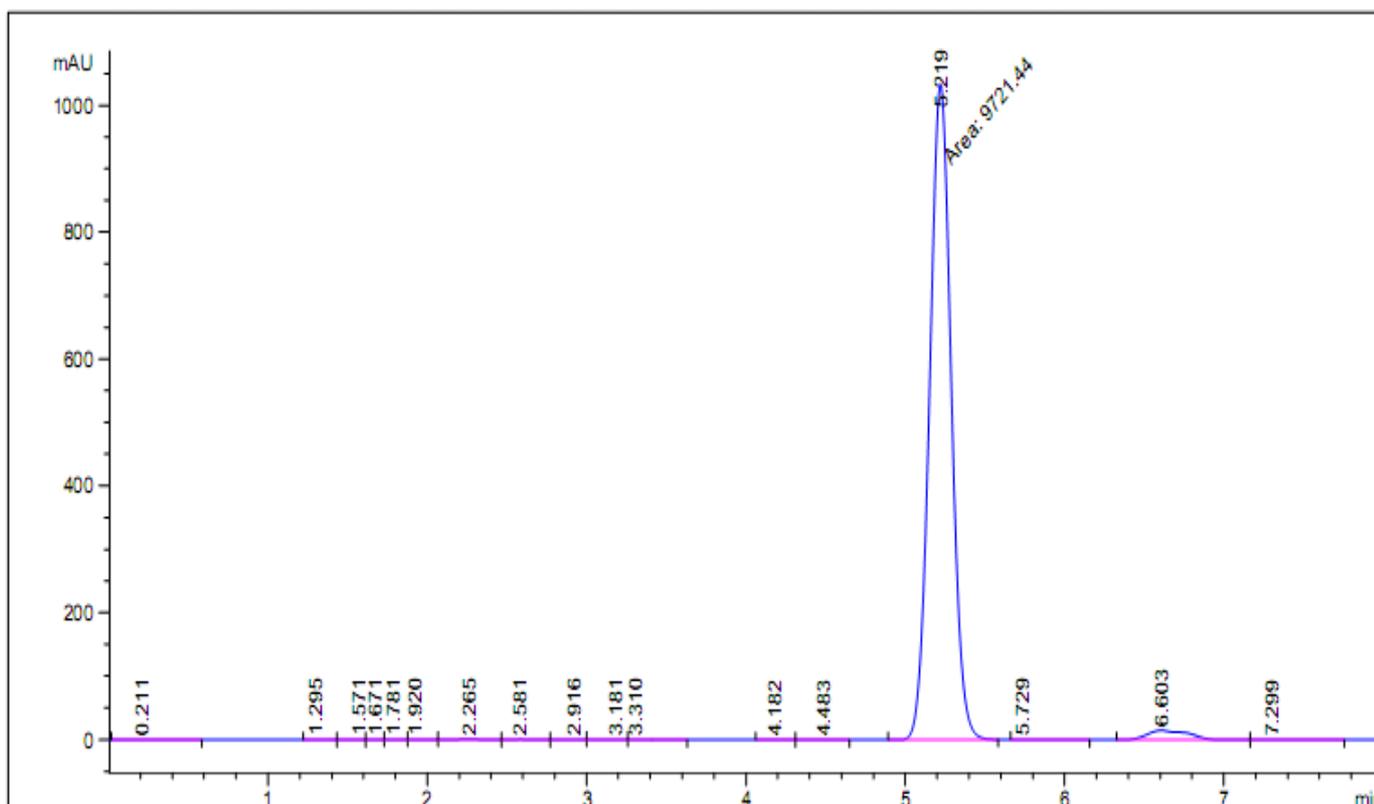


Figura 50 – Cromatograma do fipronil na concentração de 10 mgL⁻¹.

Foi possível observar, nos cromatogramas apresentados (Figuras 45 a 50), que para todas as concentrações houve ausência praticamente total de picos de interferentes, sendo que os picos do analito (fipronil) foram sempre bem definidos e com tempos de retenção praticamente idênticos, de aproximadamente 5,22 minutos.

Os resultados obtidos foram muito satisfatórios, pois todas as porcentagens médias das recuperações ficaram entre 90 e 110%, conforme pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5 – Percentuais de recuperação das ostras de fipronil utilizadas durante os testes de toxicidade

Concentração esperada (mg.L ⁻¹)	Porcentagem de recuperação (%)
3,0	102,4
3,5	102,2
5,5	105,6
6,5	98,2
9,5	100,7
10,0	94,5

Baseado nos resultados apresentados foi possível afirmar, com segurança, que as concentrações das soluções utilizadas durante os testes de toxicidade foram confiáveis.

4.7 Análises estatística

Através do planejamento fatorial foi possível perceber que, em se tratando de cinco variáveis (temperatura, pH, tamanho de frasco de cultivo, iluminação e agitação), o número de cultivos simultâneos deveria ser 32, porém, devido à necessidade de se realizarem mais duas réplicas este valor aumentaria para 96. Dessa forma o intervalo de tempo entre a montagem do primeiro cultivo e o último seria grande o suficiente para influenciar nos resultados. Dessa forma, foi decidido testar inicialmente a influência da temperatura e do pH de cultivo para avaliação da melhor condição com relação a essas duas variáveis.

Pelo método de planejamento fatorial quando as variáveis apresentam muitos valores é necessário testar os valores mais baixos e mais altos de cada uma, para se obterem os resultados que serão utilizados na análise. Após a obtenção destes resultados todos os dados são plotados para a obtenção do gráfico de Pareto, que no caso foi obtido através do software Estatística® 9.1.

Este gráfico demonstra se a variável influencia ou não nos resultados obtidos (quando a barra horizontal do gráfico ultrapassa a linha tracejada de p) e quando influencia se a melhor condição é no valor mais alto (valor positivo no resultado) ou no valor mais baixo (valor negativo no resultado).

O gráfico a seguir (Figura 51) demonstra o resultado da avaliação da influência da temperatura e do pH no cultivo de PC1. As condições avaliadas foram pH 6 e 9 nas temperaturas de 20 e 30°C. O gráfico mostra que a correlação foi significativa, pois a primeira coluna horizontal, referente à influência da temperatura (T), ultrapassou a linha tracejada e o fato do valor ser positivo (2,349885), indica que a melhor condição é a temperatura mais alta (30°C). A segunda coluna horizontal corresponde à influência do pH, que no caso não foi significativa, porém como o valor foi positivo indica que o maior valor (pH 9) é mais favorável. Assim sendo, essas duas condições (30°C e pH 9) foram escolhidas para os cultivos nas etapas subsequentes.

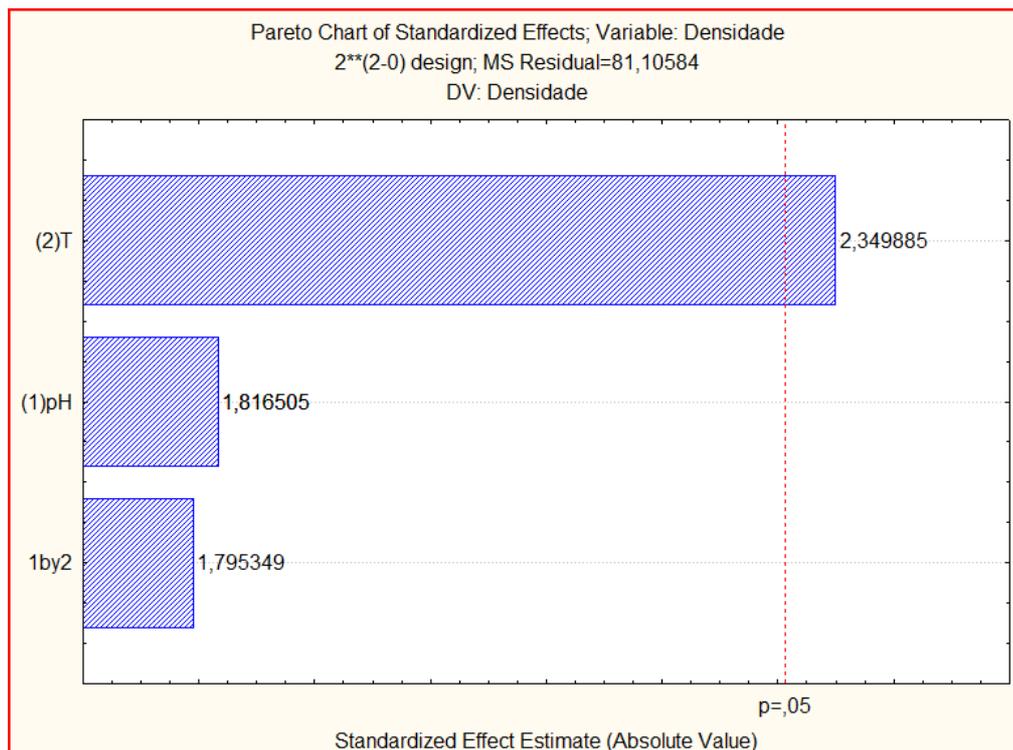


Figura 51 – Gráfico de Pareto indicando a correlação da temperatura de 20 e 30°C e do pH 6 e 9 no cultivo de PC1

Com os resultados obtidos de pH e temperatura para PC2, houve uma suspeita muito grande de que a melhor temperatura seria 30°C e o melhor pH seria o 7, então foi decidido inicialmente testar a temperatura de 20°C como a mais baixa e a de 27,5°C como a mais alta e o pH 7 como o valor mais baixo e o 9 como mais alto. Os resultados, como podem ser observados na Figura 52, mostraram que, neste caso, a temperatura teve correlação significativa e que a melhor é a mais alta. No caso do pH pode ser observado que o mais baixo é o melhor pois a correlação foi significativa porém o valor foi negativo.

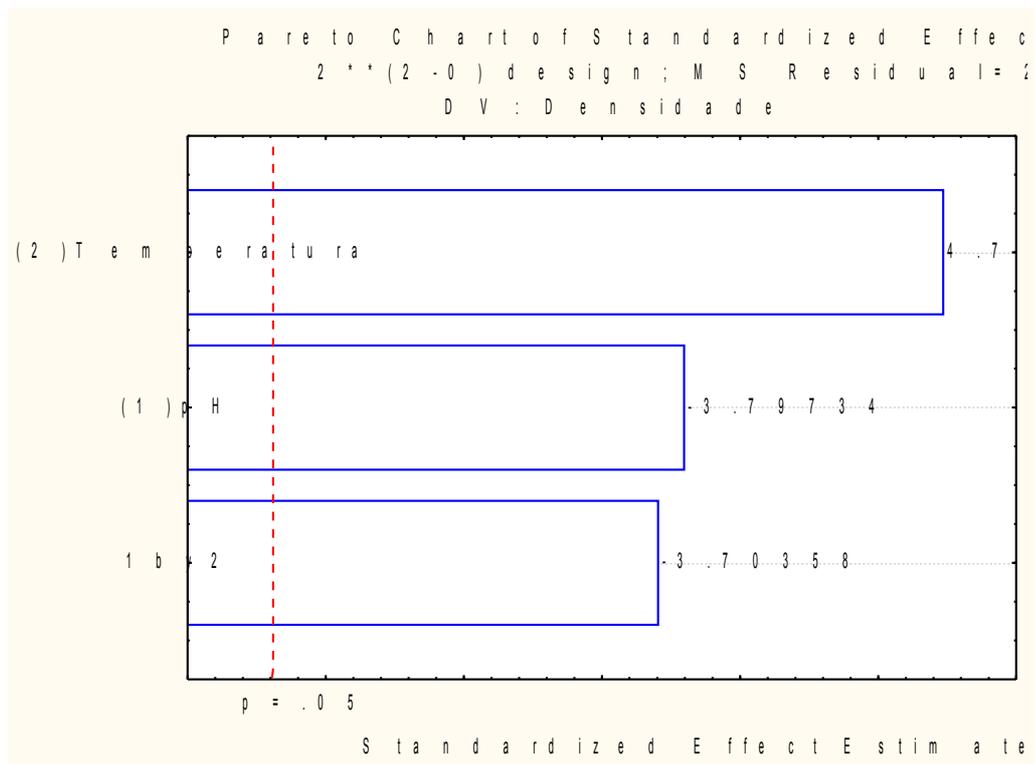


Figura 52 - Gráfico de Pareto indicando a correlação da temperatura de 20 e 27,5°C e do pH 7 e 9 no cultivo de PC2

Foi possível verificar que a temperatura de 27,5°C era melhor que a de 20°C e que o pH 7 era melhor que o 9, posteriormente foi feita uma nova análise para avaliar a temperatura de 30°C em relação à de 27,5°C. Conforme a Figura 53 podemos observar que o pH (primeira coluna) é significativo e que o 7 continua sendo melhor que o 9 (valor negativo do resultado). Além disso, é possível observar também que a temperatura de 27,5°C também foi melhor que a de 30°C, pois a correlação significativa foi negativa, indicando que o menor valor usado é melhor. Dessa forma foi possível demonstrar porque a condição de pH 7 e 27,5°C foi escolhida para as demais etapas da otimização de cultivo da linhagem PC2.

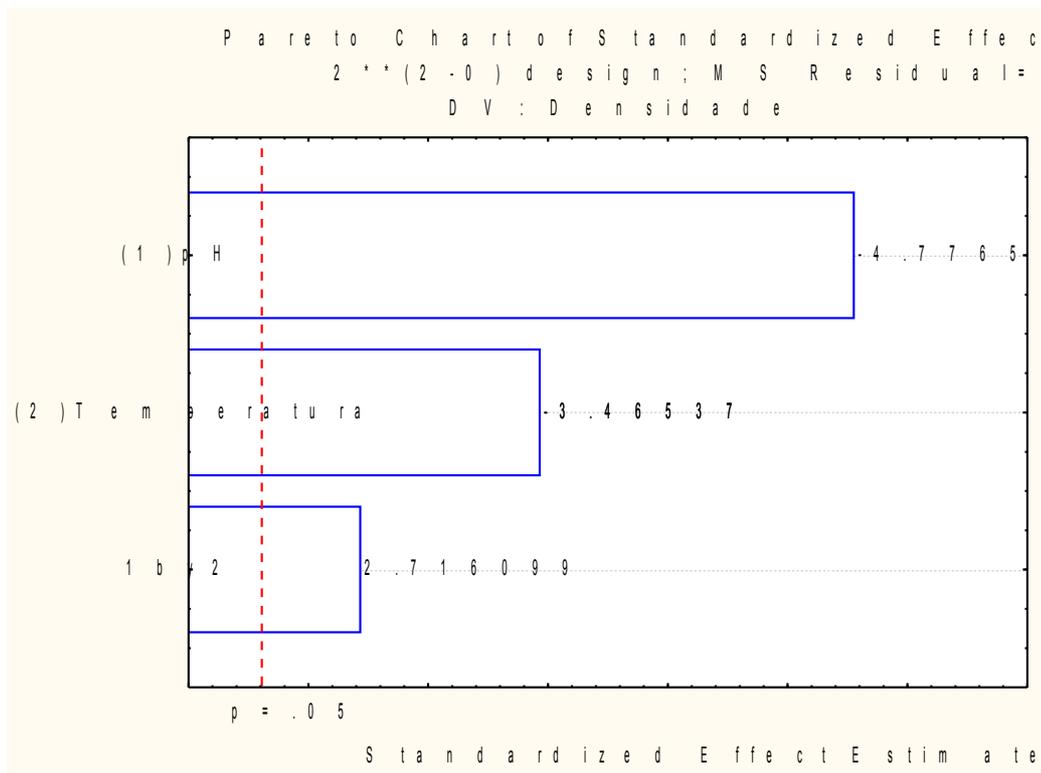


Figura 53 - Gráfico de Pareto indicando a correlação da temperatura de 27,5 e 30°C e do pH 7 e 9 no cultivo de PC 2

5. CONCLUSÕES

- A solução saturada de cloreto de mercúrio foi o fixador que, em média, preservou o maior número de células em todos os pH, sendo que o pior fixador foi o formol a 2%. Por isso, foi o fixador adotado nos experimentos realizados posteriormente.
- A melhor condição de cultivo em termos de densidade média (células mL⁻¹) para a linhagem PC1 foi pH 9 a 30° C, sem iluminação ou agitação, sendo que este pH é compátivel aos valores obtidos em ambientes eutrofizados e esta temperatura é comparável à que pode ser aferida em ambientes aquáticos no verão.
- A melhor condição de cultivo para a linhagem PC2 foi pH 7 a 27,5°C, também sem iluminação ou agitação, pois, em termos de densidade média (células mL⁻¹) os valores obtidos foram superiores a todos os outros.

- Com relação às temperaturas testadas, para ambas as linhagens, notou-se que a densidade populacional se comporta de forma inversa ao volume celular, ou seja, quando o metabolismo do protozoário é acelerado pela temperatura mais favorável, a frequência das divisões celulares também aumenta. Com isso, menos energia é estocada e a maior parte é investida no crescimento celular.
- Comparada à linhagem PC1, a linhagem PC2 teve uma reprodução um pouco mais lenta e um tempo de geração superior (respectivamente 6,7 e 7,6 horas), entretanto, sua densidade máxima superou a de PC1 em mais de mil organismos mL⁻¹ (6528 e 7548 organismos mL⁻¹, respectivamente), o que indica que o início mais tardio da reprodução pode ser compensado pela maior eficiência desta.
- A linhagem PC1 é mais sensível ao NaCl que a PC2 (LC₅₀ respectivamente entre 2,765 - 3,148 gL⁻¹ e 3,268 – 3,650 gL⁻¹) e também menos tolerante ao fipronil (LC₅₀ respectivamente entre 4,284 – 6,914 mgL⁻¹ e 5,148 – 8,046 mgL⁻¹) provavelmente por ter sido isolada de um local sem histórico de contaminações, ao contrário de PC2.
- O *Paramecium caudatum* não pode ser considerado um bom bioindicador para contaminação com fipronil devido à sua elevada resistência, entretanto, este ciliado pode eventualmente bioacumular e transferir fipronil para os níveis tróficos superiores, afetando indiretamente a biota do sistema.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 12713 (2004)
Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro: ABNT, 21p.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 13373 (2005)
Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica – Método de Ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 15 p.
- Amanchi & Bhagavathi (2009) Comparative study on Cytotoxicity of Delfin Insecticide using Two Vital Protozoan Ciliates *Paramecium caudatum* and *Oxytricha fallax*. **Asian Journal of Experimental Sciences** **23(1)**: 55 – 60p.
- Baird, C. (2002) **Química Ambiental** 2ª edição Bookman, Porto Alegre, RS 622pp.
- Bass, D.; Richards, T. A.; Matthai, L.; Marsh, V. & Cavalier - Smith, T. (2007) DNA evidence for global dispersal and probable endemicity of protozoa. **Biomed Central Evolutionary Biology** **7 (162)**: 13p.
- Benitez, L.; Martín-González, A.; Gilardi, P.; Soto, T.; Rodríguez de Lecea, J. & Gutiérrez, J.C. (1994) The ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila* as a biosensor to detect mycotoxins. **Letters in Applied Microbiology** **19**: 489-491p.
- Cary, T. L.; Chandler, G. T.; Volz, D. C.; Walse, S. S. & Ferry, J. L. (2004) Phenylpyrazole Insecticide Fipronil Induces Male Infertility in the Estuarine Meiobenthic Crustacean *Amphiascus tenuiremis*. **Environmental Science and Technology** **98 (2)**: 522 – 528p.
- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB (1992) **Água: métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos**. São Paulo, CETESB, v.1.
- Cary, T. L.; Chandler, G. T.; Bejarano, A. C.; Pender, J. & Ferry, J. L. (2004) Population Consequences of Fipronil and Degradates to Copepods at Field Concentrations: An Integration of Life Cycle Testing with Leslie Matrix Population Modeling. **Environmental Science & Technology** **38 (23)**: 6407-6414p.
- Chanton, P. F.; Ravel, P.; Tissut, M. & Meyran, J. C. (2001) Toxicity and bioaccumulation of fipronil in the nontarget arthropodan fauna associated with subalpine mosquito breeding. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **52**: 8-12p.
- Connelly, P. (2001) Environmental fate of Fipronil. **California Environmental Protection Agency**. 17p.
- Dias N.; Mortara, R.A. & Lima, N. (2003) Morphological and physiological changes in *Tetrahymena pyriformis* for the in vitro cytotoxicity assessment of Triton X-100. **Toxicology in Vitro** **17**: 357-366p.

- Domingues, D. F. & Bertoletti, E. Seleção, Manutenção e Cultivo de Organismos Aquáticos. In Zagatto, P. A. (Org.) & Bertoletti, E. (Org.). **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2008, 472p.
- Dryl, S. & Mehr, K. (1976) Physiological and toxic effects of detergents on *Paramecium caudatum*. **Acta Protozoologica** **15**: 501-513p.
- Environmental Protection Agency - EPA (2001) **National Primary Drinking Water Standards**. Disponível em: <http://water.epa.gov/drink/index.cfm>. Acesso em 25 de outubro de 2010.
- Gilles, R. & Péqueux, A. (1983) Interactions of Chemicals and Osmotic Regulation with the Environment. In: Vernberg, F.J. e Vernberg, W.B (eds.). *The Biology of Crustacea* Vol. 8. Academic Press, USA, 383 p.
- Gunasekara, A.S. & Troung, T. (2007) Environmental Fate of Fipronil. **California Environmental Protection Agency**. 28p.
- Hanratty, M.P.; Liper, K. (1996) Evaluation of model predictions of the persistence and ecological effects of diflubenzuron in litoral ecosystem. **Ecological Modelling** **90**: 79-95p.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2006) **Censo Agropecuário**, Rio de Janeiro. 146p. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/agropecuario.pdf>. Acesso em 30 de janeiro de 2010.
- Konwick, B. J.; Fisk, A. T.; Garrison, A. W.; Avants, J. K.; Black, M. C. (2005) Acute Enantioselective Toxicity of Fipronil and its Desulfinyl Photoproduct to *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Toxicology and Chemistry** **24(9)**: 2350–2355
- Madoni, P. & Romeo, M. G. (2006) Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. **Environmental Pollution** **141**: 1-7p.
- Manrique, W. G. (2009) Toxicidade aguda e risco ecotoxicológico do fipronil para o guaru (*Poecilia reticulata*) e dissipação no ambiente aquático. **Universidade Estadual Paulista – Jaboticabal/SP**, 58p.
- Martín-González, A.; Díaz, S.; Borniquel, S.; Gallego, A.; Gutiérrez, J.C. (2006) Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. **Research in Microbiology** **157**: 108-118p.
- Miranda, A.L.C. (2006) **Bioacumulação de Poluentes Organopersistentes (POPS) em Traíra (*Hoplias malabaricus*) e Seus Efeitos *in vitro* em**

- Células do Sistema Imune de Carpa (*cyprinus carpio*).** Universidade Federal do Paraná, 56p.
- Mozeto, A. A. & Zagatto, P. A. Introdução de Agentes Químicos no Ambiente. In Zagatto, P. A. (Org.) & Bertoletti, E. (Org.). **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2008, 472p.
- Miyoshi, N.; Kawano, T.; Tanaka, M.; Kadono, T.; Kosaka, T.; Kunimoto, M.; Takahashi, T. & Hosoya, H. (2003) Use of *Paramecium* species in bioassays for environmental risk management: determination of IC₅₀ values for water pollutants. **Journal of Health Science** **49 (6)**: 429-435p.
- Nakagome, F. K.; Noldin, J. A. & Resgalla JR., C. (2006) Toxicidade Aguda e Análise de Risco de Herbicidas e Inseticidas Utilizados na Lavoura do Arroz Irrigado sobre o Cladóceros *Daphnia magna*. **Ecotoxicologia e Meio Ambiente** **16**: 93-100p.
- Nalecz-Jawecki, G. (2004) Spirotox- *Spirostomum ambiguum* Acute Toxicity Test- 10 years of experience. **Environmental Toxicology** **19**: 359-364p.
- Nalecz-Jawecki, G. & Sawicki, J. (1999) Spirotox- a new tool for testing the toxicity of volatile compounds. **Chemosphere** **38**: 3211-3218p.
- Nalecz-Jawecki, G. & Sawicki, J. (2002) The toxicity of tri-substituted benzenes to the protozoan ciliate *Spirostomum ambiguum*. **Chemosphere** **46**: 333-337p.
- Nicolau, A.; Dias, N.; Carvalho, G.S.; Mota, M. & Lima, N. (1999) **Os protozoários como ferramenta da monitorização biotecnológica da poluição: ensaios in vitro**. 10p.
- Nicolau, A.; Martins, M. J.; Mota, M. & Lima, N. (1999) **Estudo da comunidade de protozoários exposta a tóxicos em estações de tratamentos de águas residuais**. 10p.
- Niemeyer, J. C.; Santos V. C.; Araujo, P. B. & da Silva, E. M. (2009) Reproduction of *Cubaris murina* (Crustacea: Isopoda) under laboratory conditions and its use in ecotoxicity tests. **Brazilian Journal of Biology** **69(1)**: 137-142p.
- Nilsson, J.R. (1989) *Tetrahymena* in cytotoxicity: with special reference to effects of heavy metals and selected drugs. **European Journal of Protistology** **25**: 2-25p.
- Ohashi, T. L. (2010) **Arsênio em amostras de sedimento da microbacia do Ribeirão Guamium, Piracicaba, SP e seu efeito em organismos zooplanctônicos**. Universidade Federal de São Carlos – SP, 84p.
- Ohi, M. (2002) **Efeitos Reprodutivos e Tóxicos do Fipronil (*Frontline*® *Top-Spot*TM)**

- Overmyer, J. P.; Rouse, D. R.; Avants, J. K.; Garrison, A. Wayne; DeLorenzo, Marie E.; Chung, K. W.; Key, P. B.; Wilson, W. A. & Black, M. C. (2007) Toxicity of fipronil and its enantiomers to marine and freshwater non-targets. **Journal of Environmental Science and Health. Part B, 42: 5: 471 – 480p.**
- Pace, M.L. & Orcutt Jr, J.D. (1981) The relative importance of protozoans, rotifers and crustaceans in a freshwater zooplankton community. **Limnology and Oceanography 36**, 822-830p.
- Packroff, G.; Lawrence, J. R. & Neu, T. R. (2002) In Situ Confocal Laser Scanning Microscopy of Protozoans in Cultures and Complex Biofilm Communities. **Acta Protozoologica 41: 245 – 253p.**
- Complex Biofilm Communities
- Pelczar Jr., M. J.; Chan, E. C. S. & Krieg, N. R. (1997) Microbiologia Conceitos e Aplicações. 2 ed. São Paulo: **Makron Books: 524p.**
- Peret, A. M.; Oliveira, L. F.; Bianchini Jr., I.; Seleghim, M. H. R.; Peret, A. C. & Mozeto, A. A. (2010) Dynamics of fipronil in Óleo Lagoon in Jataí Ecological Station, São Paulo-Brazil. **Chemosphere 78: 1225 - 1229p.**
- Pimentel & Levitam (1986). **Pesticide: amounts applied and amounts reaching plants.** BioScience, 36:86-91p.
- Porter, K.G.; Sherr, E.B.; Sherr, B.F.; Pace, M. & Sanders, R.W. (1985) Protozoa in planktonic food webs. **J. Protozool. 32: 409-415p.**
- Rand, G.M. (1995) **Fundamentals of Aquatic Toxicology: effects, environmental fate and risk assessment.** Taylor & Francis, 1124p.
- Rao, M. V. N. & Prescott, D. M. (1967) Micronuclear RNA Synthesis in Paramecium caudatum. **The Journal of Cell Biology 33: 281-285p.**
- Rao, J. V.; Srikanth, K.; Arepalli, S. K. & Gunda, V. G. (2006) Toxic effects of acephate on Paramecium caudatum with special emphasis on morphology, behaviour, and generation time. **Pesticide Biochemistry and Physiology 86: 131-137p.**
- Romanelli, M.F.; Silva, G.P. & Borrelly, S.I. (2006) **Redução da Toxicidade do Surfactante LAS Tratado com o Feixe de Elétrons: 103-107p.**
- Rouabhi R, Berrebbah H, jebar MR (2006). Toxicity evaluation of Flucycloxuron and diflubenzuron on the cellular model, Paramecium sp. Afr.J. Biotechnol. 5(1): 45-48p.
- Rudorff, B. F. T.; Berka, L. M. S.; Moreira, M. A.; Duarte, V. & Rosa, V. G. C. (2004) **Estimativa de Área Plantada com Cana de açúcar em Municípios do Estado de São Paulo por meio de Imagens de Satélites e Técnicas de Geoprocessamento: Ano Safra 2004/2005.** Ministério da Ciência e

Tecnologia - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. São José dos Campos, 54p.

- Sauvant, M.P.; Pepin, D; Bohatier, J & Grolière, C.A. (1995) Microplate technique for screening and assessing cytotoxicity of xenobiotics with *Tetrahymena pyriformis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety 32**: 159-165p.
- Sauvant, M.P.; Pepin, D; Bohatier, J & Grolière, C.A & Guillot, J. (1997) Toxicity Assessment of 16 Inorganic Environmental Pollutants by Six Bioassays **Ecotoxicology and Environmental Safety 37**: 131-140p.
- Schreiber, B. & Brink, N. (1989) Pesticide toxicity using protozoans as test organisms. **Biology and Fertility of Soils 7**: 289 – 296p.
- Sherr, E. B. & Sherr, B. F. (1993). Preservation and storage of samples for enumeration of heterotrophic protists. In: KEMP; SHERR, B. F; SHERR, E. B. Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology, Lewis Publishers. 207-212p.
- Twagilimana, L.; Bohatier, J.; Grolière, C-A; Bonnemoy, F. & Sargos, D. (1998) A new low-cost microbiotest with the protozoan *Spirostomum teres*: culture conditions and assessment of sensitivity of the ciliate to 14 pure chemicals. **Ecotoxicology and Environmental Safety 41**: 231-244p.
- Wickham, S. A. & Gugenberger, E. (2008) Evaluating inducible morphological defences in the common freshwater ciliate, *Coleps hirtus*. **Journal of Plankton Research 30 (2)**: 1315 – 1321p.
- 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 the contemporary-use insecticide (fipronil) in an estuarine mesocosm. **Environmental Pollution 131**: 365-371p.
- Zucker, E. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure- Acute toxicity test for freshwater fish. 1985. (USEPA Publication 540/9-85-006).