

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

SIDARTA LOPES VIANA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA ÁGUA RESIDUÁRIA DA USINA DE  
BENEFICIAMENTO DA CASCA DO COCO VERDE EM GIRINOS DE  
*Leptodactylus vastus* (AMPHIBIA, ANURA, LEPTODACTYLIDAE)

FORTALEZA-CE  
2010

SIDARTA LOPES VIANA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA ÁGUA RESIDUÁRIA DA USINA DE  
BENEFICIAMENTO DA CASCA DO COCO VERDE EM GIRINOS DE  
*Leptodactylus vastus* (AMPHIBIA, ANURA, LEPTODACTYLIDAE)

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cascon

FORTALEZA-CE  
2010

V668a Viana, Sidarta Lopes

Avaliação da toxicidade da água residuária da usina de beneficiamento da casca do coco verde em girinos de *Leptodactylus vastus* (Amphibia, anura, leptodactylidae) / Sidarta Lopes Viana, 2010.

75 f. ; il. color. enc.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cascon

Área de concentração: Ecologia e conservação de águas doce e de estuários

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Biologia, Fortaleza, 2010.

1. Águas residuais-aspectos ambientais 2. Resíduos industriais 3. Testes de toxicidade 4. Indicadores biológicos I. Cascon, Paulo (orient.)

II. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais. III. Título

CDD 577

SIDARTA LOPES VIANA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA ÁGUA RESIDUÁRIA DA USINA DE  
BENEFICIAMENTO DA CASCA DO COCO VERDE EM GIRINOS DE  
*Leptodactylus vastus* (AMPHIBIA, ANURA, LEPTODACTYLIDAE)

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais. Área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais

Dissertação Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Paulo Cascon (Orientador)  
Departamento de Biologia  
Universidade Federal do Ceará- UFC

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Tédde Santaella  
Instituto de Ciências do Mar  
Universidade Federal do Ceará-UFC

---

Dr.<sup>a</sup> Paula Christine Jimenez  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia  
Universidade Federal do Ceará-UFC

Dedico essa dissertação para minha  
mãe, mulher de fibra e garra, fonte  
inesgotável de inspiração

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Paulo Cascon pela inspiração, atenção e dedicação que teve comigo, apesar de não ser um aluno exemplar ao nível que ele merece e ter muito que crescer como profissional. Agradeço não só pela orientação na Dissertação, que não se realizaria sem sua imensa ajuda, mas desde minha entrada no Laboratório de Zoologia Experimental, abrindo as portas para mim.

À Prof. Dra. Sandra Tédde Santaella do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), da Universidade Federal do Ceará (UFC), e ao Dr. Renato Carrhá Leitão, pesquisador da Embrapa - Agroindústria Tropical, pelo ajuda durante o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Sr. Orlando e demais integrantes da cooperativa da usina de beneficiamento de casca de coco verde do Jangurussú por gentilmente terem fornecido o LCCV usado nos experimentos.

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) pela concessão da licença para a realização do trabalho.

À instituição financiadora CAPES pelo apoio financeiro.

À minha mãe, Maria de Fátima Lopes Viana, por todo amor, cuidado e proteção comigo, sempre me incentivando na carreira que escolhi. Muito orgulhosa de seu filho, fazendo o possível e impossível para eu realizar os objetivos de minha vida. Proporcionado-me coisas distantes da nossa realidade, além de ser a mulher mais guerreira que conheci da qual tenho imenso orgulho.

O meu pai, Raimundo Justino Viana, pelo amor, orgulho de ter um filho formado que é muito para ele que teve poucos estudos, agradeço aos anos de convivência de muita amizade.

À minha avó, Rosa Gonçalves, por todo amor, ajudou a cuidar de mim, eu quando criança preferia almoçar em sua casa do que na de minha mãe, agradeço pelo carinho, por todas as orações e zelo que teve comigo.

Ao Prof. Roberto Feitosa que me ensinou algo mais que as disciplinas, me ensinando a pensar e refletir nas questões impostas e não apenas reproduzirmos o que estava nos livros, agradeço por ter me acolhido e orientado durante o tempo que estive no laboratório de embriologia e histologia animal.

À Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup> Vânia Maria Melo, pela fantástica presença vivida em suas aulas sempre despertando nosso raciocínio, umas das disciplinas mais interessantes e bem administradas, com seu espírito científico admirável.

Ao meu tio José Welligton Lopes de Oliveira que me inspirará por toda vida, grande homem que é, de capacidade imensurável e comparável aos grandes gênios da humanidade.

À Minha Tia Lúcia Maria Lopes de Oliveira, por ser uma mãe para mim com amor imenso, auxiliando na minha criação até a formação de homem, e estará no meu coração para sempre.

Aos meus primos que são irmãos, Narciso, Atahualpa, Ramon e Pablo, pelas experiências vividas, criação unida, o que sou hoje devo à eles, pois fazem parte de mim.

Ao meu amigo Paulo César (Paulim) pela grande e indispensável ajuda nos trabalhos científicos para realização dessa dissertação.

Aos meus amigos do Laboratório de Zoologia Experimental: Lucas, Felipe (amebinha), Igor, Carlos, Hilton, Bruno, Pricila, Carla e Sandra pelos muitos trabalhos realizados, momentos engraçados e pela imensa ajuda de todos para realização desta Dissertação.

À minha turma: Alípio, Alessandra, Alyne, Andréa, Bruno, Carlos Germano, Eugenio Pacelli, Fabio, Ivanilda, Jamili, Moacir, Juliana, Jussiara, Selma, Francisco Carlos, Ítalo

Francyregis, Ileana, Katiany, Lígia, Lincoln, Paulo Cesar por ser a melhor que passou na Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais da UFC pela união, amor, apesar de muitos trabalhos que cada um tenha que fazer seus projetos, não nos esqueçamos e sempre dando força uns aos outros nessa dura jornada.

Aos meus grandes amigos adotados por mim como irmãos Marcel, George, Luiz Gustavo, Felipe Bottona, Rodrigo Frutuoso, Samuel Martins, Paulo Cesar, Emmanuel, Ivo (castor), David (Cauby), Leandro, Renato pela imensa amizade, cumplicidade e confiança entre nós, levarei todos comigo para sempre.



**Motivo**

**Eu canto porque o instante existe  
e a minha vida está completa.  
Não sou alegre nem sou triste:  
sou poeta.**

**Irmão das coisas fugidias,  
não sinto gozo nem tormento.  
Atravesso noites e dias  
no vento.**

**Se desmorono ou se edifico,  
se permaneço ou me desfaço,  
— não sei, não sei. Não sei se fico  
ou passo.**

**Sei que canto. E a canção é tudo.  
Tem sangue eterno a asa ritmada.  
E um dia sei que estarei mudo:  
— mais nada.**

*Cecília Meireles*

## RESUMO

Os anfíbios apresentam algumas características que os tornam bioindicadores particularmente sensíveis da qualidade ambiental. No presente estudo, girinos da espécie de anuro *Leptodactylus vastus* A. Lutz, 1930 foram utilizados em bioensaios para avaliar a toxicidade do líquido da casca do coco verde (LCCV), subproduto do processo de beneficiamento da casca do coco verde. Foram analisados efeitos agudos como letalidade, e crônicos, como alterações na taxa de metamorfose, na duração da fase larval e na massa dos girinos por ocasião da metamorfose. Foi realizado um total de seis experimentos, cada um com duração de noventa dias, utilizando tanto LCCV extraído de cascas de coco mais frescas e que conservavam a coloração verde quanto LCCV extraído de cascas de coco mais secas cuja coloração tinha se tornado amarelada. Os quatro primeiros experimentos tiveram sete tratamentos cada, com concentrações de 0% (Controle); 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6% de LCCV. Os outros dois experimentos tiveram seis tratamentos cada, com concentrações de 0% (Controle); 0,3%; 0,6%; 0,9%; 1,2%; 1,5% de LCCV. Cada tratamento teve três réplicas com dez girinos cada. Os girinos foram coletados no Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, em locais e dias variados para evitar pseudo-replicação espacial e temporal. O LCCV apresentou um efeito tóxico sobre os girinos de *Leptodactylus vastus*, com aumento na letalidade e diminuição no tamanho na metamorfose, nas mais altas concentrações testadas. Entretanto, em algumas concentrações intermediárias, o LCCV contribuiu com um aumento na massa dos girinos por ocasião da metamorfose. Por outro lado, o LCCV nas concentrações testadas, não afetou a capacidade dos girinos sobreviventes de completar a metamorfose nem o tempo de duração da fase larval. Os girinos de *L.vastus* apresentaram uma correlação positiva entre massa por ocasião da metamorfose e duração do período larval, exceto nas mais altas concentrações de LCCV testadas. Os resultados indicam que o LCCV pode afetar negativamente as comunidades bióticas de ambientes aquáticos, se fazendo necessária a determinação de parâmetros seguros de sua emissão para o meio ambiente. Os girinos de *Leptodactylus vastus* mostraram um bom potencial de utilização em estudos ecotoxicológicos e como bioindicadores de perturbações em ambientes aquáticos, por sua espécie ser bastante comum e não se encontrar sob perigo ou ameaça de extinção, por suas fêmeas produzirem uma postura conspícua com grande número de ovos e larvas relativamente grandes e de fácil manipulação, e pelo fato destas larvas apresentarem fácil manejo em laboratório, não exigindo aeração ou filtração da água nem rações especiais.

Palavras-chave: Desenvolvimento Larval, Bioindicadores, Efluentes industriais.

## ABSTRACT

Amphibians have several characteristics that make them particularly sensitive bioindicators for environmental quality. In this study, tadpoles of the anuran species *Leptodactylus vastus* A. Lutz, 1930 were used in bioassays to evaluate the toxicity of the liquid from the coconut shell (LCCV), a byproduct of the processing of the green coconut shell. It was analyzed acute effects as lethality and chronic effects as changes in the rate of metamorphosis, in the length of the larval period and in the mass of the tadpoles at metamorphosis. It was performed a total of six experiments, each lasting ninety days, using both LCCV extracted from fresh coconut shells still greenish and LCCV extracted from dry coconut shells that had already become yellowish. The first four experiments had seven treatments each, with concentrations of 0% (control), 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5% and 0,6% of LCCV. The other two experiments had six treatments each, with concentrations of 0% (control); 0,3%; 0,6%; 0,9%; 1,2% and 1,5% of LCCV. Each treatment had three replicates with ten tadpoles each. The tadpoles were collected at Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, in different places and days to avoid pseudo-replication in space and time. The LCCV had a toxic effect on the tadpoles of *Leptodactylus vastus*, causing an increase in mortality and a decrease in size at metamorphosis, in the highest concentrations tested. However, in some intermediate concentrations, the LCCV contributed to an increase in the mass of tadpoles during metamorphosis. Moreover, in the concentrations tested, the LCCV did not affect the ability of surviving tadpoles to complete metamorphosis or the length of the larval period. Tadpoles of *L.vastus* showed a positive correlation between mass at metamorphosis and length of the larval period, except in the highest concentrations tested. These results indicate that the LCCV can negatively affect the biota of aquatic environments, making necessary to determine safe parameters of its emission to the environment. The tadpoles of *Leptodactylus vastus* showed a good potential for use in ecotoxicological studies and as bioindicators of disturbance in aquatic environments, as *L.vastus* is a quite common species that it is not under threat or danger of extinction, and that produce conspicuous ovipositions with many eggs and larvae relatively large and easily manipulated as they do not require aeration or filtration of water or a special diet.

Key-words: Larval Development, Bioindicators, Industrial Efluents.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Indivíduo adulto de <i>Leptodactylus vastus</i> , Campus do Pici, Fortaleza, CE.	20
Figura 02	Postura de ovos de <i>Letodactylus vastus</i> coletada no Campus do Pici, Fortaleza, CE.	26
Figura 03	Experimento I: Porcentagem de letalidade, sobrevivência na forma de girinos e metamorfose em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações do líquido da casca do coco verde (LCCV) “novo” durante um período de 90 dias.	31
Figura 04	Experimento II: Porcentagem de letalidade, sobrevivência na forma de girino e metamorfose em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações do líquido da casca do coco verde (LCCV) “velho” durante um período de 90 dias.	32
Figura 05	Experimento III: Porcentagem de letalidade, sobrevivência na forma de girino e metamorfose em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações do líquido da casca do coco verde (LCCV) “novo” durante um período de 90 dias.	33
Figura 06	Experimento IV: Porcentagem de letalidade, sobrevivência na forma de girino e metamorfose em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações do líquido da casca do coco verde (LCCV) “velho” durante um período de 90 dias.	34
Figura 07	Experimento V: Porcentagem de letalidade, sobrevivência na forma de girino e metamorfose em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de uma mistura 1:1 de líquido da casca do coco verde (LCCV) “velho” e “novo” durante um período de 90 dias.	34
Figura 08	Experimento VI: porcentagem de letalidade, sobrevivência na forma de girino e metamorfose em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de uma mistura 1:1 de líquido da casca do coco verde (LCCV) “velho” e “novo” durante um período de 90 dias.	35
Figura 09	Experimento I: massa média ( $\pm$ desvio padrão) por ocasião da metamorfose em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV “novo”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).	36
Figura 10	Experimento I: Tempo de duração médio da fase larval ( $\pm$ desvio padrão) em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV “novo” Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).	36

Figura 11	Experimento II: massa média ( $\pm$ desvio padrão) por ocasião da metamorfose em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV “velho”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).	37
Figura 12	Experimento II: Tempo de duração médio da fase larval ( $\pm$ desvio padrão) em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV “novo” Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).	37
Figura 13	Experimento III: massa média ( $\pm$ desvio padrão) por ocasião da metamorfose em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV “novo”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).	38
Figura 14	Experimento III: Tempo de duração médio da fase larval ( $\pm$ desvio padrão) em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV “novo” Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).	38
Figura 15	Experimento IV: massa média ( $\pm$ desvio padrão) por ocasião da metamorfose em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV “velho”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).	39
Figura 16	Experimento IV: Tempo de duração médio da fase larval ( $\pm$ desvio padrão) em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV “velho” Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).	39
Figura 17	Experimento V: massa média ( $\pm$ desvio padrão) por ocasião da metamorfose em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de uma mistura 1:1 de LCCV “velho” e “novo”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).	40
Figura 18	Experimento V: Tempo de duração médio da fase larval ( $\pm$ desvio padrão) em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de uma mistura 1:1 de LCCV “velho” e “novo”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).	40
Figura 19	Experimento VI: massa média ( $\pm$ desvio padrão) por ocasião da metamorfose em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de uma mistura 1:1 de LCCV “velho” e “novo”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).	41

Figura 20	Experimento VI: Tempo de duração médio da fase larval ( $\pm$ desvio padrão) em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de uma mistura 1:1 de LCCV “velho” e “novo”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).	41
Figura 21	Correlação entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV “novo” no experimento I.	42
Figura 22	Correlação entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV “novo” no experimento I.	43
Figura 23	Correlação entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV “velho” no experimento II.	43
Figura 24	Correlação entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV “novo” no experimento III.	44
Figura 25	Correlação entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV “velho” no experimento IV.	44
Figura 26	Correlação entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV “misturado” no experimento V.	45
Figura 27	Porcentagem de letalidade, sobrevivência na forma de girino e metamorfose em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações do LCCV durante um período de 90 dias. Dados do experimento I, II, III e IV.	46
Figura 28	Massa média ( $\pm$ desvio padrão) por ocasião da metamorfose de girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV. Dados dos experimentos I, II, III e IV agregados. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).	47
Figura 29	Tempo de duração médio da fase larval ( $\pm$ desvio padrão) de girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV. Dados dos experimentos I, II, III e IV agregados. Os números dentro das barras representam o n amostral. (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).	47
Figura 30	Correlação entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV. Dados dos experimentos I, II, III e IV agregados.	48
Figura 31	Porcentagem de letalidade, sobrevivência na forma de girino e metamorfose em girinos de <i>L. vastus</i> submetidos a diferentes concentrações do líquido da casca do coco verde (LCCV) durante um período de 90 dias. Dados dos experimentos V e VI agregados.	49

Figura 32	Massa média ( $\pm$ desvio padrão) por ocasião da metamorfose de girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV. Dados dos experimentos V e VI agregados. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).	50
Figura 33	Figura 33. Tempo de duração médio da fase larval ( $\pm$ desvio padrão) em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV. Dados dos experimentos V e VI agregados: Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).	50
Figura 34	Correlação entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV “misturado”. Dados dos experimentos V e VI agregados.	51
Figura 35	Porcentagem de letalidade, sobrevivência na forma de girino e metamorfose em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações do líquido da casca do coco verde (LCCV) “novo” durante um período de 90 dias. Experimento I e III agregados.	52
Figura 36	Massa média ( $\pm$ desvio padrão) por ocasião da metamorfose em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV “novo” Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si). Experimento I e III agregados.	53
Figura 37	Tempo de duração médio da fase larval ( $\pm$ desvio padrão) em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV “novo” Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si). Experimento I e III agregados.	53
Figura 38	Correlação entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV. Dados dos experimentos I e III agregados.	54
Figura 39	Porcentagem de letalidade, sobrevivência na forma de girino e metamorfose em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações do líquido da casca do coco verde (LCCV) “velho” durante um período de 90 dias. Experimento II e IV agregados.	55
Figura 40	Massa média ( $\pm$ desvio padrão) por ocasião da metamorfose em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV “velho” Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si). Experimento II e IV agregados.	56

Figura 41	Tempo de duração médio da fase larval ( $\pm$ desvio padrão) em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV “velho”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si). Experimento II e IV agregados.	56
Figura 42	Correlação entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval em girinos de <i>Leptodactylus vastus</i> submetidos a diferentes concentrações de LCCV “velho”. Dados dos experimentos II e IV agregados.	57
Figura 43	Média das determinações do oxigênio dissolvido (OD) realizadas após uma semana da renovação das diferentes concentrações de LCCV. Dados dos experimentos I, II, III e IV agregados. (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).	58
Figura 44	Média das determinações do pH realizadas após uma semana da renovação das diferentes concentrações de LCCV. Dados dos experimentos I, II, III e IV agregados (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).	58
Figura 45	Média das determinações do oxigênio dissolvido (OD) realizadas após uma semana da renovação das diferentes concentrações de LCCV. Dados dos experimentos V e VI agregados. (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).	59
Figura 46	Média das determinações do pH realizadas após uma semana da renovação das diferentes concentrações de LCCV. Dados dos experimentos V e VI agregados (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si)	59



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização físico-química do LCCV. *Laboratório de Saneamento da Universidade Federal do Ceará (Labosan). ** Laboratório de Gestão Ambiental da Embrapa Agroindústria Tropical (LGA). Fonte: Araújo, 2008.	22
Tabela 2	Data e local de coleta das posturas de <i>Leptodactylus vastus</i> no Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará.	26
Tabela 3	Tipo de LCCV utilizado, posturas que originaram os girinos e concentração de LCCV nos diversos tratamentos dos experimentos realizados para testar os efeitos do LCCV no desenvolvimento dos girinos de <i>Leptodactylus vastus</i>	28

# SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Coleta do material	25
3.2 Testes de Toxicidade	27
3.3 Análises Estatísticas	29
4 RESULTADOS	31
4.1 Letalidade e Taxa de metamorfose	31
4.2 Massa por Ocasão da Metamorfose e Duração da Fase Larval	36
4.3 Correlação entre Massa por Ocasão da Metamorfose e Duração da Fase Larval	42
4.4 Análise dos dados dos Experimentos I, II, III e IV agregados	46
4.4.1 Letalidade e Taxa de metamorfose	46
4.4.2 Massa por Ocasão da Metamorfose e Duração da Fase Larval	47
4.4.3 Correlação entre Massa por Ocasão da Metamorfose e Duração da Fase Larval	48
4.5 Análise dos dados dos Experimentos V e VI agregados	49
4.5.1 Letalidade e Taxa de metamorfose	49
4.5.2 Massa por Ocasão da Metamorfose e Duração da Fase Larval	50

4.5.3 Correlação entre Massa por Ocasão da Metamorfose e Duração da Fase Larval	51
4.6 Análise dos dados dos Experimentos I e III agregados	52
4.6.1 Letalidade e Taxa de metamorfose	52
4.6.2 Massa por Ocasão da Metamorfose e Duração da Fase Larval	53
4.6.3 Correlação entre Massa por Ocasão da Metamorfose e Duração da Fase Larval	54
4.7 Análise dos dados dos Experimentos II e IV agregados	55
4.7.1 Letalidade e Taxa de metamorfose	55
4.7.2 Massa por Ocasão da Metamorfose e Duração da Fase Larval	56
4.7.3 Correlação entre Massa por Ocasão da Metamorfose e Duração da Fase Larval	57
4.8 Fatores Abióticos	58
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	68

## 1. INTRODUÇÃO

Os anfíbios constituem um dos táxons mais interessantes de animais, por representarem, na história evolutiva dos vertebrados, um estágio da transição do meio aquático para o terrestre. Na classificação zoológica tradicional, os anfíbios apresentam a seguinte posição taxonômica: Filo Chordata, Subfilo Vertebrata, Superclasse Tetrapoda, Classe Amphibia. Todas as formas viventes de anfíbios pertencem à Subclasse Lissamphibia que se encontra dividida em três ordens: Caudata, com formas tetrápodes e com cauda, conhecidas como salamandras; Anura, com formas tetrápodes, sem cauda e com adaptações para o salto, conhecidas como sapos, pererecas, rãs e jias; e Gymnophiona, com formas de corpo alongado e sem patas, conhecidas como cobras-cegas.

Em todo o mundo, já foram registradas 6433 espécies de anfíbios, com 88% delas pertencentes ao táxon Anura (FROST, 2009) e a maioria distribuída em regiões tropicais. Para a fauna brasileira, já houve o registro de 849 espécies de anfíbios, sendo 821 anuros, uma salamandra e 27 espécies de cobras-cegas (SBH, 2009), constituindo a anfíbiofauna mais rica entre todos os países do mundo.

Uma das características mais marcantes dos anfíbios é a presença, na maioria das espécies, de uma fase larval aquática dulcícola conhecida como girino que sofre metamorfose e se transforma em um adulto de existência aquática, anfíbia ou terrestre. As formas larvais e adultas apresentam diferenças morfofisiológicas acentuadas, mas mesmo os adultos que levam uma existência terrestre continuam apresentando uma dependência a ambientes úmidos devido à permeabilidade de sua pele que constitui uma importante superfície respiratória.

Os anfíbios apresentam uma grande relevância ecológica, sendo importantes consumidores terciários ou quaternários em ecossistemas florestais (STEWART; WOOLBRIGHT, 1996). Estudos recentes demonstraram que os anfíbios da serrapilheira exercem um controle substancial da densidade de suas presas, desempenhando, assim, um importante papel na regulação da dinâmica de nutrientes da floresta (WYMAN 1998; BEARD; VOGT; KULMATISKI, 2002). A valia desse papel é reforçada pela grande abundância local que esses animais podem apresentar em alguns ecossistemas e por seu efeito direto sobre o fluxo de nutrientes, através do consumo substancial de fitoplâncton durante a

fase larvária (SEALE, 1980). Destaca-se ainda a sua função, ímpar entre os vertebrados, no transporte de nutrientes entre os ecossistemas aquáticos e terrestres.

Certas características dos anfíbios – como a posse de uma pele permeável, a postura de ovos e embriões pouco protegidos em massas gelatinosas transparentes, a presença de um estágio larval livre-natante em seu ciclo de vida, sua intensa filopatria (fidelidade de hábitat com reduzida capacidade de dispersão e áreas domiciliares pequenas), a utilização de um largo espectro de habitats através de um contínuo entre o ambiente terrestre e o ambiente aquático, certos aspectos de sua biologia populacional (incluindo uma vida longa em populações relativamente estáveis), a complexidade de suas interações nas comunidades e a facilidade de estudo – os fazem organismos particularmente apropriados da qualidade ambiental. Os anfíbios respondem rapidamente a fatores como fragmentação do hábitat, alterações hidrológicas e na química da água de ambientes aquáticos, contaminação do ar e da água e variações climáticas de larga escala (U.S-EPA, 2002, ANDREANI; SANTUCCI; NASCETTI, 2003).

Os anfíbios são indicadores especialmente efetivos de alterações em ambientes aquáticos, incluindo o aporte de sedimentos finos (WELSH; OLLIVIER, 1998), a contaminação por metais pesados e poluentes de diferentes origens (POLLET; BENDELL-YOUNG 2000, RELYEA, 2005a) e o aumento da temperatura da água (WELSH, 1990). As altas concentrações de alguns poluentes podem induzir severas deformidades nos girinos, como a intensa redução das estruturas orais usadas na alimentação, que podem atingir até 96% dos indivíduos de uma população e diminuir sua taxa de crescimento por meio da redução de sua capacidade de forrageio (CHRISTOPHER *et al.*, 1996). Mudanças climáticas globais podem provocar mudanças na fenologia de espécies de diferentes grupos (McCARTY, 2001), incluindo as épocas reprodutivas dos anuros (BEEBEE, 1995).

Como consequência do exposto acima, os anfíbios têm sido usados em estudos na área da biologia da conservação, como bioindicadores na avaliação da magnitude de perturbações antrópicas, no monitoramento de tendências populacionais de outras espécies e na identificação de áreas de alta diversidade regional (CARO; O'DOHERTY, 1999; NIEMI; MCDONALD, 2004).

Nos últimos 30 anos, tem sido registrado um declínio de populações de anfíbios em todo o mundo, caracterizado por colapsos populacionais e extinções maciças localizadas. Em 1993, mais de 500 espécies de anuros e salamandras dos cinco continentes apresentavam

um declínio nas suas populações (VIAL; SAYLOR, 1993). A União Internacional de Conservação da Natureza (UICN) no relatório de 2008, cita que 23% das espécies de anfíbios estava ameaçada ou extinta e que se desconhecia o estado de outros 25%. Além disso, 43% do total de espécies teve diminuição significativa do tamanho das suas populações. Este declínio está afetando milhares de espécies em todos os tipos de ecossistemas, tendo sido considerado uma das ameaças mais críticas à biodiversidade global (ALFORD; RICHARDS, 1999).

Os declínios e extinções maciças das populações de anfíbios são um problema global com causas locais complexas. Entre as causas pode-se citar: um aumento nos índices de radiação ultravioleta (consequência da diminuição da camada de ozônio atmosférico), a introdução de espécies exóticas de predadores, a fragmentação e destruição de habitat, a toxicidade e acidez ambiental, enfermidades emergentes, mudanças climáticas, e interações entre estes fatores (WELLS, 2007).

A espécie de anuro *Leptodactylus vastus* A. Lutz, 1930 (figura 1) que foi estudada neste trabalho, é endêmica da região nordeste do Brasil, sendo conhecida como jia ou rã pimenta do nordeste. Ela ocorre em formações vegetacionais abertas, incluindo o domínio da Caatinga e a porção adjacente norte do domínio do Cerrado (HEYER, 2005). *L.vastus* pertence ao grupo “pentadactylus” constituído por espécies que depositam ninhos de espuma em depressões ou buracos nas margens ou perto de corpos de água e produzem girinos exotróficos, que são aqueles que se alimentam no período larval (HEYER, 1969; PRADO; UETANABARO, 2002). O girino de *L. vastus* foi descrito por Vieira; Santana; Vieira (2007) sendo de forma geral, morfologicamente semelhante aos girinos das outras espécies do grupo de *L. pentadactylus*.



Figura 1. Indivíduo adulto de *Leptodactylus vastus*, Campus do Pici, Fortaleza, CE.

O crescimento da produção agroindustrial, se por um lado é de fundamental importância para o desenvolvimento de um país, por outro contribui para o aumento na geração de resíduos que podem gerar impacto negativo sobre o ambiente (ROSA *et al.*, 2001). A contaminação de ambientes aquáticos por efluentes de indústrias é considerada um grave problema ambiental por afetar as comunidades biológicas, diminuindo sua diversidade. Este assunto é de relevante interesse para o ramo da ecologia da conservação que se ocupa da remediação e prevenção dos efeitos de efluentes emergentes que surgem devidos às diversificações das indústrias e seus subprodutos. A compreensão dos efeitos dos contaminantes e do modo com que eles interagem com a biota é de fundamental importância para garantir a manutenção da biodiversidade.

O consumo da água-de-coco verde vem despertando interesse cada vez maior no mercado nacional e internacional e conseqüentemente, sua produção vem crescendo de forma acelerada. O aumento na produção é, naturalmente, acompanhado pelo aumento na geração de seus resíduos, constituídos pelas cascas do coco, que representam cerca de 80% a 85% do peso bruto do produto (ROSA *et al.*, 2001). Este aumento na geração de resíduos representa um problema ambiental, principalmente nos grandes centros urbanos, já que este material é de difícil descarte devido a sua composição rica em lignina e celulose, podendo levar em média dez anos para ser biodegradado. Como conseqüência, as cascas de coco verde se acumulam em lixões e aterros sanitários, diminuindo a vida útil destes, além de servirem como focos de proliferação de vetores de doenças, afetando desta maneira, a saúde pública (CARRIJO; LIZ; MAKISHIMA, 2002). Estima-se que o volume deste tipo de resíduo produzido no Brasil, seja superior a um milhão de toneladas por ano (PINTO, 2003).

A fim de minimizar essas conseqüências negativas para o meio ambiente, o projeto "Uso da casca de coco verde como forma de conservação da biodiversidade", foi desenvolvido por pesquisadores da Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA) com o objetivo de dar um destino adequado aos resíduos gerados na indústria e comércio de coco verde, reaproveitando-os para novas aplicações (ROSA *et al.*, 2001). O projeto consiste no beneficiamento da casca do coco verde que, após processamento, é transformada em subprodutos divididos em pó e fibras, que podem ser usados para os mais diversos fins, como a confecção de peça para artesanato. Entretanto, este processo de beneficiamento da casca do coco verde resulta na produção do efluente conhecido como líquido da casca do coco verde (LCCV).

O LCCV apresenta altos níveis de taninos que são polifenóis polimerizados variando em massa molecular de 500 a 3000 Da, diferindo de outros polifenóis por serem capazes de precipitar de forma irreversível proteínas, polissacarídeos, alcalóides e gelatina, agindo como coagulantes naturais (TRUGILLHO *et al.*, 1997; HASLAM, 1999 e SPENCER *et al.*, 1998). Para entender e determinar as propriedades físicas e químicas do LCCV, Araújo (2008) realizou a caracterização físico-química do mesmo (Tabela 1).

Tabela 1- Caracterização físico-química do LCCV. \*Laboratório de Saneamento da Universidade Federal do Ceará (Labosan). \*\* Laboratório de Gestão Ambiental da Embrapa Agroindústria Tropical (LGA). Fonte: Araújo, 2008.

<b>Variável</b>	<b>Unidade</b>	<b>Nº de determinações</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
DBO *	g/L	2	41,2	-
DQO**	g/L	60	63,5	12,03
Fenólicos totais**	g/L	15	5,95	1,01
Açúcares**	g/L	2	45,10	-
Alcalinidade Total*	g/L	2	1,01	-
pH**	-	60	4,91	0,38
Condutividade*	mS/cm	2	8,75	-
Amônia*	mg/L	2	746	-
Nitrito*	mg/L	2	0,42	-
Nitrato*	mg/L	2	66	-
Fósforo Total*	mg/L	2	130	-
Sólidos Totais**	g/L	18	65,30	1,24
Sólidos Fixos**	g/L	18	6,16	438
Sólidos Voláteis**	g/L	18	59,10	1,29



A ecotoxicologia é um ramo da toxicologia que se desenvolveu com a preocupação de estudar os efeitos tóxicos causados por poluentes naturais e sintéticos nos constituintes dos ecossistemas, incluindo animais, vegetais e microrganismos, em um contexto integrado (TRUHAUT; BUTLER, 1978; FERNICOLA; BOHRER-MORER; BAINY, 2003). Esses efeitos são resultantes de combinações de um enorme número de processos, os quais podem ser observados desde os níveis de estrutura atômica e molecular até níveis globais. A ecotoxicologia interage diretamente com outras áreas da ecologia numa visão interdisciplinar, possibilitando um melhor entendimento dos resultados e auxiliando na tomada de decisões rápidas e seguras para minimizar os impactos de poluentes introduzidos no meio ambiente.

Os estudos ecotoxicológicos são fundamentados em bioensaios realizados em laboratório para monitoramento de poluição e contaminação do ambiente aquático utilizando, para tanto, espécies bioindicadoras. Os bioensaios ou testes de toxicidade consistem na exposição de organismos testes a uma ou mais amostras, por tempo determinado e posterior análise das respostas manifestadas (US-EPA, 1994). Entende-se por toxicidade qualquer efeito adverso manifestado por um organismo, que pode incluir desde alterações fisiológicas até a letalidade (RAND; PETROCELLI, 1985). Os bioensaios permitem uma visão abrangente das toxicidades aguda e crônica dos poluentes que, eventualmente alcançam o ambiente e podem exercer efeitos negativos sobre a biota. Esses testes representam um valioso instrumento para avaliação de contaminantes aquáticos, mesmo quando presentes em níveis abaixo do limite de detecção analítica convencional. Entende-se por toxicidade qualquer efeito adverso manifestado por organismos testes, que podem incluir desde alterações fisiológicas até a letalidade (RAND; PETROCELLI, 1985).

A hipótese deste trabalho é que o LCCV pode alcançar o meio ambiente aquático e exercer ação negativa sobre a biota. Os estudos se basearam na análise de possíveis efeitos do LCCV sobre o desenvolvimento de girinos de espécie *Leptodactylus vastus* A. Lutz, 1930 do Campus do Pici, Fortaleza, Ceará. Foram analisados efeitos agudos, como letalidade, e crônicos, como alterações na taxa de metamorfose, na duração da fase larval e na massa dos girinos por ocasião da metamorfose.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade do líquido da casca do coco verde (LCCV) sobre girinos da espécie *Leptodactylus vastus*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a taxa de letalidade de girinos de *L. vastus* expostos a diferentes concentrações de LCCV.
- Determinar a concentração letal média  $CL_{50}$  (concentração que causa letalidade em 50% dos indivíduos) do LCCV para o organismo testado.
- Analisar o efeito do LCCV em diferentes concentrações sobre a taxa de metamorfose dos girinos de *L. vastus*.
- Analisar o efeito do LCCV em diferentes concentrações sobre a massa dos girinos de *L. vastus* por ocasião da metamorfose.
- Analisar o efeito do LCCV em diferentes concentrações sobre o tempo de duração da fase larval de *L. vastus*.
- Investigar a existência de uma correlação entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval em girinos de *L.vastus*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta do Material

O uso e captura das posturas de *L. vastus* foi autorizado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA), através da licença nº 18392-1.

O LCCV utilizado nos experimentos foi coletado na usina de beneficiamento da casca de coco verde localizada junto ao aterro de lixo do Jangurussú, Fortaleza, Ceará, tendo sido transferido para o laboratório dentro de galões de plástico com capacidade de 5 litros, acondicionados em caixas térmicas com gelo. No laboratório, o LCCV foi mantido sob refrigeração até uma hora antes de sua utilização, para possibilitar a equalização de sua temperatura com a do ambiente, que foi mantida em torno de 25°C, já que a temperatura é um dos fatores que pode influenciar o desenvolvimento de anfíbios (GERLANC; KAUFMAN, 2005).

As nove posturas de *L.vastus* (Figura 2) que deram origem aos girinos utilizados nos experimentos, foram coletadas no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, em locais e dias variados (tabela 2) para evitar pseudo-replicação espacial e temporal. As posturas foram cuidadosamente transferidas em baldes de 20 litros e bandejas de plástico, de modo a não comprometer a sua estrutura, para o laboratório, onde foram mantidas em aquários de 40 litros com aeração constante até a eclosão das larvas.

Tabela 2 - Data e local de coleta das posturas de *Leptodactylus vastus* no Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará.

<b>Postura</b>	<b>Data da coleta</b>	<b>Local da Coleta</b>
<b>A e B</b>	26.01.09	Junto ao tanque de água do Jardim Botânico do Depto. de Biologia
<b>C e D</b>	30.01.09	Área a jusante da barragem do Açude Santo Anastácio
<b>E</b>	02.02.09	Junto ao tanque de água do Jardim Botânico do Depto. de Biologia
<b>F</b>	02.02.09	Área a jusante da barragem do Açude Santo Anastácio
<b>G e H</b>	09.02.09	Junto ao tanque de água do Jardim Botânico do Depto. de Biologia



Figura 2. Postura de ovos de *Leptodactylus vastus* coletada no Campus do Pici, Fortaleza, CE.

### 3.2 Testes de Toxicidade

Nos testes de toxicidade do LCCV sobre os girinos de *L. vastus* foram analisados efeitos agudos e crônicos. O efeito agudo analisado foi a taxa de letalidade e os efeitos crônicos foram modificações na taxa de metamorfose, na duração da fase larval e no tamanho dos indivíduos por ocasião da metamorfose.

Nos experimentos foram utilizados dois tipos diferentes de líquido da casca do coco verde (LCCV). O primeiro tipo foi extraído de cascas de coco mais frescas e que conservavam a coloração verde (LCCV “novo”) enquanto que o segundo tipo foi extraído de cascas de coco mais secas cuja coloração tinha se tornado amarelada (LCCV “velho”).

Foram realizados seis experimentos foi realizado (tabela 3), dois com LCCV “novo” (Exp. I e III), dois com LCCV “velho” (Exp. II e IV) e dois com uma mistura de partes iguais de LCCV “novo” e “velho” (Exp. V e VI). Cada experimento durou noventa dias e as concentrações de LCCV nos tratamentos foram determinadas através de testes piloto. Todos os experimentos tiveram o mesmo desenho experimental, mas os experimentos I e II usaram girinos provenientes de posturas diferentes que os experimentos III e IV, assim como o experimento V usou girinos provenientes de posturas diferentes que o experimento VI, de modo a minimizar um possível efeito genético. Os experimentos I, II, III e IV tiveram seis tratamentos mais o controle enquanto que os experimentos V e VI tiveram cinco tratamentos e o controle. Cada tratamento teve três replicações, sendo que cada replicação correspondia a um recipiente plástico cilíndrico de 2 litros, com altura de 16 cm e diâmetro de 14 cm, preenchido até sua capacidade máxima com uma solução de água com LCCV. Em cada recipiente foram colocados 10 girinos em uma fase inicial de desenvolvimento, correspondente ao estágio 26 da tabela de Gosner (1960), totalizando 210 girinos por experimento nos experimentos I, II, III e IV e 180 girinos por experimento, nos experimentos V e VI. Os recipientes permaneceram cobertos por tampas perfuradas ao longo dos experimentos.

Tabela 3 - Tipo de LCCV utilizado, posturas que originaram os girinos e concentração de LCCV nos diversos tratamentos dos experimentos realizados para testar os efeitos do LCCV no desenvolvimento dos girinos de *Leptodactylus vastus*.

<b>Experimento</b>	<b>LCCV</b>	<b>Posturas</b>	<b>Concentração de LCCV nos Tratamentos</b>
<b>I</b>	novo	A e B	0% (Controle); 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%
<b>II</b>	velho	A e B	0% (Controle); 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%
<b>III</b>	novo	E e F	0% (Controle); 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4 %; 0,5%; 0,6%
<b>IV</b>	velho	E e F	0% (Controle); 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%
<b>V</b>	mistura 1:1 velho e novo	D, E e F	0% (Controle); 0,3%; 0,6%; 0,9%; 1,2%; 1,5%
<b>VI</b>	mistura 1:1 velho e novo	C, G e H	0% (Controle); 0,3%; 0,6%; 0,9%; 1,2%; 1,5%

As soluções dos recipientes eram completamente renovadas semanalmente. Imediatamente depois de cada troca de solução os girinos eram alimentados com uma mistura de três partes de ração para coelhos PURINA® e uma parte de ração comercial para peixes ornamentais marca NUTRA-FISH BÁSICA® na quantidade de 0,1 g por indivíduo. O pH e o oxigênio dissolvido das soluções foram determinados imediatamente antes de cada troca com o uso de pHmetro HANNA® HI 98127 e oxímetro LUTRON® DO-5510, respectivamente. A água utilizada nos experimentos era captada na rede de distribuição e armazenada em recipientes descobertos e com aeração constante por, pelo menos, 24 horas antes do uso, para remoção do cloro por evaporação.

Durante os experimentos, os recipientes foram monitorados diariamente, quando era feita a contagem do número de girinos vivos e retirada dos mortos. Estes eram transferidos para solução de formol (10%) em microtubos do tipo “ependorf” de 15 ml etiquetados e com formol a 10%. Os girinos sobreviventes que apresentavam quatro patas, correspondente ao

estágio 42 da tabela de Gosner (op.cit.), eram pesados em balança analítica com precisão de 0,001g e transferidos para potes de plástico (250 ml) com tampa perfurada e quantidade de água suficiente para evitar o seu dessecamento. Quando completavam a reabsorção completa da cauda, correspondente ao estágio 46, segundo Gosner (op.cit.) estes girinos eram devolvidos para o ambiente onde as posturas haviam sido coletadas. Neste trabalho, considerou-se que a fase larval tenha começado dez dias antes do início dos experimentos (data aproximada da eclosão dos girinos) e terminado quando os girinos alcançavam o estágio 42 segundo a tabela de Gosner (1960).

As taxas de letalidade, metamorfose e sobrevivência na forma de girino e as médias da massa por ocasião da metamorfose e do tempo de duração da fase larval, assim como a correlação entre estes dois últimos parâmetros, foram analisadas para cada experimento separadamente. As mesmas taxas e médias foram analisadas também, agregando os dados dos experimentos que utilizaram as mesmas concentrações de LCCV (I, II, III e IV; V e VI). Finalmente, foram agregados e analisados em conjunto os dados dos experimentos onde foi utilizado o LCCV novo (I e III) e os dados dos experimentos onde foi utilizado o LCCV velho (II e IV), de modo a permitir a comparação da toxicidade dos mesmos.

### **3.3 Análise Estatística**

A massa dos girinos por ocasião da metamorfose e a duração da fase larval foram analisadas a partir da média e do desvio padrão entre os tratamentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os resultados obtidos utilizou-se da análise de variância (ANOVA): um critério, seguida de Student Newman Keuls (comparações múltiplas) com nível de significância de 5%, utilizando o programa BIOESTAT versão 5.0.

Para verificar se os dois tipos de LCCV (novo e velho) afetaram de forma diferenciada a letalidade e os parâmetros de desenvolvimento analisados, os resultados dos experimentos com os dois tipos de LCCV foram comparados com o uso do teste da ANOVA.

Nos testes de toxicidade aguda, a  $CL_{50}$  foi determinada pelo método trimmed Spearman-Kärber com limite de 95% de confiança (HAMILTON *et al.*, 1978), utilizando o programa estatístico TRIMMED SPEARMAN-KARBER versão 1,5.

O teste estatístico de correlação de Spearman para dados não paramétricos, utilizando o programa BIOESTAT versão 5.0, foi utilizado para o cálculo da correlação entre o tempo médio que os girinos despenderam para completar a metamorfose e a massa média que eles apresentaram nesta ocasião entre os diferentes tratamentos.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Letalidade e taxa de metamorfose

**Experimento I (figura 3):** A letalidade esteve, de modo geral, positivamente relacionada com a concentração de LCCV, embora a taxa da concentração 0,2% tenha sido maior que a da concentração 0,3%. A  $CL_{50}$  foi de 0,30 % do LCCV (95% de intervalo de confiança entre 0,25 a 0,37%). A taxa de metamorfose pareceu não variar em função da concentração de LCCV, tendo apresentado seus maiores valores em concentrações intermediárias. A sobrevivência na forma de girino somente ocorreu nos três tratamentos que apresentaram as menores taxas de letalidade, tendo sido inversamente proporcional a estas.

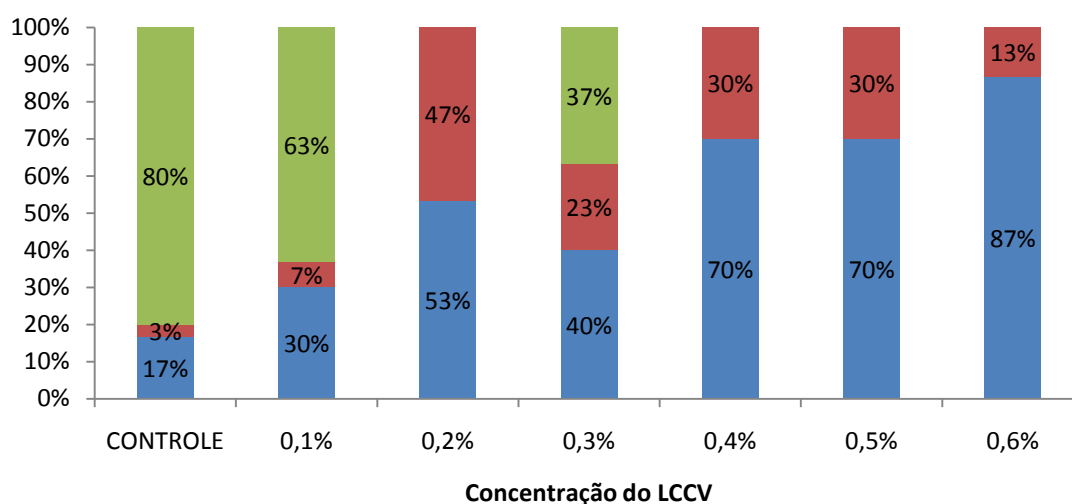


Figura 3. Experimento I: Porcentagem de letalidade, sobrevivência na forma de girino e metamorfose em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações do líquido da casca do coco verde (LCCV) “novo” durante um período de 90 dias.

**Experimento II (figura 4):** a letalidade apresentou os maiores valores nos duas maiores concentrações, entretanto, entre as demais concentrações não houve uma relação entre letalidade e concentração de LCCV. A  $CL_{50}$  foi de 0,45% (95% de intervalo de confiança entre 0,43 a 0,48%). As maiores taxas de metamorfose ocorreram nas concentrações intermediárias e na maior concentração, enquanto que as maiores taxas de

sobrevivência como girinos foram encontradas nos tratamentos com menor letalidade, sendo que na concentração 0,3%, não permaneceram indivíduos na forma de girinos porque todos os sobreviventes metamorfosearam.

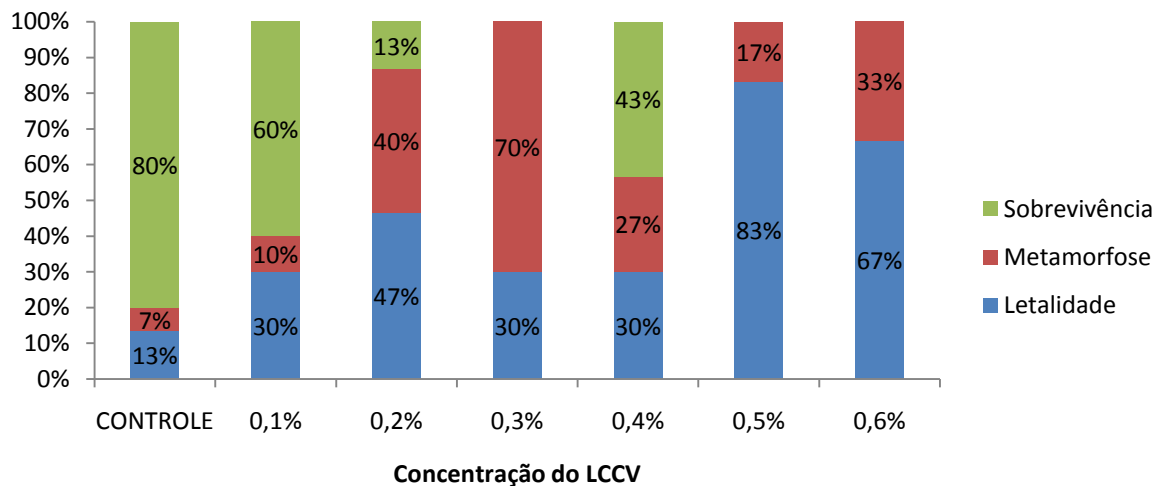


Figura 4. Experimento II: Porcentagem de letalidade, sobrevivência na forma de girino e metamorfose em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações do líquido da casca do coco verde (LCCV) “velho” durante um período de 90 dias.

**Experimento III (figura 5):** a letalidade apresentou os maiores valores nos duas maiores concentrações e na concentração de 0,2%. O  $CL_{50}$  foi de 0,53% (95% de intervalo de confiança entre 0,49 a 0,57%). As duas maiores taxas de metamorfose foram registradas em concentrações intermediárias em que a letalidade mais se aproximou de 50%, enquanto que as três maiores taxas de sobrevivência como girinos foram encontradas nos três tratamentos com menores taxas de letalidade.

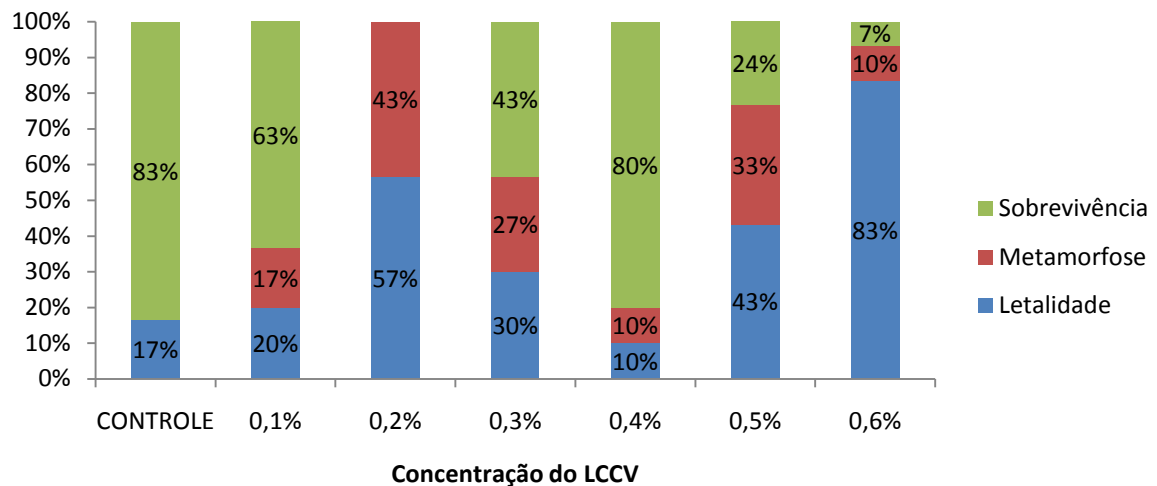


Figura 5. Experimento III: Porcentagem de letalidade, sobrevivência na forma de girino e metamorfose em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações do líquido da casca do coco verde (LCCV) “novo” durante um período de 90 dias.

**Experimento IV (figura 6):** a letalidade esteve, de modo geral, positivamente relacionada com a concentração de LCCV, embora ela tenha sido igual nas concentrações 0,2% e 0,6%. Não foi possível calcular a  $CL_{50}$ , pois o mesmo se encontrou fora das concentrações testadas. As menores taxas de metamorfose e as maiores taxas de sobrevivência na forma de girino foram apresentadas pelo tratamento com menor concentração 0,1% e o grupo controle, que também apresentaram as menores taxas de letalidade. Entre os demais tratamentos, as taxas de metamorfose e de sobrevivência na forma de girino pareceram não variar em função da concentração de LCCV.

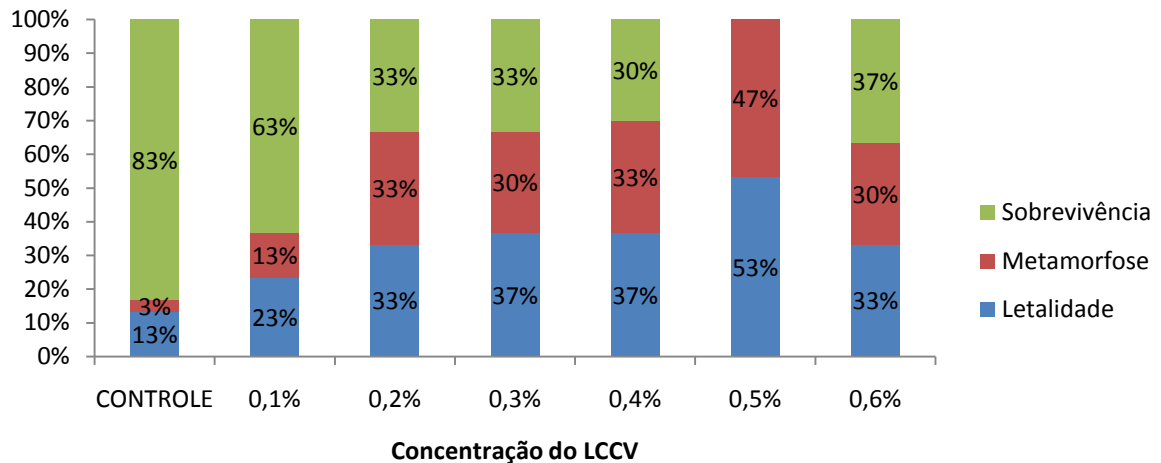


Figura 6. Experimento IV: Porcentagem de letalidade, sobrevivência na forma de girino e metamorfose em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações do líquido da casca do coco verde (LCCV) “velho” durante um período de 90 dias.

**Experimento V (figura 7):** a letalidade aumentou com a concentração, atingindo 100% dos girinos nas duas maiores concentrações (1,2 e 1,5%) e tendo sido muito próxima de 100% na concentração de 0,9%. A  $CL_{50}$  foi igual 0,62% (95% de intervalo de confiança entre 0,57 a 0,69%). Nos três tratamentos em que ocorreu metamorfose esta, pareceu não variar em função da concentração de LCCV, enquanto que a sobrevivência na forma de girinos apresentou os maiores valores no tratamento de menor concentração 0,3% mais o controle e que também apresentaram as menores taxas de letalidade.

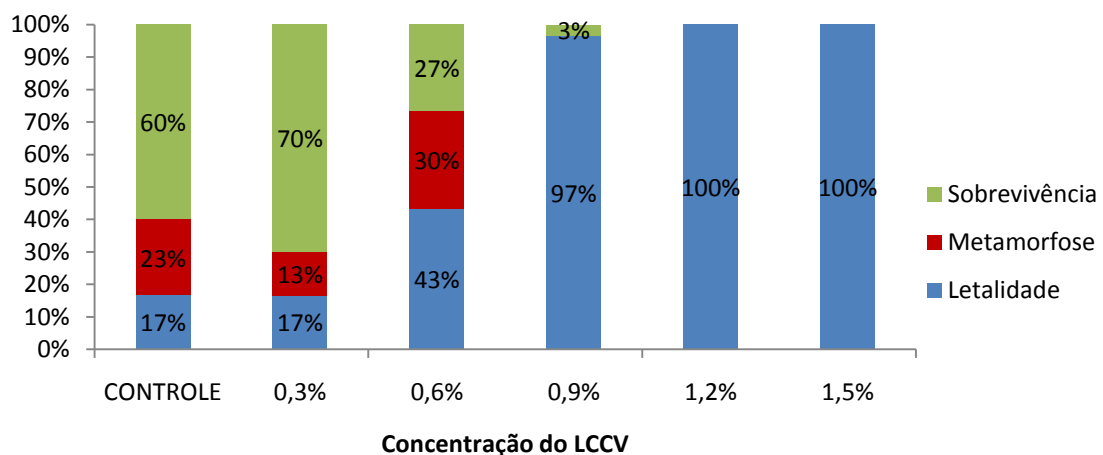


Figura 7. Experimento V: Porcentagem de letalidade, sobrevivência na forma de girino e metamorfose em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de uma mistura 1:1 de líquido da casca do coco verde (LCCV) “velho” e “novo” durante um período de 90 dias.

**Experimento VI (figura 8):** a letalidade demonstrou correlação positiva com a concentração de LCCV atingindo 100% dos girinos nas duas maiores concentrações (1,2 e 1,5%). A concentração letal média foi de 0,71% (95% de intervalo de confiança entre 0,56 a 0,92). As maiores taxas de metamorfose foram registradas nos tratamentos com concentrações intermediárias (0,3% e 0,6%) entre aqueles que apresentaram metamorfose, enquanto que as duas maiores taxas de sobrevivência como girinos foram encontradas no tratamento 0,3% e no controle e que também apresentaram as menores taxas de letalidade.

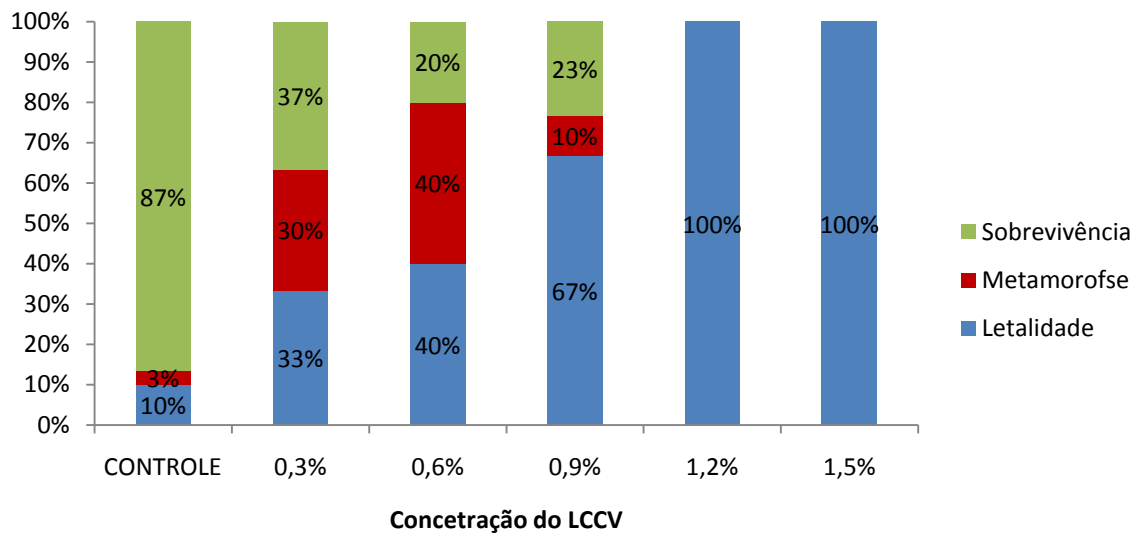


Figura 8. Experimento VI: Porcentagem de letalidade, sobrevivência na forma de girino e metamorfose em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de uma mistura 1:1 de líquido da casca do coco verde (LCCV) “velho” e “novo” durante um período de 90 dias.

## 4.2 Massa por Ocasão da Metamorfose e Duração da Fase Larval

**Experimento I** (figuras 9 e 10): as maiores massas foram alcançadas nas concentrações intermediárias (0,3% e 0,4%), entretanto as diferenças entre as médias das massas de todos os tratamentos não foram significativas ( $p=0,3481$ ). O tempo de duração da fase larval não variou em função da concentração de LCCV, com as diferenças entre as médias se mostrando não significativas ( $p=0,6400$ ).

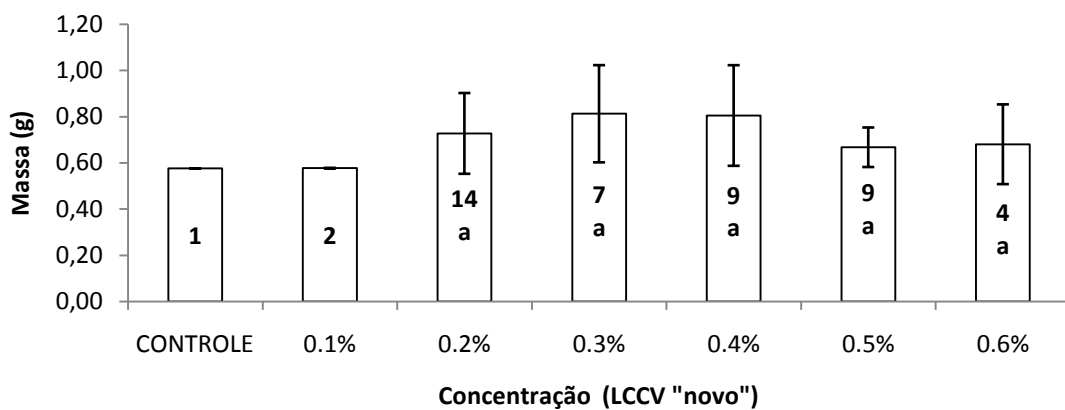


Figura 9. Experimento I: Massa média ( $\pm$  desvio padrão) por ocasião da metamorfose em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV “novo”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).

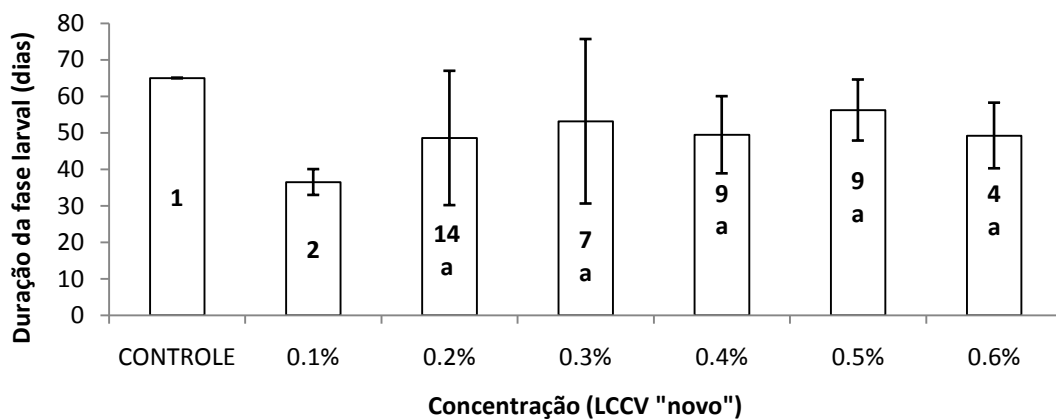


Figura 10. Experimento I: Tempo de duração médio da fase larval ( $\pm$  desvio padrão) em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV “novo”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).

**Experimento II** (figuras 11 e 12): os resultados indicaram relação positiva entre a massa média dos girinos e a concentração de LCCV, seguida por queda na maior concentração, com diferenças significativas ( $p= 0,0095$ ). O tempo de duração da fase larval foi maior nos tratamentos 0,4% e 0,6%, entretanto as diferenças não foram significativas entre os tratamentos ( $p=0,1610$ ).

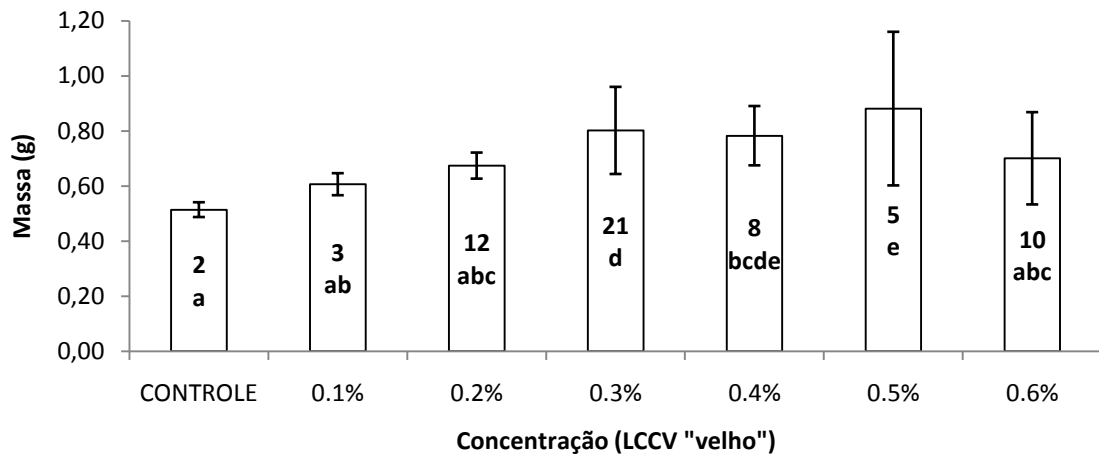


Figura 11. Experimento II: massa média ( $\pm$  desvio padrão) por ocasião da metamorfose em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV “velho”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).

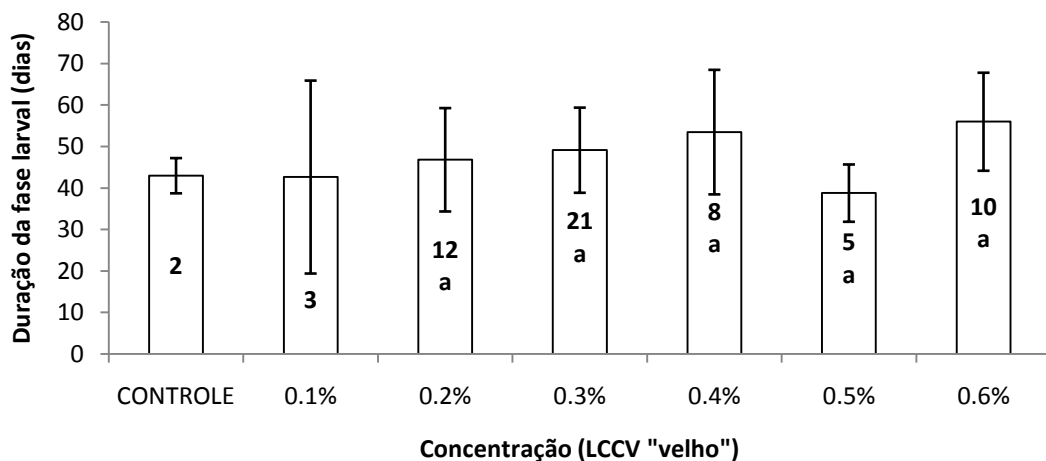


Figura 12. Experimento II: Tempo de duração médio da fase larval ( $\pm$  desvio padrão) em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV “novo”. Os números dentro das barras representam o n amostral. (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).

**Experimento III** (figuras 13 e 14): as massas dos girinos variaram pouco entre os diversos tratamentos, e as diferenças não foram significativas ( $p=0,5519$ ). O tempo de duração da fase larval também não apresentou diferenças significativas entre os diversos tratamentos ( $p=0,8926$ ).

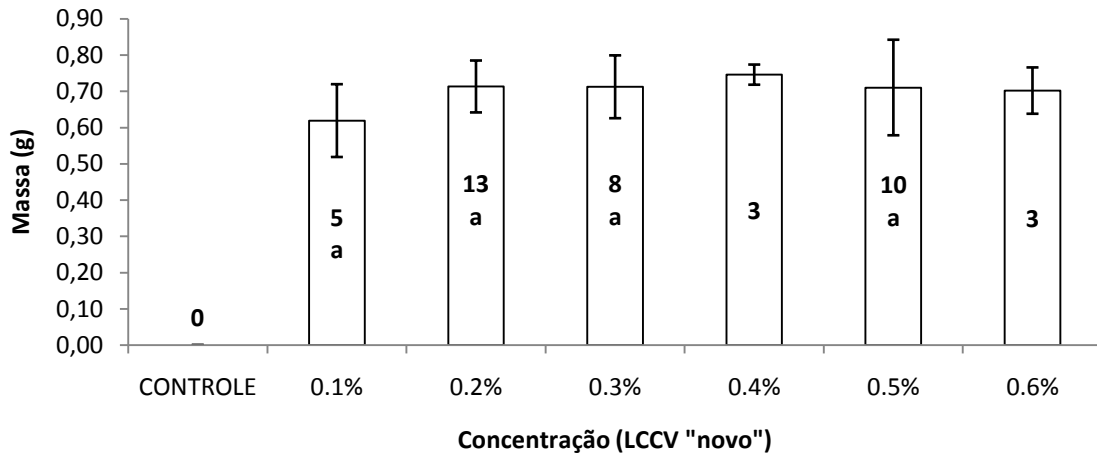


Figura 13. Experimento III: Massa média ( $\pm$  desvio padrão) por ocasião da metamorfose em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV “novo”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).

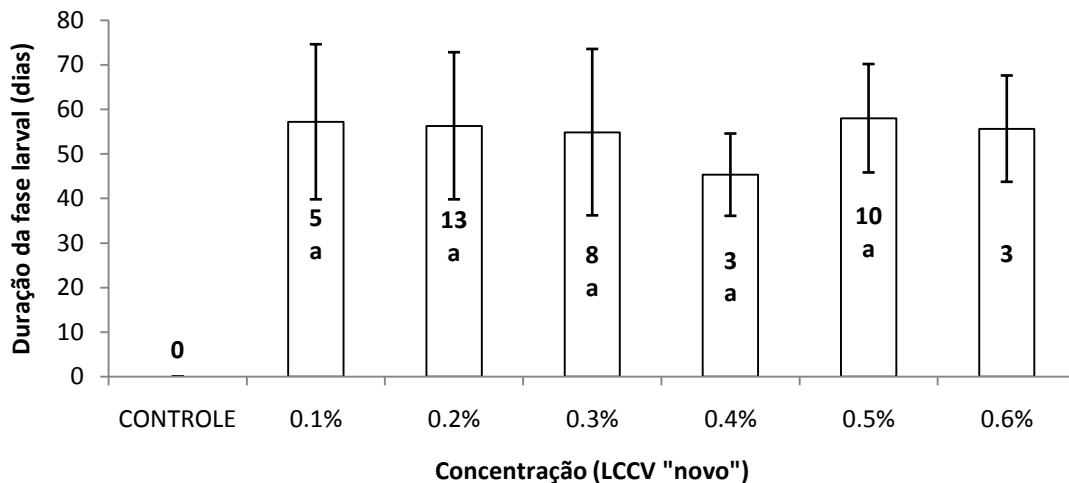


Figura 14. Experimento III: Tempo de duração médio da fase larval ( $\pm$  desvio padrão) em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV “novo”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).



**Experimento IV** (figuras 15 e 16): os resultados indicaram relação positiva entre a massa média dos girinos e a concentração de LCCV, seguida por queda na maior concentração, com diferenças significativas entre alguns dos tratamentos ( $p= 0,0001$ ). Por outro lado, o tempo de duração da fase larval não variou de forma significativa entre os diversos tratamentos ( $p=0,8165$ ).

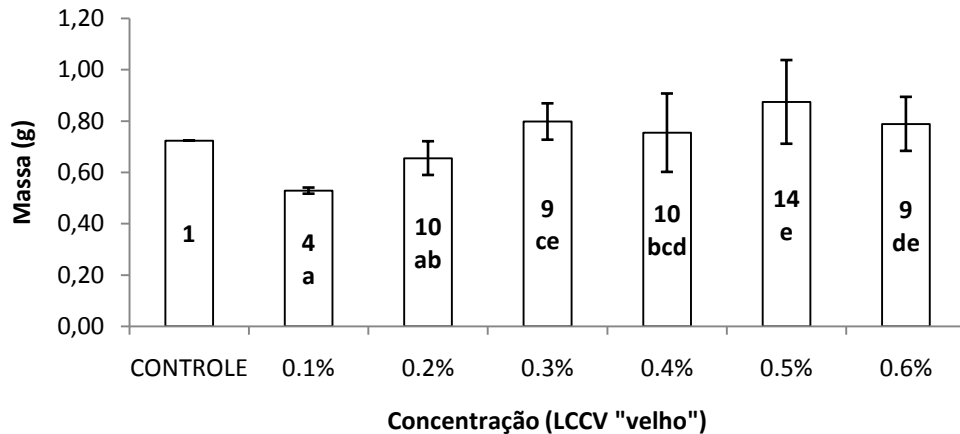


Figura 15. Experimento IV: Massa média ( $\pm$  desvio padrão) por ocasião da metamorfose em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV “velho”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).

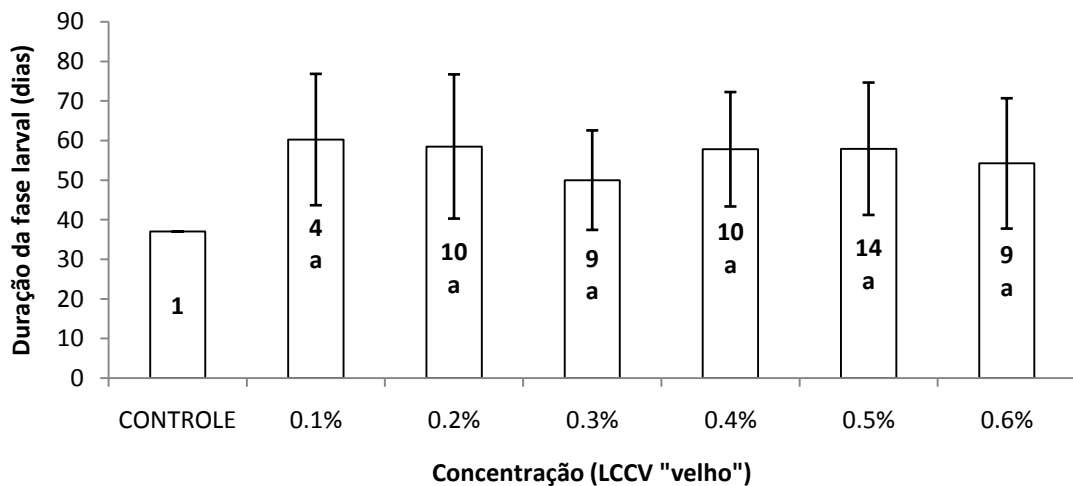


Figura 16. Experimento IV: Tempo de duração médio da fase larval ( $\pm$  desvio padrão) em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV “velho”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).

**Experimento V** (figuras 17 e 18): a massa dos girinos no tratamento 0,3% foi significativamente maior que no grupo controle e que no tratamento 0,6% ( $p=0,001$ ). O tempo de duração da fase larval não diferiu significativamente entre os tratamentos em que ocorreu metamorfose ( $p=0,3144$ ).

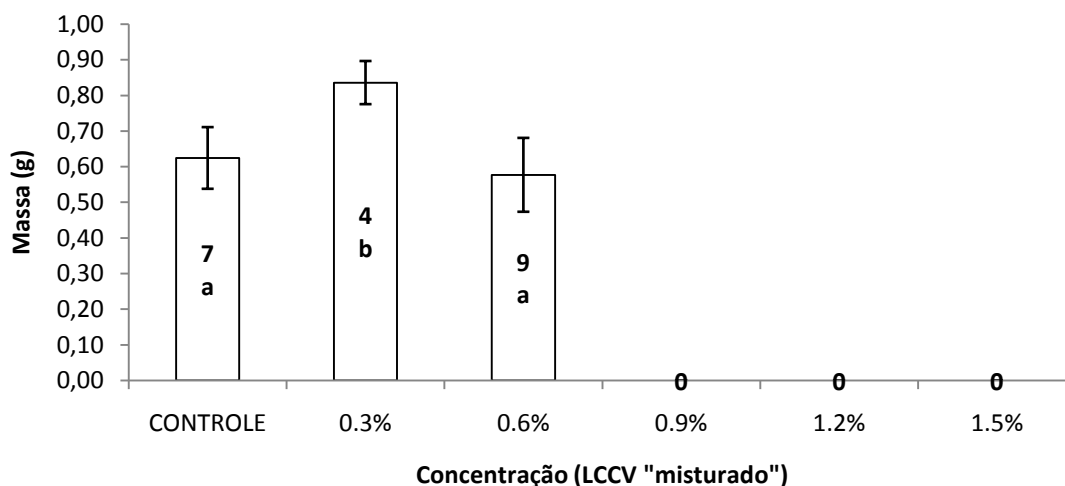


Figura 17. Experimento V: Massa média ( $\pm$  desvio padrão) por ocasião da metamorfose em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de uma mistura 1:1 de LCCV “velho” e “novo”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).

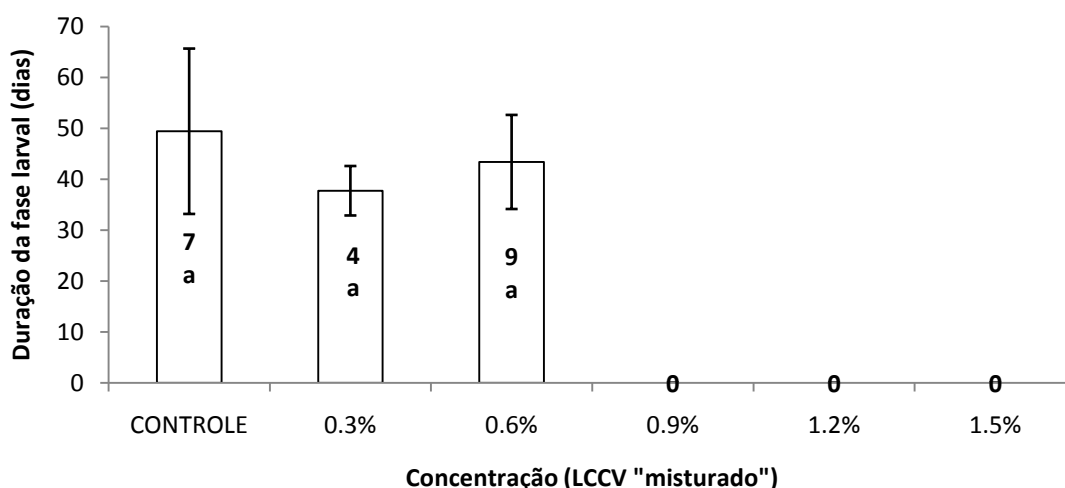


Figura 18. Experimento V: Tempo de duração médio da fase larval ( $\pm$  desvio padrão) em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de uma mistura 1:1 de LCCV “velho” e “novo”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).

**Experimento VI** (figuras 19 e 20): A massa por ocasião da metamorfose não variou significativamente entre os diferentes tratamentos em que ocorreu metamorfose ( $p=0,8828$ ), o mesmo ocorrendo com o tempo de duração da fase larval ( $p=0,0911$ ).

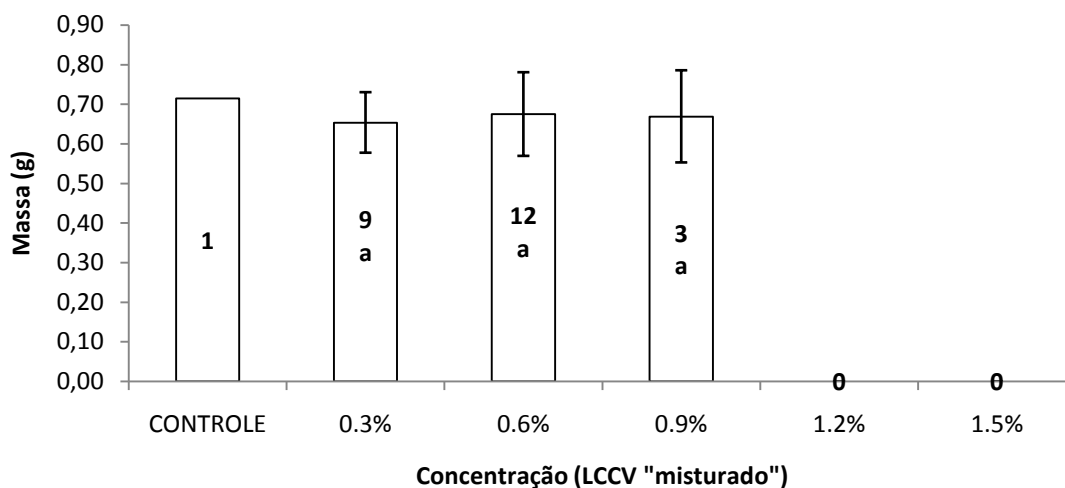


Figura 19. Experimento VI: Massa média ( $\pm$  desvio padrão) por ocasião da metamorfose em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de uma mistura 1:1 de LCCV “velho” e “novo”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).

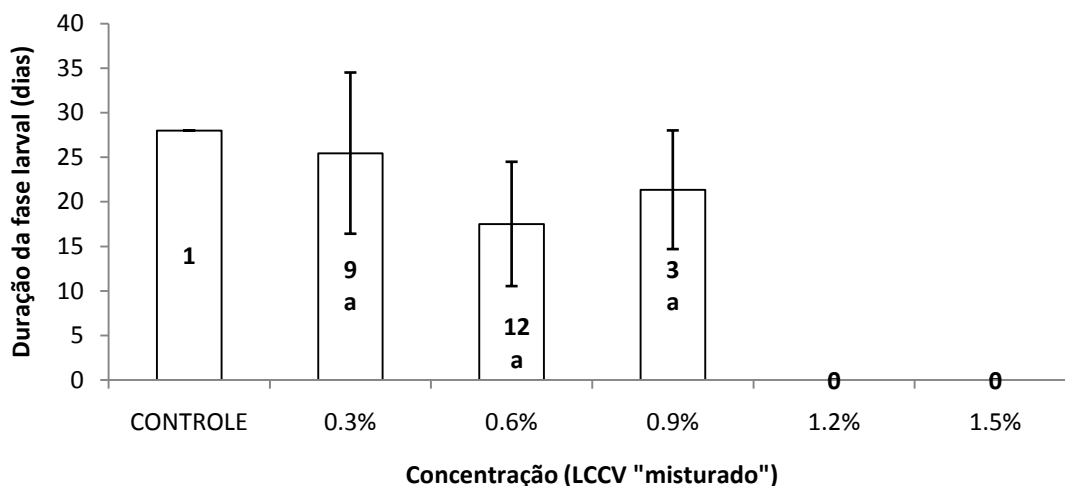


Figura 20. Experimento VI: Tempo de duração médio da fase larval ( $\pm$  desvio padrão) em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de uma mistura 1:1 de LCCV “velho” e “novo”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).

### 4.3 Correlação entre massa na metamorfose e tempo de duração da fase larval

**Experimento I (figura 21):** houve tendência de correlação positiva entre a massa dos girinos e o tempo de duração da fase larval nas concentrações menores, com correlações significantes nos tratamentos 0,2%, 0,3% e 0,4%. Na maior concentração (0,6%) houve tendência de correlação negativa, embora o resultado não tenha sido significativo. No grupo controle e na concentração 0,1% não foi possível verificar a existência da correlação devido ao pequeno tamanho amostral.

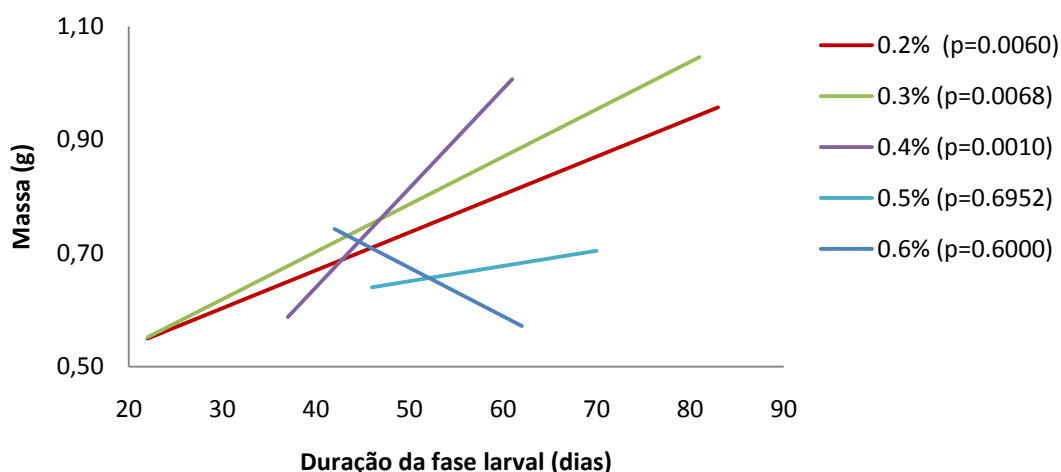


Figura 21. Correlação entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV “novo” no experimento I.

**Experimento II (figura 22):** ocorreu uma correlação positiva entre a massa dos girinos e o tempo de duração da fase larval nas concentrações 0,3%, 0,4% e 0,5%. Na concentração de 0,2% não houve correlação, enquanto que na concentração de 0,6% ocorreu uma tendência de correlação negativa, embora o resultado não tenha sido significativo. No grupo controle e na concentração 0,1% não foi possível verificar a existência da correlação devido ao pequeno tamanho amostral.

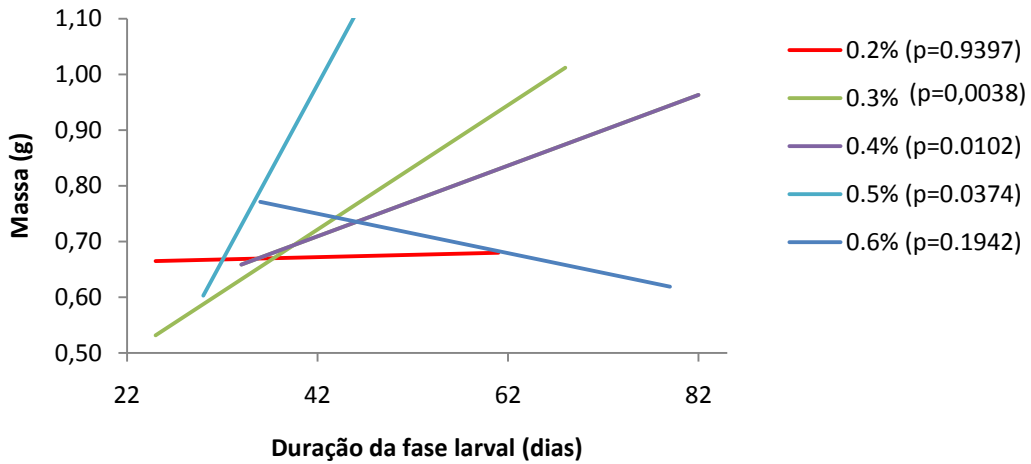


Figura 22. Correlação entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV “velho” no experimento II.

**Experimento III (figura 23):** não ocorreu correlação entre a massa dos girinos e o tempo de duração da fase larval em nenhuma das concentrações em que foi possível fazer a análise embora os resultados sugere uma tendência de correlação positiva na concentração de 0,1% e de correlação negativa na concentração 0,5%.

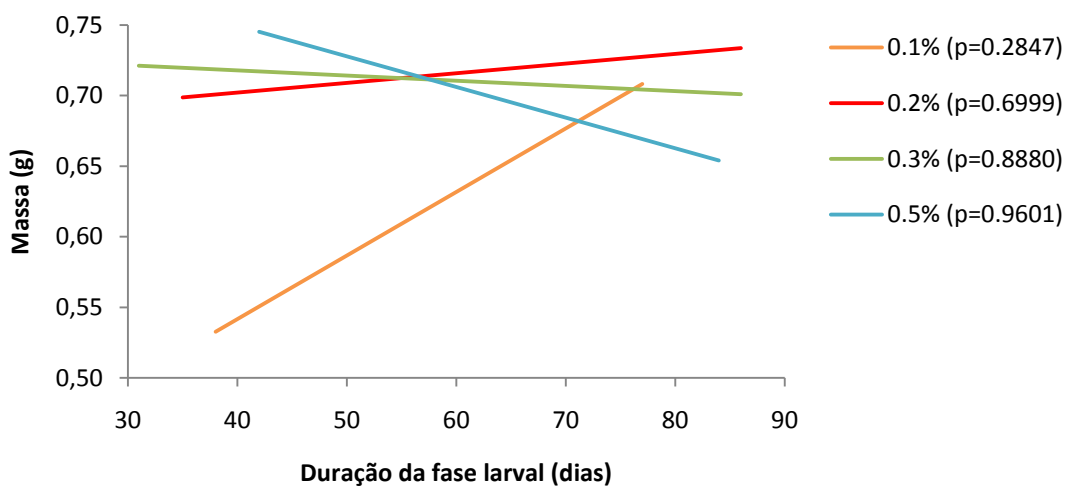


Figura 23. Correlação entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV “novo” no experimento III.

**Experimento IV (figura 24):** a massa dos girinos por ocasião da metamorfose praticamente não variou dentro dos tratamentos 0,1% e 0,2%, ainda que nestes alguns girinos demorassem o dobro do tempo para atingir a metamorfose que outros. No tratamento 0,3% houve uma tendência de correlação negativa, enquanto que nos demais houve uma tendência de correlação positiva que, no entanto, só foi significativa na concentração 0,4%.

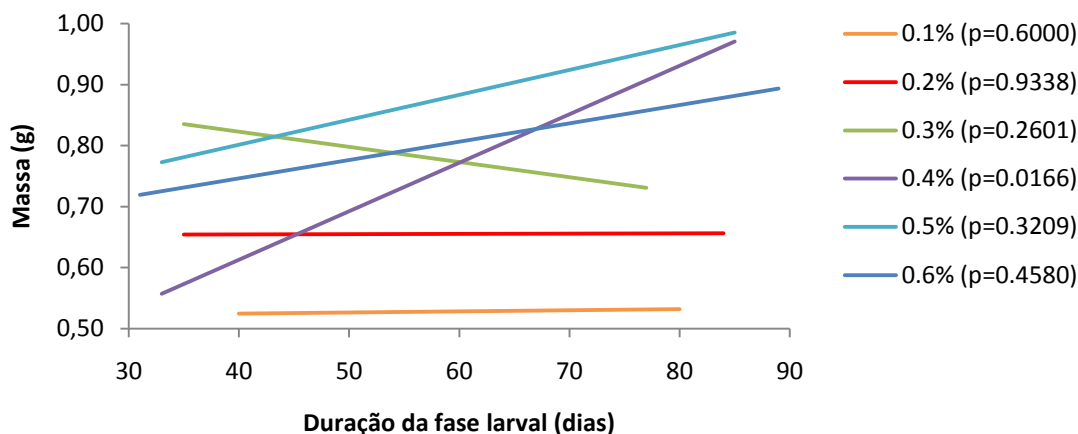


Figura 24. Correlação entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV “velho” no experimento IV.

**Experimento V (figura 25):** nos dois tratamentos em que foi possível realizar esta análise, houve uma tendência de correlação positiva entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval, mas sem se apresentar significativa em nenhum deles.

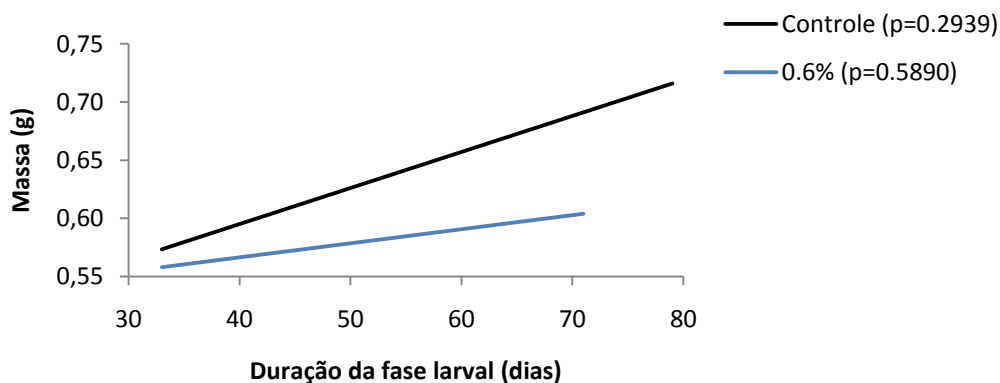


Figura 25. Correlação entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV “misturado” no experimento V.

**Experimento VI (figura 26):** nos dois tratamentos em que foi possível realizar esta análise, houve uma tendência de correlação negativa entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval, mas sem se apresentar significativa em nenhum deles.

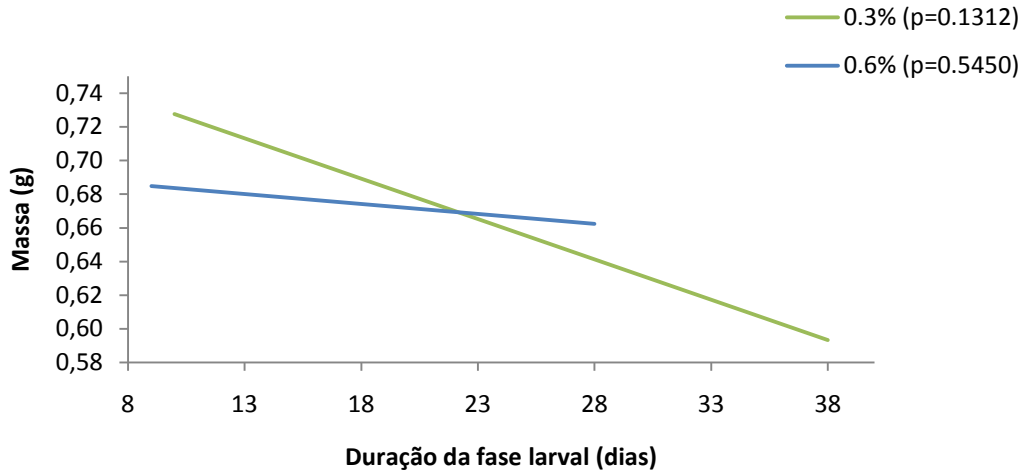


Figura 26 Correlação entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV "misturado" no experimento VI.

#### 4.4 Análises dos dados dos experimentos I, II, III, IV agregados

##### 4.4.1 Letalidade e taxa de metamorfose

A letalidade esteve, de modo geral, positivamente relacionada com a concentração de LCCV, embora a taxa da concentração 0,2% tenha sido maior que a das concentrações 0,3% e 0,4%. A  $CL_{50}$  foi de 0,48% (95% de intervalo de confiança entre 0,44 a 0,53) do LCCV. A taxa de metamorfose apresentou os maiores valores nas concentrações intermediárias, com as menores taxas presentes nas duas menores e na maior concentração. A sobrevivência na forma de girino teve uma relação negativa com a letalidade, apresentando as maiores taxas nos tratamentos onde a letalidade foi menor (controle e 0,1%) e as menores taxas nos tratamentos onde a letalidade foi maior (0,5% e 0,6%) (figura 27).

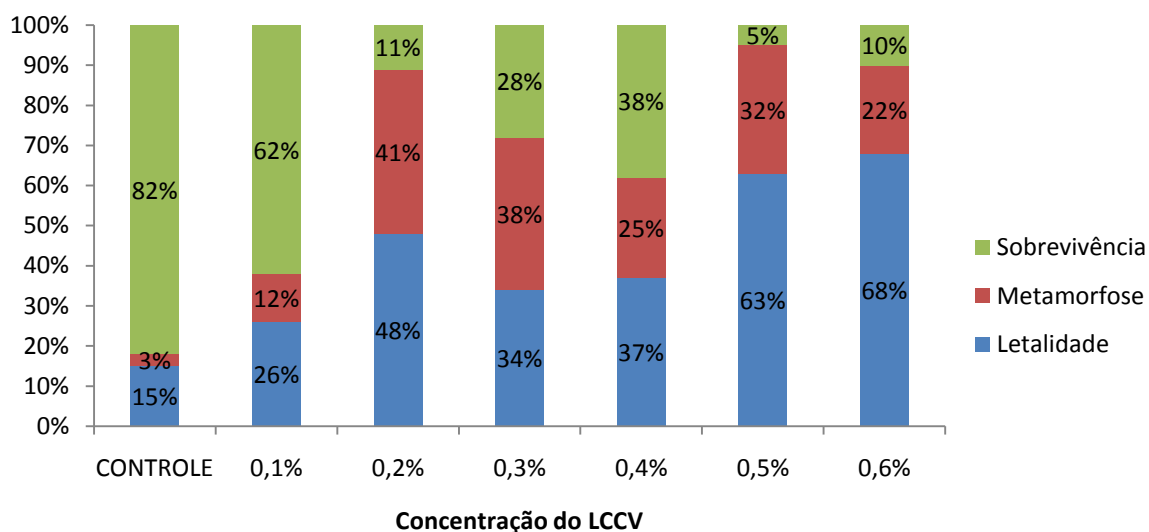


Figura 27. Porcentagem de letalidade, sobrevivência na forma de girino e metamorfose em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações do LCCV durante um período de 90 dias. Dados dos experimentos I, II, III e IV agregados.



#### 4.4.2. Massa e Duração da Fase Larval

A massa média dos girinos por ocasião da metamorfose apresentou uma relação positiva ( $p=0,0001$ ) com a concentração de LCCV (figura 28). Por outro lado, não foi significativa ( $p=0,8631$ ), a diferença na duração da fase larval entre os diversos tratamentos (figura 29).

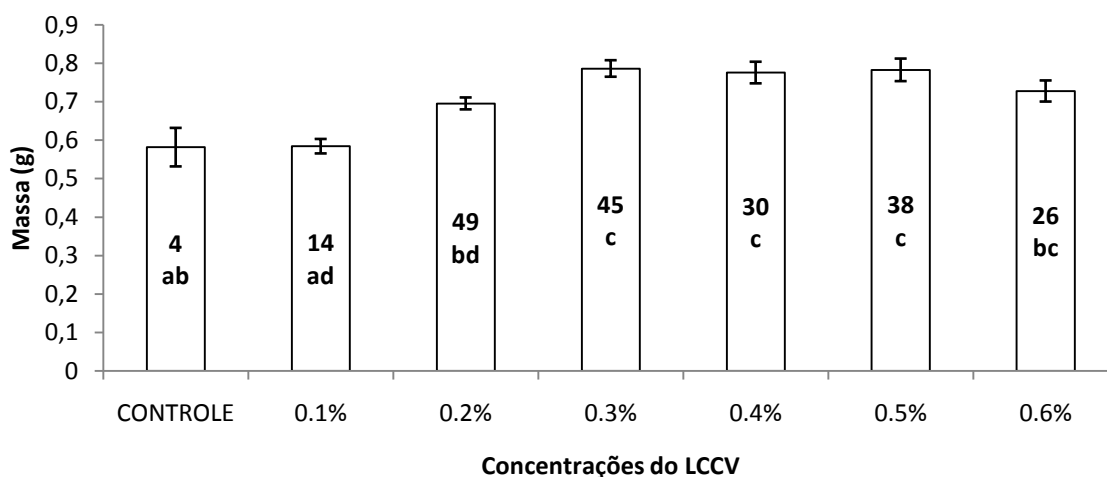


Figura 28. Massa média ( $\pm$  desvio padrão) por ocasião da metamorfose de girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV. Dados dos experimentos I, II, III e IV agregados. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).

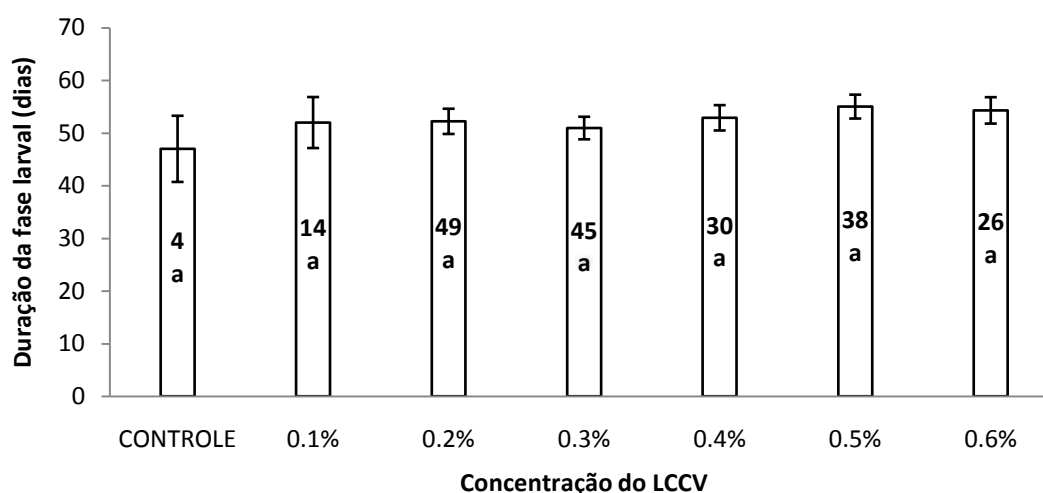


Figura 29. Tempo de duração médio da fase larval ( $\pm$  desvio padrão) de girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV. Dados dos experimentos I, II, III e IV agregados. Os números dentro das barras representam o n amostral. (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).

#### 4.4.3. Correlação entre massa na metamorfose e tempo de duração da fase larval

A massa por ocasião da metamorfose e a duração da fase larval apresentaram uma tendência de correlação positiva nas concentrações intermediárias, com um valor de  $p$  próximo ao limite de significância na concentração 0,2% e significativo nas concentrações intermediárias 0,3% e 0,4%. No grupo controle houve uma tendência de correlação negativa, embora os resultados não tenham sido significativos (figura 30).

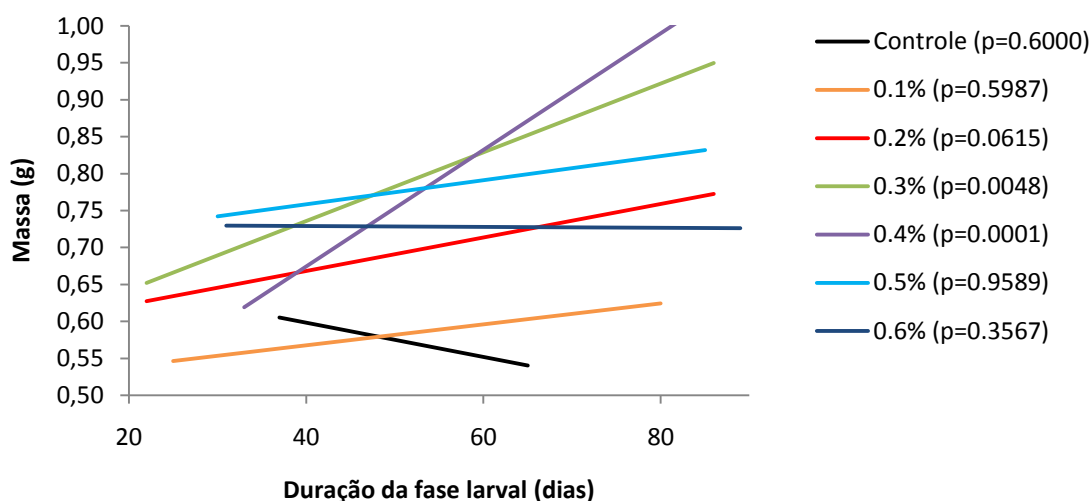


Figura 30. Correlação entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV. Dados dos experimentos I, II, III e IV agregados.

## 4.5 Análises dos dados dos Experimentos V e VI agregados

### 4.5.1 Letalidade e taxa de metamorfose

A letalidade se mostrou positivamente relacionada com a concentração de LCCV, tendo atingido 100% dos girinos nas duas maiores concentrações.  $CL_{50}$  foi de 0,65% (95% de intervalo de confiança entre 0,59 a 0,73) do LCCV “misturado”. A maior taxa de metamorfose foi em uma concentração intermediária (0,6%), enquanto que nos tratamentos que apresentaram as menores taxas de letalidade (grupo controle e 0,3%), a maior parte dos indivíduos permaneceu na fase larval (Figura 31).

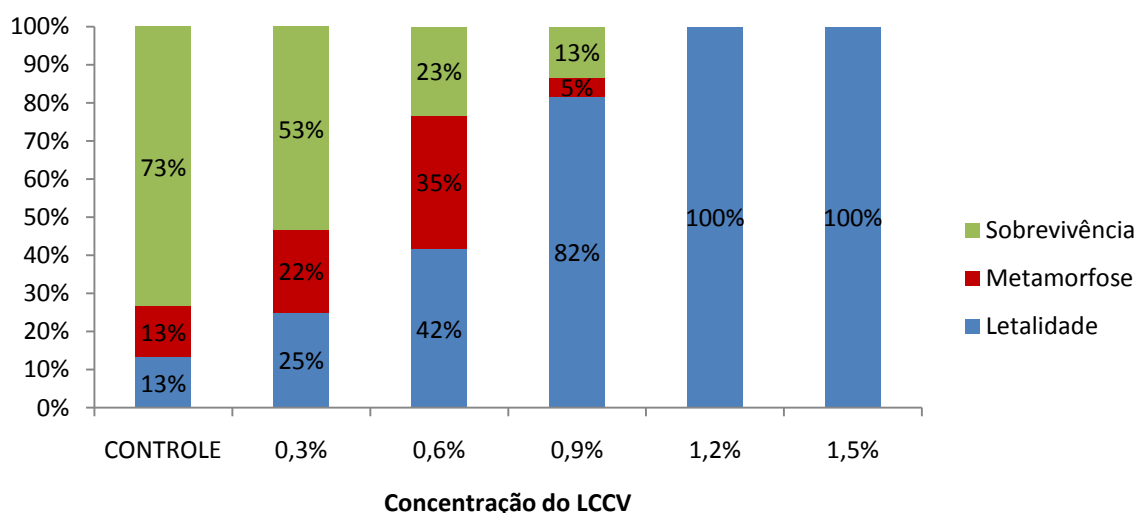


Figura 31. Porcentagem de letalidade, sobrevivência na forma de girino e metamorfose em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações do líquido da casca do coco verde (LCCV) durante um período de 90 dias. Dados dos experimentos V e VI agregados.

#### 4.5.2. Massa por ocasião da Metamorfose e Duração da Fase Larval

Não houve diferenças significativas entre massas dos tratamentos por ocasião da metamorfose ( $p = 0,2366$ , figura 32). Por outro lado, a duração do período larval no grupo controle foi significativamente diferente e mais extensa que nos tratamentos 0,3, 0,6 e 0,9% ( $p = 0,0402$  (figura 33)).

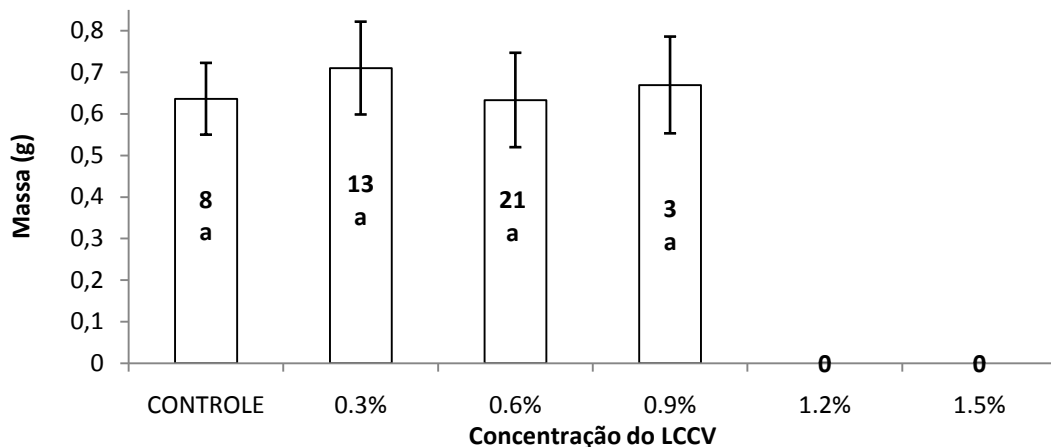


Figura 32. Massa média ( $\pm$  desvio padrão) por ocasião da metamorfose de girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV. Dados dos experimentos V e VI agregados. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).

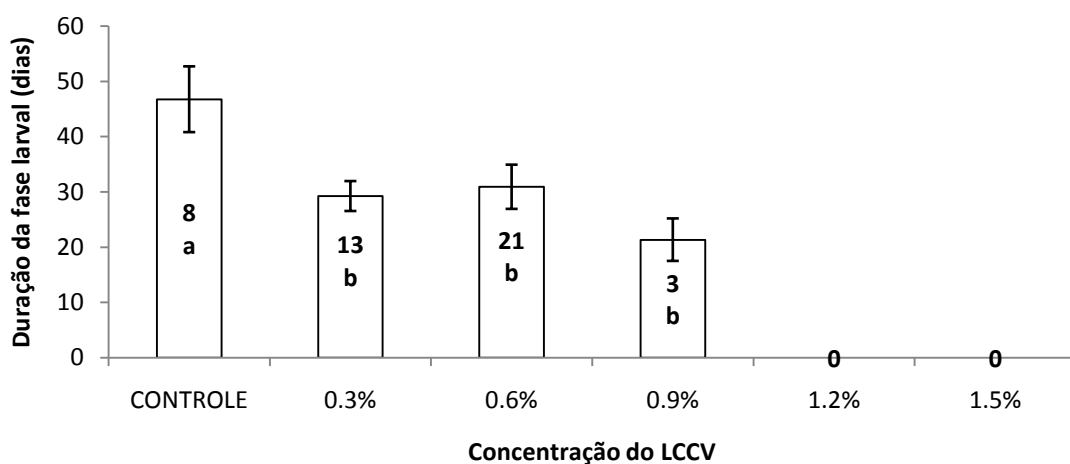


Figura 33. Tempo de duração médio da fase larval ( $\pm$  desvio padrão) em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV. Dados dos experimentos V e VI agregados: Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).

#### 4.5.3. Correlação entre massa por ocasião da metamorfose e tempo de duração da fase larval

Houve uma tendência de correlação positiva no grupo controle e na concentração 0,3%, mas sem atingir significância estatística. Por outro lado, na concentração de 0,6% houve uma correlação negativa significativa ( $p=0,0496$ ). (figura 34).

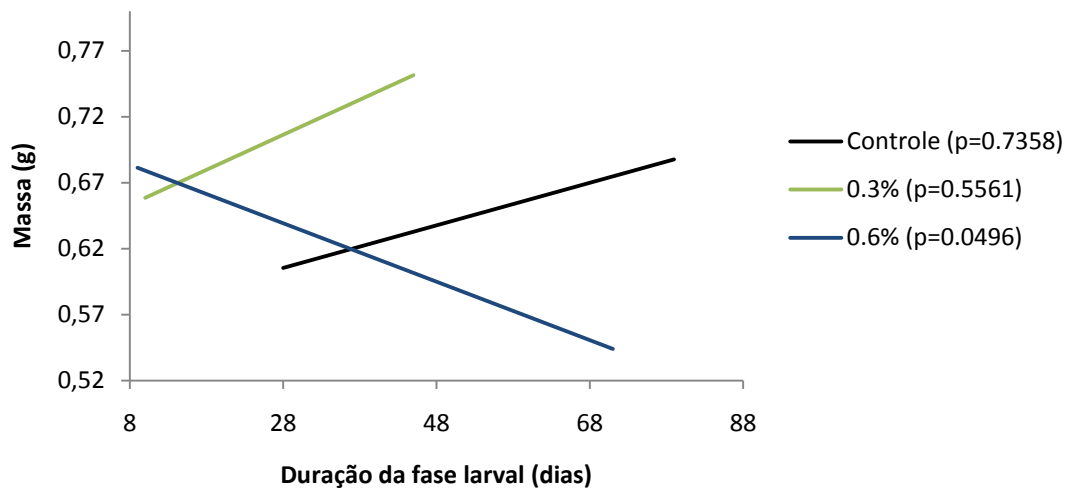


Figura 34. Correlação entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV “misturado”. Dados dos experimentos V e VI agregados.

## 4.6 Análise dos dados dos Experimentos I e III agregados

### 4.6.1 Letalidade e Taxa de metamorfose

(Figura 35): A letalidade esteve, de modo geral, positivamente relacionada com a concentração de LCCV, com as maiores taxas nas duas concentrações mais elevadas. O  $CL_{50}$  foi igual a 0,40 (0,35-0,45%). A taxa de metamorfose apresentou os maiores valores nas concentrações intermediárias enquanto que a sobrevivência na forma de girinos pareceu ter uma relação negativa com a concentração de LCCV.

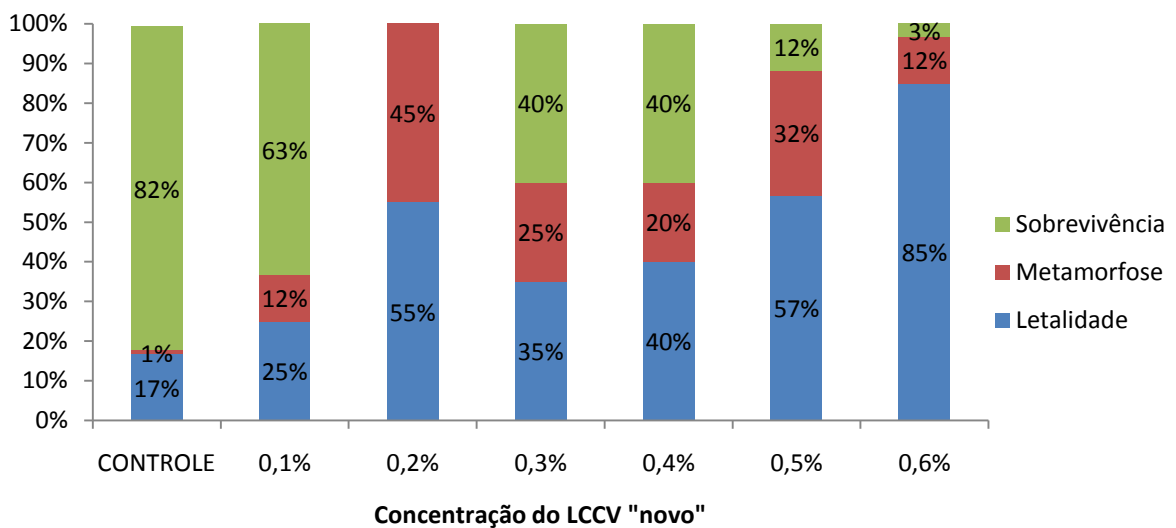


Figura 35. Porcentagem de letalidade, sobrevivência na forma de girino e metamorfose em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações do líquido da casca do coco verde (LCCV) “novo” durante um período de 90 dias. Experimento I e III agregados.

#### 4.6.2 Massa por Ocasão da Metamorfose e Duração da Fase Larval

(Figura 36 e 37): Os maiores valores de massa média por ocasião da metamorfose foram registrados nas concentrações intermediárias, embora as diferenças não tenham sido significativas ( $p = 0,7448$ ). O tempo de duração da fase larval, por sua vez, não pareceu variar em função da concentração de LCCV ( $p = 0,0855$ ).

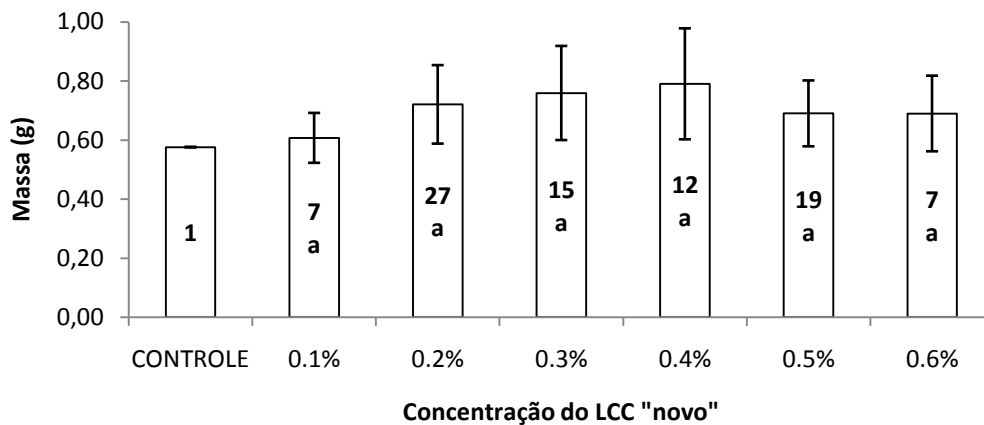


Figura 36. Massa média ( $\pm$  desvio padrão) por ocasião da metamorfose em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV “novo”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si). Experimento I e III agregados.

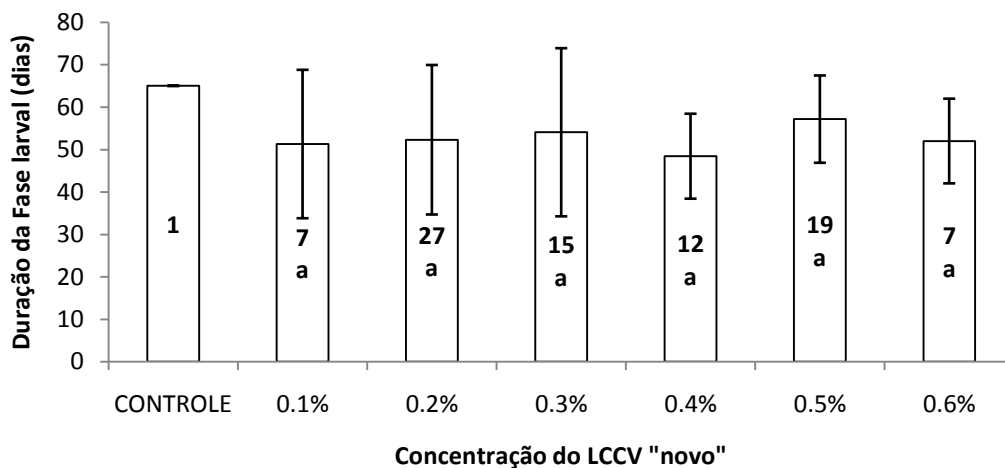


Figura 37. Tempo de duração médio da fase larval ( $\pm$  desvio padrão) em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV “novo”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si). Experimento I e III agregados.

#### 4.6.3 Correlação entre Massa por Ocasão da Metamorfose e Duração da Fase Larval

Houve uma tendência de correlação positiva entre massa na metamorfose e tempo de duração da fase larval nas quatro menores concentrações, tendo sido significativas nas concentrações 0,2 e 0,4% (figura 38).

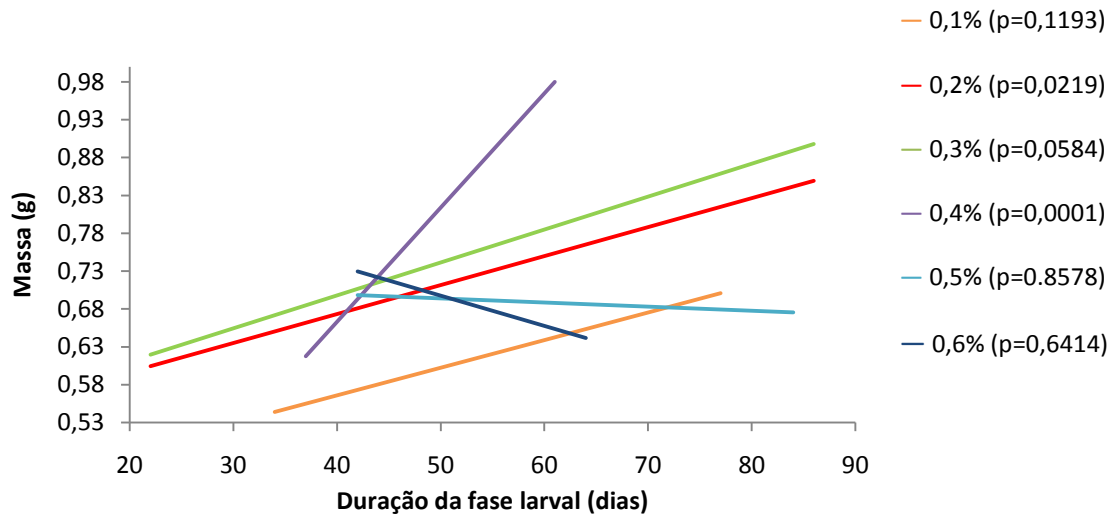


Figura 38. Correlação entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV “velho”. Dados dos experimentos I e III agregados.



## 4.7 Análise dos dados dos Experimentos II e IV agregados

### 4.7.1 Letalidade e Taxa de metamorfose

(figura 39): a letalidade esteve, de modo geral, positivamente relacionada com a concentração de LCCV. A  $CL_{50}$  foi igual a 0,49% (0,44-0,54%). A taxa de metamorfose apresentou os menores valores nas duas concentrações mais baixas, que também apresentaram as menores letalidades. Por outro lado, a sobrevivência na forma de girino foi inversamente proporcional a letalidade.

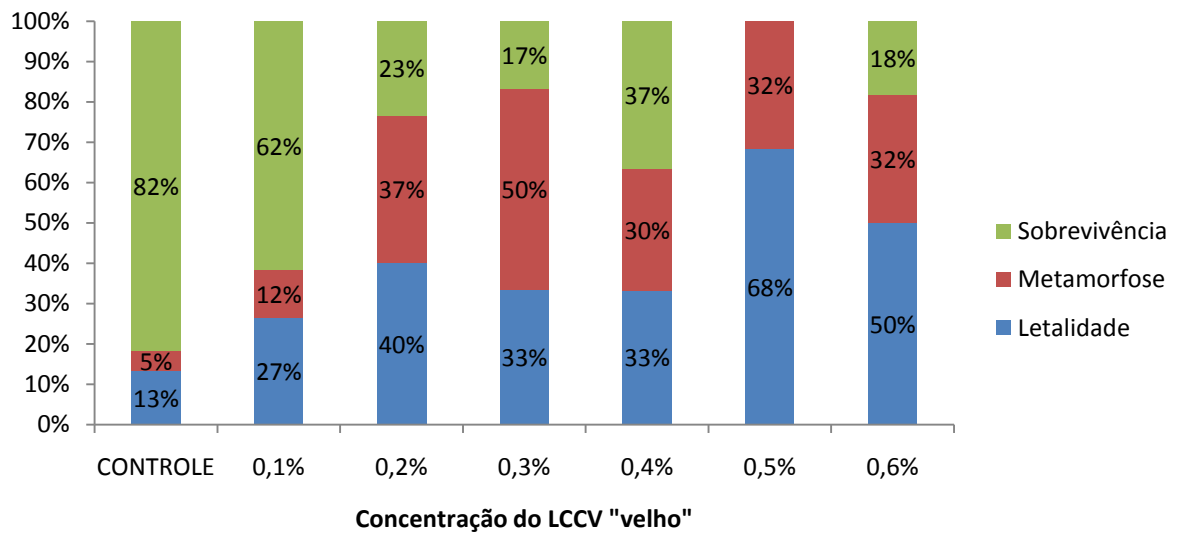


Figura 39. Porcentagem de letalidade, sobrevivência na forma de girino e metamorfose em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações do líquido da casca do coco verde (LCCV) “velho” durante um período de 90 dias. Experimento II e IV agregados.

#### 4.7.2 Massa por Ocasião da Metamorfose e Duração da Fase Larval

(Figura 40 e 41): a massa por ocasião da metamorfose cresceu com o aumento da concentração de LCCV, com uma tendência de queda na maior concentração, tendo sido as diferenças entre algumas concentrações significativas ( $p=0,0001$ ). O tempo de duração da fase larval, por sua vez, não variou significativamente entre os tratamentos ( $p=0,5628$ ).

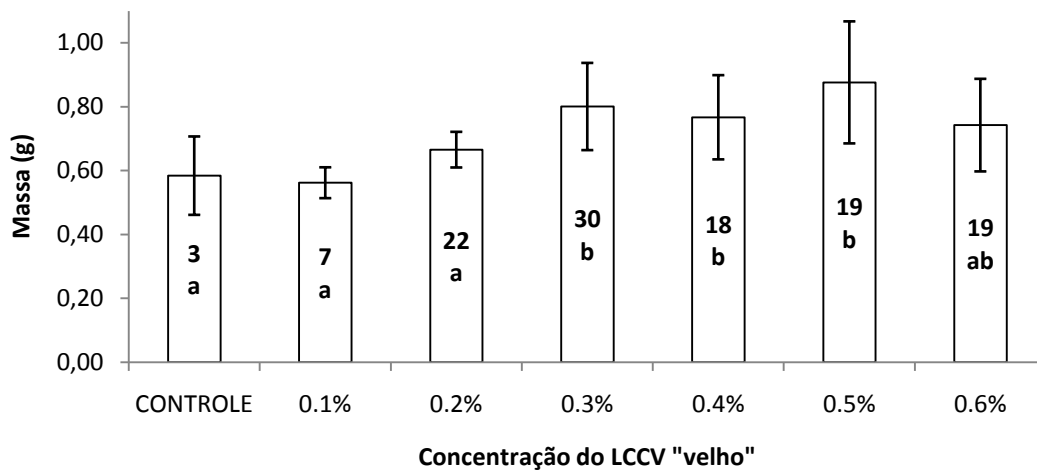


Figura 40. Massa média ( $\pm$  desvio padrão) por ocasião da metamorfose em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV “velho”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si). Experimento II e IV agregados.

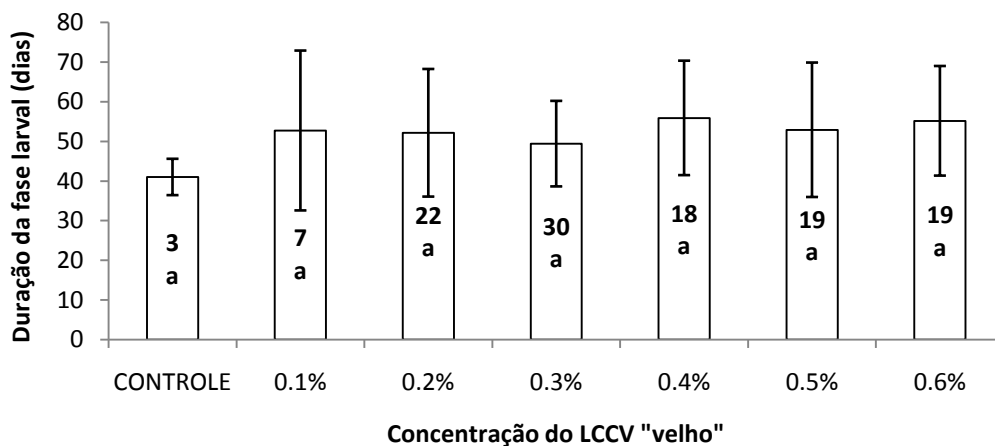


Figura 41. Tempo de duração médio da fase larval ( $\pm$  desvio padrão) em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV “velho”. Os números dentro das barras representam o n amostral (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si). Experimento II e IV agregados.

### 4.7.3 Correlação entre Massa por Ocasão da Metamorfose e Duração da Fase Larval

Houve uma tendência de correlação positiva entre massa na metamorfose e duração da fase larval, apenas nas concentrações 0,3, 0,4 e 0,5%, sendo que a de valor intermediário (0,4%) foi a única significativa (figura 42).

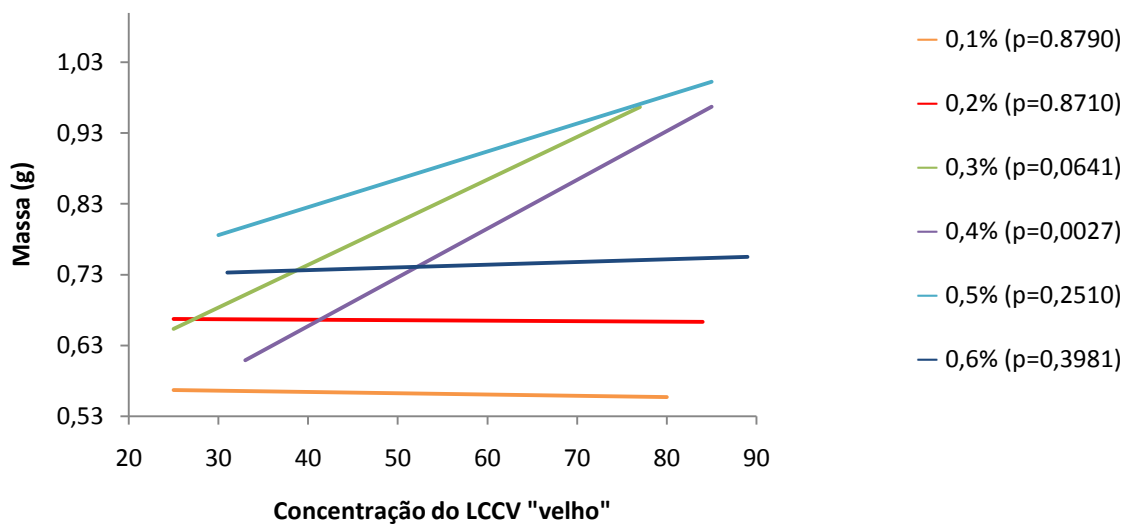


Figura 42. Correlação entre massa por ocasião da metamorfose e duração da fase larval em girinos de *Leptodactylus vastus* submetidos a diferentes concentrações de LCCV “velho”. Dados dos experimentos II e IV agregados.

#### 4.8 Fatores Abióticos

**Experimento I, II, III e IV agregados:** O oxigênio dissolvido (OD) presente nas soluções após uma semana de sua renovação, diminuiu com o aumento da concentração de LCCV, com diferenças significativas entre diversos tratamentos ( $p=0,0001$ ), destacando-se a concentração de 0,6%, onde o OD foi significativamente menor que em todos os demais tratamentos (figura 43). Por sua vez, o potencial de hidrogênio (pH) apresentado pelas soluções após uma semana de sua renovação, não variou significativamente ( $p=0,1875$ ) entre os diversos tratamentos (figura 44).

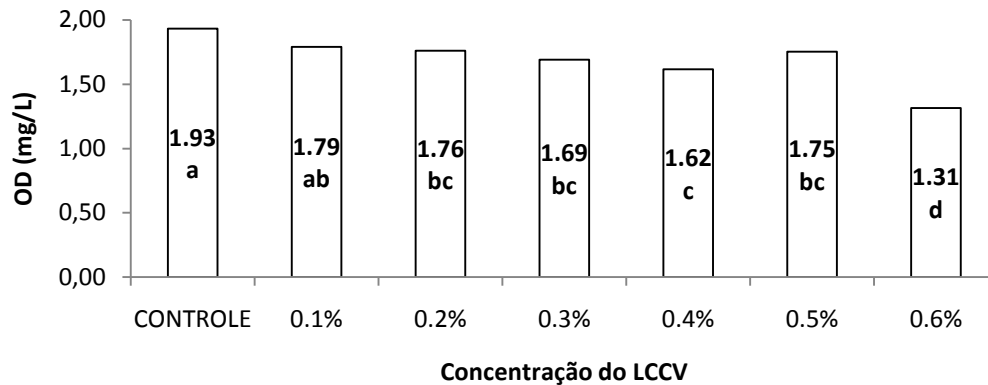


Figura 43. Média das determinações do oxigênio dissolvido (OD) realizadas após uma semana da renovação das diferentes concentrações de LCCV. Dados dos experimentos I, II, III e IV agregados. (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).

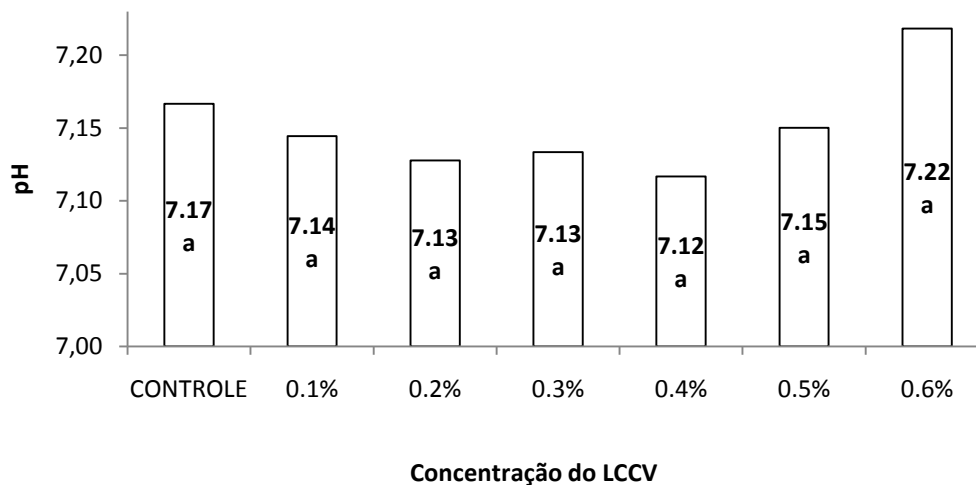


Figura 44. Média das determinações do pH realizadas após uma semana da renovação das diferentes concentrações de LCCV. Dados dos experimentos I, II, III e IV agregados (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).

**Experimento V e VI agregados:** O oxigênio dissolvido (OD) presente nas soluções após uma semana de sua renovação, foi significativamente menor ( $p=0,0001$ ), na concentração 0,9%, que nas demais concentrações onde houve sobrevivência de girinos, figura 45. O pH apresentou os maiores valores nas concentrações intermediárias, com diferenças significativas ( $p=0,0025$ ) entre as concentrações (figura 46).

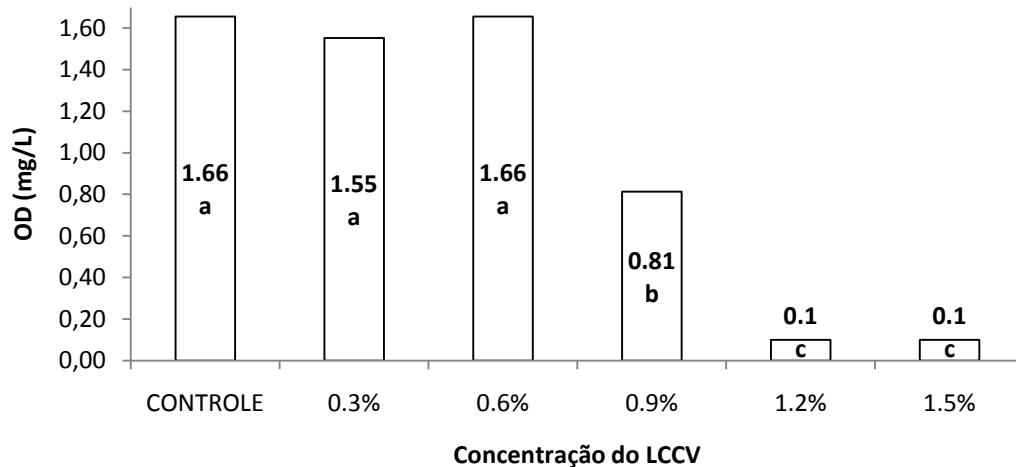


Figura 45. Média das determinações do oxigênio dissolvido (OD) realizadas após uma semana da renovação das diferentes concentrações de LCCV. Dados dos experimentos V e VI agregados. (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).

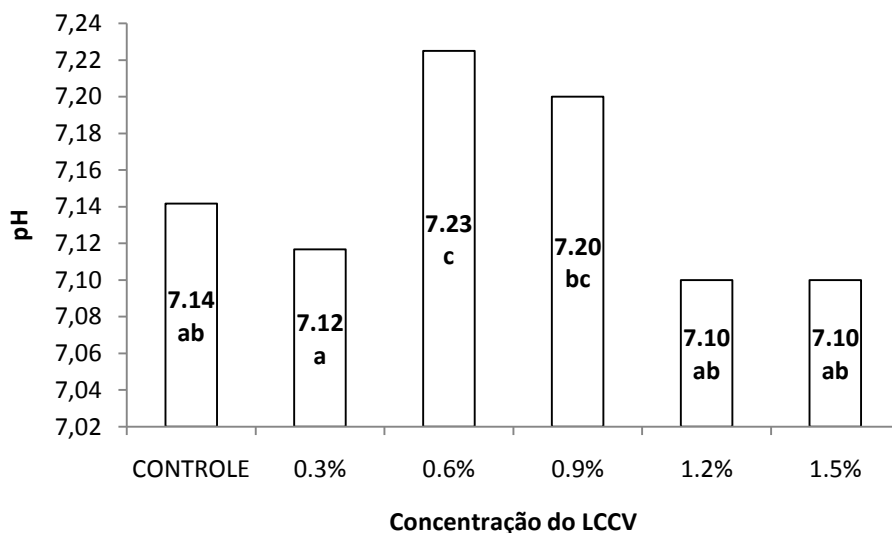


Figura 46. Média das determinações do pH realizadas após uma semana da renovação das diferentes concentrações de LCCV. Dados dos experimentos V e VI agregados (médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si).

## 5 DISCUSSÃO

Os efeitos tóxicos de poluentes sobre larvas de anfíbios foram objeto de diversos estudos, tais como, o efeito do mercúrio sobre *Rana sphenoccephala* (UNRINE *et al.*, 2004), do inseticida piretróide Cipermetrina sobre *Bombina variegata* e *Rana arvalis* (GREULICH; PFLUGMACHER, 2004) e *Melanostictus bufo* (SAHA; KAVIRAJ, 2008), do inseticida Malation sobre *Bufo arenarum* (VENTURINO *et al.*, 2001) e *Rana ridibunda* (SAYIM, 2008), de fertilizantes a base de nitrato de amônio sobre *Rana temporaria* (OLDHAM *et al.*, 1997), de surfactantes do álcool etoxilado e do álcool etóxi sulfato sobre *Xenopus laevis* (CARDELLINI; OMETTO, 2001), de diferentes solventes sobre *Rana temporaria* (MARQUIS *et al.*, 2006), da uréia granulada sobre *Plethodon vehiculum*, *Rhyacotriton variegatus* e *Taricha granulosa* (MARCO *et al.*, 2001), do herbicida Atrazine e do inseticida Basudin sobre *Ptychadena bibroni* (EZEMONYE; ILECHIE, 2006), do nitrogênio mineral (N) sobre *Rana sylvatica* e *Ambystoma tigrinum tigrinum* (GRIYS-KYLE; RITCHIE, 2007), do inseticida Dimetoato sobre *Hyla arborea* (SAYIM e KAYA, 2006) e dos pesticidas organofosforados Clorpirifós, Malation e Diazinon sobre *Rana boylei* (SPARLING; FELLERS, 2007).

Nesta pesquisa, o LCCV apresentou efeito tóxico sobre os girinos de *Leptodactylus vastus*, afetando a massa na metamorfose e a mortalidade, que apresentou uma relação positiva com a concentração de LCCV na maioria dos experimentos.

Em todos os experimentos, a menor taxa de letalidade foi apresentada pelo grupo controle, com os dois experimentos com LCCV novo (I e III) e os dois experimentos com LCCV velho (II e IV) apresentando a mesma taxa de letalidade no grupo controle, 17% e 13%, respectivamente. Quando os dados destes quatro experimentos foram analisados em conjunto, a taxa de letalidade apresentou um valor intermediário de 15%. Nos dois experimentos em que houve a mistura dos dois tipos de LCCV, a letalidade do grupo controle foi de 17 e 10%, quando analisados separadamente e de 13% na análise agregada.

A maior taxa de letalidade foi registrada na maior concentração nos experimentos com LCCV novo (I e III) e na segunda maior concentração nos experimentos com LCCV velho (II e IV). Interessantemente, a letalidade na concentração 0,2% foi maior que na concentração 0,3% nos experimentos I, II e III, sendo as duas iguais no experimento IV. Nos

experimentos com a mistura de LCCV (V e VI) a letalidade foi de 100% dos girinos nas duas maiores concentrações.

A  $CL_{50}$  nos experimentos com o LCCV novo foi menor que nos experimentos com LCCV velho, indicando que o primeiro apresentou uma toxicidade maior que o último. Por outro lado, a  $CL_{50}$  nos experimentos com a mistura dos dois tipos de LCCV, foi maior que aquela calculada nos experimentos com apenas um tipo de LCCV.

O único outro estudo sobre a toxicidade aguda do LCCV foi o realizado por Arthaud *et al.* (2008) utilizando indivíduos do crustáceo *Artemia* sp. Neste estudo as concentrações variaram entre 0,05 e 6,40%, tendo apresentado a  $CL_{50}$  de 0,06% a 1,43% com média igual a 0,62%.

Ainda que o LCCV tenha afetado negativamente a sobrevivência dos girinos, o mesmo não pareceu afetar de forma negativa a capacidade dos girinos sobreviventes de completar a metamorfose já que, em todos os experimentos, o grupo controle apresentou as menores taxas de metamorfose, com exceção do Experimento V, onde apresentou a segunda menor taxa, se forem excluídos da análise os tratamentos em que a mortalidade foi igual a 100%.

O fato de os grupos controle terem apresentado menor número de metamorfoses que os tratamentos com LCCV pode ser devido à utilização do LCCV como fonte de nutrientes por parte dos girinos, já que esta água residuária apresenta elevada concentração de matéria orgânica, variando de 60 a 80 gDQO/L (ARAÚJO, 2008). O maior número de metamorfoses nos tratamentos com LCCV poderia também ser o resultado de uma resposta adaptativa dos girinos à presença de LCCV, já que larvas de anfíbios podem acelerar o desenvolvimento, antecipando a metamorfose, em resposta a um estresse ambiental (WELLS, 2007). Ryan e Winne (2001) observaram que girinos de *Rana sphenoccephala* aceleravam o desenvolvimento em resposta ao dessecamento da poça onde viviam.

A tendência dos girinos dos tratamentos com concentrações intermediárias de LCCV, de apresentarem maior massa por ocasião da metamorfose, observada no presente estudo, pode ser devida ao uso de componentes do LCCV como nutrientes pelos girinos, explicação também aventada acima para o maior número de metamorfoses nos tratamentos com LCCV. A relação positiva entre concentração de LCCV e massa dos girinos não foi observada nas concentrações mais elevadas, possivelmente porque nestas, o efeito tóxico do

LCCV pode ter neutralizado o efeito positivo sobre o crescimento dos girinos devido ao seu valor nutritivo.

Resultados semelhantes aos deste trabalho, com a massa dos girinos apresentando uma relação positiva com determinadas concentrações de elementos potencialmente tóxicos, foram encontrados também, em outros estudos, Johansson *et al.* (2006) estudaram a toxicidade crônica de três diferentes inseticidas sobre girinos de *Rana temporaria*, e observaram que, um deles, a Permetrina, teve efeito positivo no tamanho na metamorfose em determinadas concentrações. Smith *et al.*, (2005) por sua vez, estudaram o efeito de nitrato sobre as larvas de *Rana catesbeiana* e *Rana clamitans* em seis diferentes concentrações e registraram que os girinos de *Rana catesbeiana* nas concentrações intermediárias apresentaram as maiores massas ao final do experimento que durou 15 dias, enquanto que para *R. catesbeiana* a massa no final do experimento não foi afetada pela concentração de nitrato.

O efeito negativo de um poluente sobre a massa dos girinos, tendência observada neste trabalho nas concentrações mais elevadas de LCCV, foi observado também em outros estudos. Sayim (2008) registrou um efeito negativo do pesticida Malathion sobre a massa de girinos de *Rana ridibunda* na Turquia. Ortiz *et al.*, (2004) observaram que embriões e larvas de seis espécies européias de anfíbios (*Pleurodeles waltl*, *Discoglossus galganoi*, *Pelobates cultripes*, *Bufo bufo*, *B. calamita* e *Hyla arborea*) apresentaram diminuição no crescimento em determinadas concentrações de fertilizante de nitrato de amônio.

Os girinos apresentam de forma geral, uma relação positiva entre massa na metamorfose e duração da fase larval (WEELS, 2007). Entretanto a maior massa nas concentrações intermediárias observada no trabalho realizado, não foi em função de um período larval mais longo, já que este parâmetro de desenvolvimento não variou significativamente entre os tratamentos.

Johansson *et al* (2006) realizaram testes em concentrações sub-letais de três pesticidas Azoxystrobin, Cyanazine e Permethrin com girinos de *Rana temporaria* tendo observado que a duração da fase larval não foi influenciada pela concentração em nenhum deles. Por outro lado, o herbicida Atrazina em pequenas concentrações acelerou o desenvolvimento de girinos de *Hyla versicolor* (DIANA *et al.*, 2000) e de *Bufo americanus* (FREEMAN; BECCUE; RAYBURN, 2005).



Nos diversos experimentos deste estudo, a correlação positiva citada acima, entre massa dos girinos e tempo de duração da fase larval, foi mais evidente nas concentrações menores. Nas concentrações maiores a tendência foi ausência de correlação ou, em alguns casos, correlação negativa.

A tendência de os girinos apresentarem menor massa nas concentrações maiores pode ser resultado do efeito do LCCV sobre a capacidade de absorção e/ou armazenamento do alimento. Ezemonye e Ilechie (2007) mediram o nível de glicogênio em girinos do *Ptychadena bibroni* do delta do rio Niger, Nigéria submetidos a diferentes concentrações do pesticida organofosfatado Basudin e observaram que o nível de glicogênio no corpo decaía com o aumento de concentração do pesticida e com o aumento do índice de letalidade.

Ainda que tenha havido, nos experimentos realizados, uma relação negativa entre concentração de LCCV e oxigênio dissolvido (OD), este variou dentro de uma faixa estreita de concentração, não sendo possível atribuir a ação tóxica do LCCV sobre os girinos de *L.vastus*, à carência de oxigênio. Os girinos de *L.vastus* provavelmente toleram águas com baixos níveis de oxigênio dissolvido, por serem animais de regiões tropicais que se desenvolvem em grandes densidades, dentro de poças de água parada que muitas vezes apresentam uma grande quantidade de matéria orgânica em decomposição e alcançam temperaturas relativamente elevadas. O pH também variou dentro de uma faixa estreita e provavelmente não afetou a sobrevivência e nem os parâmetros de desenvolvimento dos girinos.

A plasticidade em parâmetros do desenvolvimento como massa por ocasião da metamorfose e tempo de duração do período larval, é uma característica das larvas de anfíbios (NICIEZA, 2000). Esta plasticidade apresenta grande valor adaptativo especialmente para as espécies que se reproduzem em poços de água temporários, como *L. vastus* (LAURILA; KARTTUNEN; MERILA, 2002). As taxas de crescimento e desenvolvimento dos girinos podem ser afetadas por fatores bióticos como presença de predadores, quantidade e qualidade do alimento e por fatores abióticos como qualidade da água, temperatura e taxa de dessecação do habitat (GERLANC; KAUFMAN, 2005).

O efeito do LCCV sobre a massa por ocasião da metamorfose pode ter influência sobre a adaptabilidade das populações de *L.vastus*. O tamanho maior na metamorfose pode ser adaptativamente vantajoso por proporcionar maior tolerância ao dessecação e maior capacidade de locomoção que, por sua vez, acarreta maior proteção contra a predação

(LAURILA; KUJASALO, 1999). Além disso, maior tamanho na metamorfose geralmente se correlaciona com maior tamanho na idade adulta e, conseqüentemente, com maior fertilidade (ROSE, 2005).

Os efeitos tóxicos do LCCV sobre os girinos de *L.vastus*, observados neste estudo, podem ser uma conseqüência da presença nesta água residuária, de uma grande quantidade de taninos, compostos resistentes ao ataque microbiano e que podem ser tóxicos para vários tipos de organismos (BHAT; SINGH; SHARMA, 1998). Silva *et al.* (2004) registraram que taninos isolados de cascas do caule de *Magonia pubescens* apresentaram atividade larvicida em experimentos realizados com *Aedes aegypti*, enquanto que Santoro *et al.* (2004) estudaram o efeito dos taninos de *Stryphnodendron spp.* sobre a longevidade de abelhas (*Apis mellifera L.*) tendo concluído que o primeiro aumentou a mortalidade das últimas.

Os efeitos tóxicos do LCCV sobre os girinos de *L.vastus*, indicam que este composto pode apresentar também, ação nociva sobre outros organismos, especialmente girinos de outras espécies de anuros. Entretanto, deve-se considerar que a tolerância a um agente tóxico como o LCCV pode variar não apenas entre espécies, mas também entre populações de uma mesma espécie. Bridges e Semlitsch (2000) estudaram a variação da tolerância ao pesticida Carbaryl entre diferentes espécies de Ranidae e entre diferentes populações de *Rana sphenoccephala* e observaram que a magnitude da mudança de atividade de girinos em resposta aos níveis subletais do Carbaryl variou significativamente entre as espécies de Ranidae e também entre as populações de *Rana sphenoccephala*.

Outro ponto a ser considerado, é que os resultados obtidos nesta pesquisa poderiam apresentar variações se tivessem sido utilizados, no início dos experimentos, girinos em fases larvais mais iniciais ou mais tardias, já que a sensibilidade pode variar em função do estágio de desenvolvimento. Mann e Bidwell (1999) registraram que, em quatro espécies de anuros, recém metamorfoseados e adultos apresentavam menor sensibilidade que girinos ao herbicida Glifosato. Brodeur *et al.* (2008) registraram que no anuro *Rhinella arenarum*, embriões são mais resistentes ao herbicida Atrazina que girinos em fase final de metamorfose e que estes são mais resistentes que girinos em fase inicial de metamorfose.

Os experimentos deste estudo foram realizados em condições de laboratório, em que o LCCV em suas diferentes concentrações, era o único elemento com efeito tóxico potencial sobre os girinos. Entretanto, deve-se considerar que em condições naturais, o efeito

tóxico do LCCV pode ser amplificado pela ação conjunta com outros elementos tóxicos presentes no ambiente. Ortiz e Sparling (2007) analisaram os efeitos de compostos de nitrato e de sais de perclorato sobre larvas de *Rana sphenoccephala*. O primeiro composto apresenta efeito negativo sobre o desenvolvimento e sobrevivência de embriões e larvas de anuros, enquanto que o segundo inibe a metamorfose, tendo os autores registrados que, quando combinados, os dois compostos apresentaram efeitos aditivos sobre os girinos. Relyea (2004) por sua vez, analisou a toxicidade de quatro diferentes pesticidas (Diazinon, Carbaril, Malation e Glifosato) isoladamente e em combinações de dois, sobre a sobrevivência e crescimento larval de cinco espécies de anfíbios: *Rana clamitans*, *R. catesbeiana*, *Bufo americanus* e *Hyla versicolor*. O autor (RELYEA *op. cit.*) observou que, em alguns casos, a combinação de dois pesticidas apresentou um efeito tóxico maior que aquele apresentado por um dos pesticidas da combinação isoladamente.

A toxicidade de uma substância como o LCCV sobre girinos pode, por outro lado, ser afetada por fatores abióticos do ambiente. Thompson *et al.* (2002) em estudos com *Rana pipiens*, *R. clamitans* e *Xenopus laevis*, registraram que o efeito tóxico do herbicida Glifosato foi maior em pHs elevados, enquanto que o efeito tóxico de herbicida Triclopyr foi maior em pHs baixos.

Fatores bióticos do ambiente podem também alterar o efeito de toxicidade de uma substância como o LCCV sobre girinos. Relyea (2005b) observou que em girinos de *Rana sylvatica* na presença de predadores, o efeito do Glifosato foi duas vezes mais letal que na ausência deste, devido a um efeito sinérgico. Por sua vez, Lefcort e Meguire (1998) observaram que a capacidade de resposta dos girinos de *Rana luteiventris* à presença de predadores foi afetada negativamente em bioensaios com metais pesados.

Vários estudos abordaram o uso de anfíbios como bioindicadores, tendo sido Cooke (1981) foi um dos primeiros a analisar o uso de girinos como indicadores de poluição orgânica. Ferrari *et al.*, (1997) utilizaram girinos de *Bufo arenarum* em um ensaio de toxicidade em águas fluviais contaminadas por poluentes, enquanto que Hartwell, Welsh e Ollivier (1998) investigaram o impacto da deposição de sedimentos em cursos naturais de água, sobre a densidade de três espécies de anfíbios na Califórnia, tendo concluído que os mesmos representam bons indicadores em potencial de stress ambiental. Entretanto, o uso disseminado de anuros como bioindicadores, ainda depende do estabelecimento de critérios de qualidade de água para anfíbios, como ressaltado por Boyer e Grue (1995).

O uso potencial de anuros como indicadores de qualidade da água foi analisado na Itália, por Lebboroni e Ricchiardino (2006), que observaram que os girinos de *Rana italica* ocorriam sozinhos apenas em corpos de água com qualidade “excelente” ou “boa” e consideraram que a espécie apresentava potencial como bioindicadora. Tong (1999) investigou a possibilidade de usar anfíbios da espécie *Rana nigromaculata* como bioindicadores de poluição industrial na China, devido à necessidade de estabelecer em curto prazo, métodos de biomonitoramento e avaliação de toxicidade crônica de águas residuais industriais. Demichelis *et al.* (2001) realizaram um ensaio de toxicidade aguda utilizando girinos pré-metamórficos de *Bufo arenarum* como organismo sentinela, para avaliar a qualidade da água em rios que recebem tanto resíduos domésticos quanto industriais, em área urbana na Argentina, tendo sugerido o uso de bioensaios com girinos, em programas de monitoramento da poluição em água doce.

Bioensaios utilizando girinos apresentam grande potencial de utilização em todo o mundo, por sua simplicidade, baixo custo e confiabilidade (DEMICHELI *et al.*, 2001). Entretanto, a grande maioria dos estudos de ecotoxicologia com anfíbios utilizou, ou a espécie *Xenopus laevis*, forma africana amplamente criada em laboratórios em todo o mundo, ou espécies de Ranidae ou Bufonidae de zonas temperadas (HAILEY *et al.*, 2006). Os resultados obtidos nesta pesquisa indicam que os girinos de *Leptodactylus vastus*, espécie da região Neotropical, apresentam um bom potencial de utilização em estudos ecotoxicológicos e como bioindicadores de perturbações em ambientes aquáticos. Dentre as características presentes nesta espécie que a torna adequada para esses estudos, pode-se listar: a facilidade de obtenção, por ser um animal comum, ocorrendo inclusive em ambientes antropomorfizados; a presença de uma postura conspícua que produz grande número de ovos e larvas relativamente grandes e de fácil manipulação; o fato de não se apresentar sob perigo ou ameaça de extinção, e por seus girinos serem de fácil manejo em laboratório, não exigindo aeração ou filtração da água e nem rações especiais;

## 6 CONCLUSÕES

O LCCV apresenta um potencial efeito tóxico sobre os girinos de *Leptodactylus vastus*, tendo provocado um aumento na letalidade e uma diminuição no tamanho na metamorfose, nas mais altas concentrações testadas.

O LCCV nas concentrações testadas, não afetou a capacidade dos girinos sobreviventes de completar a metamorfose e nem o tempo de duração da fase larval.

O LCCV nas concentrações intermediárias testadas, contribuiu com um aumento na massa dos girinos por ocasião da metamorfose.

Os girinos de *L.vastus* apresentaram uma correlação positiva entre massa por ocasião da metamorfose e duração do período larval, exceto nas mais altas concentrações testadas.

## REFERÊNCIAS

- ANDREANI, P.; SANTUCCI, F.; NASCETTI, G. Le rane verdi del complesso *Rana esculenta* come bioindicatori della qualità degli ambienti fluviali italiani. **Biologia Ambientale**, v. 17, p.35-44, 2003.
- ALFORD, R. A.; RICHARDS, A. J. Global Amphibian Declines: A Problem in applied ecology. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 30, p.133-165, 1999.
- ARAÚJO, A. M. **Tratamento anaeróbio do líquido da casca de coco verde utilizando reator UASB**. 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil – Saneamento Ambiental) - Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Universidade Federal do Ceará, 2008.
- ARTHAUD, I. D. B.; FREITAS N. M. A.; LEITÃO, R. C.; SANTAELLA, S. T.; COSTA-LOTUFO, L. V. Avaliação da toxicidade do efluente gerado pelo processamento da casca do coco verde. In: **Congresso Brasileiro De Ecotoxicologia (Ecotox)**. Bento Gonçalves-RS. Resumo. p. 200, 2008.
- BEARD, K. H.; VOGT, K. A.; KULMATISKI, A. Top-down effects of a terrestrial frog on forest nutrient dynamics. **Oecologia**, v. 133, p. 583-593, 2002.
- BEEBEE, T. J. C. Amphibian breeding and climate. **Nature**, v. 347, p. 219-220, 1995.
- BEEBEE, T. J. C.; GRIFFITHS, R. A. The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? **Biological Conservation**, v. 125, p. 271–285, 2005.
- BHAT, T. K.; SINGH, B.; SHARMA, O. P. Microbial degradation of tannins – a current perspective. **Biodegradation**, v. 9, p. 343-357, 1998.
- BLAUSTEIN, A.R.; WAKE, D.B. Declining amphibian populations: a global phenomenon? **Trends in Ecology and Evolution**, v. 5, p. 203-204, 1990.
- BOYER, R.; GRUE, C. E. The Need for Water Quality Criteria for Frogs. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n.4, p.352-357, 1995.

BRIDGES, M. C.; SEMLITSCH, D. R. Variation in pesticide tolerance of tadpoles among and within species of Ranidae and patterns of amphibian decline. **Conservation biology**, v. 14, n. 5. p 1490-1499, 2000.

BRÍGIDA, A. I. S.; ROSA, M. F. Determinação do teor de taninos na casca de coco verde (*Cocos nucifera* L.). **Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture**, v. 47, 2003.

BRODEUR, J. C.; SVARTZ, G.; PEREZ-COLLA, C. S.; MARINO, D. J. G.; HERKOVITS, J. Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: Non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. **Aquatic Toxicology**, v. 91, p. 161-170, 2008.

CARDELLINI, P. E.; OMETTO, L. Teratogenic and Toxic Effects of Alcohol Ethoxylate and Alcohol Ethoxy Sulfate Surfactants on *Xenopus laevis* Embryos and Tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 48, p. 170-177, 2001.

CARO, T. M.; O'DOHERTY, G. On the use of surrogate species in Conservation Biology. **Conservation Biology**, v. 13, p.805, 1999.

CARRIJO, O. A.; LIZ, R. S.; MAKISHIMA, N. Fibra da casca de coco verde como substrato agrícola. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.4, p.533-535, 2002.

CHRISTOPHER, R. L. O. M.; KINNEY, A. P.; FIORI, J. D.; CONGDON; ROWE, C. L. Oral deformities in tadpoles (*Rana catesbeiana*) associated with coal ash deposition: effects on grazing ability and growth. **Freshwater Biology**, v. 36, p. 723-730, 1996.

COOKE, A. S. Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field. **Environmental Pollution**, v.25A, p.123-133, 1981.

DEMICHELIS, S. O.; LATORRE, F. R. DE; FERRARI, L.; GARCÍA, M. E.; SALIBIÁN, A. Tadpoles assay: its application to a water toxicity Assessment of a polluted urban river. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 68, p. 63–73, 2001.

DIANA, S.G.; RESETARITS Jr. W.J.; SCHAEFFER, D.J.; BECKMEN, K.B.; BEASLEY, V.R. Effects of atrazine on amphibian growth and survival in artificial aquatic communities. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, p. 2961–2967, 2000.

EMBRAPA. Unidade de beneficiamento de casca de coco verde. **Agroindústria Tropical**, n.113, p.6-7, 2005.

EZEMONYE, L. I. N.; ILECHIE, I. Ecological effects of pesticides contamination on amphibian tadpoles (*Ptychadena bibroni*) of the niger delta of Nigeria. **Estudos de Biologia**, v. 28, n. 64, p. 91-100, 2006.

EZEMONYE, L. I. N.; ILECHIE, I. Acute and chronic effects of organophosphate pesticides (Basudin) to amphibian tadpoles *Ptychadena bibroni*. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n.13, p. 1554-1558, 2007.

FERNICOLA, N.A.G.G.; BOHRER-MORER, M.B.C.; BAINY, A.C.D. Ecotoxicologia. In: Azevedo, F.A., CHASIN, A.A.M. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. Rima Editora, São Carlos. p. 221-244, 2003.

FERRARI, L.; DEMICHELIS, S. O.; GARCIA, M. E.; TORRE F. R. de La; SALIBIÁN, A. Premetamorphic anuran tadpoles as test organism for an acute aquatic toxicity assay. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v.12, n.2, p.117-121, 1997.

FREEMAN, J.L.; BECCUE, N.; RAYBURN, A.L. Differential metamorphosis alters the endocrine response in anuran larvae exposed to T3 and atrazine. **Aquatic Toxicology**, v. 75, p. 263–276, 2005.

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/American Museum of Natural History>>. Acesso em: 12 fev. 2009.

GERLANC, N. M.; G. A. KAUFMAN. Habitat of Origin and Changes in Water Chemistry Influence Development of Western Chorus Frogs. **Journal of Herpetology**, v.39, n.2, p.254-265, 2005.

GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v.16, p.183-190, 1960.



GREULICH, K.; PFLUGMACHER, S. Uptake and Effects on Detoxication Enzymes of Cypermethrin in Embryos and Tadpoles of Amphibians. **Archives Environmental Contamination Toxicology**, v. 47, p. 489–495, 2004.

GRIYS-KYLE, K. L.; RITCHIE, M.E. Amphibian survival, growth and development in response to mineral nitrogen exposure and predator cues in the Weld: an experimental approach. **Oecologia**, v. 152, p. 633–642, 2007.

HAILEY, A.; SOOKOO, N.; MOHAMMED, A.; KHAN, A. Factors affecting tadpole growth: Development of a rearing system for the Neotropical leptodactylid *Physalaemus pustulosus* for ecotoxicological studies. **Applied Herpetology**. v. 3, p. 111-128, 2006.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed spearman-karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science Technology**, v.12, n.4, p.417, 1978.

HARTWELL, H.; WELSH, J.; OLLIVIER, M. Stream amphibians as indicators of ecosystem stress: a case study from California's redwoods. **Ecological Applications**, v.8, n.4, p.1118-1132, 1998.

HASLAM, E. Pratical Polyphenolics: from Structure to Molecular Recognition and Physiological Function. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 10, p. 339, 1999.

HAYWOOD, L. K.; ALEXANDER, G. J. *Xenopus laevis* embryos and tadpoles as models for testing for pollution by zinc, copper, lead and cadmium. **African Zoology**, v.39, p.163-174, 2004.

HEYER, W. R. The adaptive ecology of the species groups of the genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Evolution**, v. 23, p. 421–428, 1969.

HEYER, W. R. Variation and taxonomic clarification of the large species of the *Leptodactylus pendactylus* species group (Amphibia: Leptodactylidae) from Middle America, Northern South America, and Amazonia. **Arquivos de Zoologia**, v.37, n.3, p.269-348, 2005.

JOHANSSON, M.; PIHA H.; KYLIN H.; MERILA, J. Toxicity of six pesticides to common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. **Environmental Toxicology and Chemistry** v. 25, n. 12, p. 3164–3170, 2006.

KÄMPF, A.N.; FERMINO, M.H. Substratos para plantas: a base da produção vegetal em recipientes. In: **ENCONTRO NACIONAL SOBRE SUBSTRATO PARA PLANTAS**, 2000, Porto Alegre-RS. Anais...Porto Alegre: Genesis, p. 312, 2000.

LAURILA, A.; KARTTUNEN, S.; MERILA, J. Adaptive phenotypic plasticity and genetics of larval life histories in two *Rana temporaria* populations. **Evolution**, v.56, n. 3, p.617-627, 2002.

LAURILA, A.; KUJASALO, J. Habitat Duration, Predation Risk and Phenotypic Plasticity in Common Frog (*Rana temporaria*) Tadpoles. **The Journal of Animal Ecology**, v.68, n.6, p. 1123-1132, 1999.

LEBBORONI, M.; RICCHIARDINO, G. Potential use of anurans as indicators of biological quality in upstreams of central Italy. **Amphibia-Reptilia**, v.27, n.1, p.73-79, 2006.

LEFCORT, H., R.; MEGUIRE, A. Heavy metals alter the survival, growth, metamorphosis, and antipredatory behavior of Columbia spotted frog (*Rana luteiventris*) tadpoles. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.35, p.447-456, 1998.

LITCHFIELD, J.T.; WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics**, v. 95, p. 99-113, 1949.

MANN, R. M.; BIDWELL, J. R. The Toxicity of Glyphosate and Several Glyphosate Formulations to Four Species of Southwestern Australian Frogs. **Archives Environmental Contamination Toxicology**, v. 36, p. 193–199, 1999.

MARCO, A.; CASH, D.; BELDEN, L. K.; BLAUSTEIN, A. R. Sensitivity to Urea Fertilization in Three Amphibian Species. **Archives Environmental Contamination Toxicology**, v. 40, p. 406–409, 2001.

MARQUIS, O.; MILLERY, A.; GUITTONNEAU, S.; MIAUD, C. Solvent toxicity to amphibian embryos and larvae. **Chemosphere**, v. 63, p. 889–892, 2006.

NIEMI, G. J.; MCDONALD, M. E. Application of ecological indicators. **Annual Review on Ecology, Evolution and Systematics**, v. 35, p.89–111, 2004.

McCARTY, J. P. 2001. Ecological consequences of recent climate change. **Conservation Biology**, v. 15, p. 320-331, 2001.

NICIEZA, A. G. Interacting effects of predation risk and food availability on larval anuran behaviour and development. **Oecologia**, v. 123, p. 497-505, 2000.

OLDHAM, R.S.; LATHAM D.M.; HILTON-BROWN D.; TOWNS, M.; COOKE A.S.; BURN, A. The effect of ammonium nitrate fertiliser on frog (*Rana temporaria*) survival. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 61, p. 69-74, 1997.

ORTIZ, M. E.; MARCO, A.; SAIZ, N.; LIZANA, M. Impact of ammonium nitrate on growth and survival of six european amphibians. **Archives Environmental Contamination Toxicology**, v. 47, p. 234-239, 2004.

ORTIZ, M. E.; SPARLING, D. W. Alteration of Larval Development and Metamorphosis by Nitrate and Perchlorate in Southern Leopard Frogs (*Rana sphenocephala*). **Archives Environmental Contamination Toxicology**, v. 53, p. 639–646, 2007.

PICKFORD, D.B.; HETHERIDGE, M.J.; CAUNTER, J. E.; HALL, T.; HUTCHINSON, T.H. Assessing chronic toxicity of bisphenol A to larvae of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) in a flow-through exposure system. **Chemosphere**, v. 53 p. 223–235, 2003.

PINO, G.A.H. Biossorção de Metais Pesados Utilizando Pó da Casca de Coco Verde (Cocos nucífera). **Dissertação de Mestrado** - Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, p. 113, 2005.

PINTO, G. A. S. Rotas tecnológicas para o aproveitamento e valorização da casca de coco verde. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical (Formulário de proposta (Macroprograma 2 – Competitividade e Sustentabilidade Setorial). p. 71, 2003.

POLLET, I.; BENDELL-YOUNG, L. I. Amphibians as indicators of wetland quality in wetlands formed from oil sands effluent. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, p. 2589-2597, 2000.

PRADO, C. P. D. A.; UETANABARO, M.. Description of a New Reproductive Mode in *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae), with a Review of the Reproductive Specialization toward Terrestriality in the Genus. **Copeia**, v. 2002, n.4, p.1128-1133, 2002.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. **Hemisphere**, p. 1-28, 1985.

RELYEA, R. A. Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 1737–1742, 2004.

RELYEA, R. A. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. **Ecological Applications**, v. 15: p. 618–627, 2005a.

RELYEA, R. A. The Lethal Impacts of Roundup and Predatory Stress on Six Species of North American Tadpoles. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 48, p. 351–357, 2005b.

ROSA, M. F.; SANTOS, F. J. S.; MONTENEGRO, A. A. T.; ABREU, F. A. P.; CORREIA, D.; ARAÚJO, F. B. S.; NORÕES, E. R. V. Caracterização do pó da casca de coco verde usado como substrato agrícola. 54. Fortaleza: **Comunicado Técnico Embrapa Agroindústria Tropical**, p.1-6, 2001.

ROSE, C. S. Integrating ecology and developmental biology to explain the timing of frog metamorphosis. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, n. 3, p. 129-135, 2005.

RYAN, T. J.; WINNE, C. T. Effects of Hydroperiod on Metamorphosis in *Rana sphenoccephala*. **The American Midland Naturalist**, v.145, n.1, p. 46-53, 2001.

SAHA, S.; KAVIRAJ, A. Acute Toxicity of Synthetic Pyrethroid Cypermethrin to Some Freshwater Organisms. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, p. 49-52, 2008.

SANTORO, K.R.; VIEIRA, M.E.Q.; QUEIROZ, M. L.; QUEIROZ, M.C.; BARBOSA, S.B.P. Effect of *Stryphnodendron spp.* Tanino on *Apis mellifera* L. (Africanized bees) longevity. **Archivos de Zootecnia**, v. 53, n. 203, p. 281-291, 2004.

SAYIM, F. Acute Toxic Effects of Malathion on the 21st tage Larvae of the Marsh Frog. **Turkey Journal of Zoology**, v. 32, p.99-106, 2008.

SAYIM, F.; KAYA, U. Effects of Dimethoate on Tree Frog (*Hyla arborea*) Larvae. **Turkey Journal of Zoology**, v.30 p. 261-266, 2006.

SBH. 2009. Brazilian amphibians – List of species. **Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH)**. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br>> Acessado em: 10 mar. de 2010.

SCHROEDER, T. M. F. The effect of Zn<sup>2+</sup> on glucose 6-phosphate dehydrogenase activity from *Bufo arenarum* toad ovary and alfalfa plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v. 60, p. 123–131, 2005.

SEALE, D. B. Influence of amphibian larvae on primary production, nutrient flux, and competition in a pond ecosystem. **Ecology**, v.61, p. 1531-1550, 1980.

SILVA, H. H G.; SILVA, I. G.; SANTOS, R. M. G.; FILHO, E. R.; ELIAS, C. N. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 37, n.5, p. 396-399, 2004.

SMITH, G. R.; BURGETT, A. A. Effects of Three Organic Wastewater Contaminants on American Toad, *Bufo americanus*, Tadpoles. **Ecotoxicology**, v. 14, p. 477–482, 2005.

SMITH, G.R.; TEMPLE, K.G.; DINGFELDER, H. A.; VAALA, D. A. Effects of nitrate on the interactions of the tadpoles of two ranids (*Rana clamitans* and *R. catesbeiana*). **Aquatic Ecology**, v. 40, p. 125 –130, 2006.

SMITH, G. R.; TEMPLE K. G.; VAALA, D. A.; DINGFELDER, H. A. Effects of Nitrate on the Tadpoles of Two Ranids (*Rana catesbeiana* and *R. clamitans*) **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 49, p. 559–562, 2005.

SPARLING, D.W.; FELLERS, G. Comparative toxicity of chlorpyrifos, diazinon, malathion and their oxon derivatives to larval *Rana boylei*. **Environmental Pollution**, v. 147, p. 535-539, 2007.

SPENCER, C. M.; CAI, Y.; MATIN, R.; GAFFINEY, S. H.; GOULDING, P.N.; MAGNOLATO, D.; LILLEY, T. H.; HASLAM, E. Polyphenol complexation - some thoughts and observations. **Phytochemistry**, v.27, p.2397-2409, 1998.

STEWART, M. M; L. L. WOOLBRIGHT. Amphibians. in D. P. Reagan & R. B. Waide (eds.), **The Food Web of a Tropical Rain Forest**. University of Chicago Press. p. 273-320, 1996.

THOMPSON, D.; WOJTASZEK, B.; EDGINTON, A.; CHEN, C.; GERALD; BOERMANS, H. Multiple Stressor Effects on Native Amphibians in Canada: Linking laboratory and field studies. **The society for environmental toxicology & chemistry**. v. 49, p. 11, 2002.

TONG, Z. Study on fish and amphibian embryo-larval toxicity Test. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 55, p. 363-369, 1999.

TRUGILLHO, P. F.; CAIXETA, R. P.; LIMA, J. T.; MENDES, L. M. Avaliação do conteúdo em taninos condensados de algumas espécies típicas do cerrado mineiro. **CERNE**, v.3, n.1, p. 01-13, 1997.

TRUHAUT, R.; BUTLER, G.C. Introduction. In:\_\_\_\_. **Principles of Toxicology**. Scientific Committee the Problems of the Environment (SCOPE) of the International Council of Scientific Unions. **SCOPE**, n. 12, p. 350, 1978.

UNRINE, J. M.; JAGOE, C. H.; HOPKINS, W. A.; BRANT, H. A. Adverse effects of ecologically relevant dietary mercury Exposure in southern leopard frog (*rana sphenoccephala*) larvae. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 12, 2004.

US-EPA. **Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Water to Marine and Estuarine Organisms**. Second Edition. EPA-600-4-91-003, 1994.

U.S -EPA. **Methods for evaluating wetland condition: using amphibians in bioassessments of wetlands.** Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. EPA-822-R-02-022, 2002.

VENTURINO, A. A.; ANGUIANO, O. L.; GAUNA, L.; COCCA, C.; BERGOC, R. M.; PENCHEN DE D'ANGELO, A. M. Thiols and polyamines in the potentiation of malathion toxicity in larval stages of the toad *Bufo arenarum*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, parte C, v.130, p. 191-198, 2001.

VIAL, J.L.; SAYLOR, L. **The Status of Amphibian Populations: a Compilation and Analysis.** IUCN/SSC Declining Amphibian Taskforce. Work. Doc. No. 1, 1993.

VIEIRA, W. L. S.; SANTANA, G. G.; VIEIRA, K.S. Description of the tadpole of *Leptodactylus vastus* (Anura: Leptodactylidae) **Zootaxa**, v. 1529, p. 61–68, 2007.

VITT, L. J.; CALDWELL, J.P.; WILBUR, H.M.; SMITH, D.C. Amphibians as harbingers of decay. *BioScience*, v. 40, p. 418-18, 1990.

WELLS, K.D. **The ecology and behavior of amphibians.** Chicago: University of Chicago Press. p. 1148, 2007.

WELSH, H. H. Jr. Relictual amphibians and old-growth forests. **Conservation Biology**, v. 4, p. 309-319, 1990.

WELSH, H. H. JR.; OLLIVIER, L. M. Stream amphibians as indicators of ecosystem stress: A case study from California's Redwoods. **Ecological Applications**, v. 8, p. 1118-1132, 1998.

WYMAN, R. L. Experimental assessment of salamanders as predators of detrital food webs: effects on invertebrates, decomposition and the carbon cycle. **Biodiversity and Conservation**, v. 7, p. 641-650, 1998.