UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
Programa de Pós Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental

ANA MARIA VASCONCELOS

Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE sobre girinos de *Lithobates catesbeianus* (Amphibia, Anura, Ranidae)

São Carlos – SP
2014

ANA MARIA VASCONCELOS

Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE sobre girinos de *Lithobates catesbeianus* (Amphibia, Anura, Ranidae)

Tese apresentada a Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Ciências da Engenharia Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Evaldo L. G. Espíndola

São Carlos – SP
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

V
331a

Vasconcelos, Ana Maria
Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE sobre girinos de Lithobates catesbeianus (Amphibia, Anura, Ranidae) / Ana Maria Vasconcelos; orientador Evaldo L. G. Espíndola. São Carlos, 2014.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental e Área de Concentração em Ciências da Engenharia Ambiental -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2014.

1. Ecotoxicologia. 2. Girinos. 3. Agrotóxico. 4. Mesocosmo. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharel e Licenciada **ANA MARIA VASCONCELOS.**

Título da tese: "Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE sobre girinos de *Lithobates catesbeianus* (Amphibia, Anura, Ranidae)".

Data da defesa: 25/04/2014

Comissão Julgadora:	**Resultado:**
Prof. Associado **Evaldo Luiz Gaeta Espíndola (Orientador)** (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)	Aprovado
Dra. **Cláudia Fileto** (Pesquisadora FIPAI/EESC)	Aprovada
Profa. Dra. **Mônica Jones Costa** (Universidade Federal de São Carlos/UFSCar-Sorocaba)	APROVADA
Profa. Dra. **Cláudia Maris Ferreira Mostério** (Instituto de Pesca/SP)	APROVADA.
Prof. Dr. **Cristiano Venícius de Matos Araújo** (Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí/ULEAM-Equador)	APROVADA

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental:
Prof. Dr. **Frederico Fabio Mauad**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Evaldo L. G. Espíndola, que sempre me fez acreditar que eu seria capaz, por todo o incentivo e conselhos, pela paciência e amizade;

Às amigas Juliana Resende e Maressa Casali, cuja cooperação e trabalho em conjunto foi essencial para que esse estudo se concretizasse;

A Tatiane Canali, Carolina e Gilberto pela colaboração na montagem do experimento e coleta dos dados;

A Andrea e Bruna por me acolherem tão bem e me ensinarem tanto;

Aos meus amigos de laboratório (e da vida) pela troca de experiência e pelos bons momentos;

À professora Clarice M. R. Botta pelo incentivo e amizade;

Aos técnicos do NEEA, Amândio M. Nogueira e Marcelo M. Nogueira, pela colaboração nas análises e desenvolvimento da pesquisa;

Ao professor Dr. Alberto Carvalho Peret pelo auxílio nas análises estatísticas;

À professora Claudia Maris Ferreira e Monica Jones Costa que sempre estiveram dispostas a esclarecer dúvidas;

À professora Isabel Lopes, da Universidade de Aveiro, pelo acolhimento e colaboração;

Aos funcionários do CRHEA, Nelson e José Luís, pela disponibilidade e prontidão;

A minha mãe pelo eterno apoio;

Ao Denis pelo companheirismo e paciência;

E ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

RESUMO

Vasconcelos, A. M. **Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE sobre girinos de *Lithobates catesbeianus* (Amphibia, Anura, Ranidae).** Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2014.

A intervenção das atividades antrópicas ao meio ambiente tem repercutido na estrutura e funções dos ecossistemas, sendo que o uso de aditivos químicos, como agrotóxicos e fertilizantes, destacam-se pela parcela de responsabilidade que assumem diante desses desequilíbrios. O agrotóxico Vertimec® 18CE, cuja toxicidade para diversas taxóns já é conhecida, é amplamente utilizado em lavouras agrícolas, e têm-se conhecimento a respeito das intensas práticas de manuseio, muitas vezes irregulares, o que pode fazer com que concentrações muito maiores do que as previstas atinjam o ambiente aquático. Um dos grupos que nos últimos anos vem se destacando pelo declínio crescente associado ao uso destes produtos são os anfíbios. Os anfíbios possuem papel central na cadeia alimentar, e muitos estudos relatam o desequilíbrio ecológico causado pelo declínio desse grupo em relação a adição de contaminantes, incluindo os agrotóxicos. No presente estudo foram desenvolvidos testes laboratoriais a fim de determinar o estágio dos girinos de *Lithobates catesbeianus* mais suscetível à intervenção do agrotóxico e à concentração capaz de causar mortalidade em 50% dos indivíduos ($CL_{50,}$ 96h). A partir desses resultados, experimentos *in situ* (mesocosmos) com girinos no estágio mais avançado (25 da tabela de Gosner) foram desenvolvidos com o intuito de comparar as diferenças de toxicidade do Vertimec® 18CE quando manipulado em campo e laboratório, e quais os efeitos causados por uma única aplicação do produto e por aplicações múltiplas. Os testes laboratoriais demonstraram que os girinos em estágios mais precoce (21G) foram mais sensíveis ao agrotóxico Vertimec® 18CE do que àqueles mais avançados (25G). O experimento em campo indicou que a CL_{50}, 96h para *L. catesbeianus* (25G) foi muito mais agressiva quando próxima às condições naturais, causando a mortalidade de todos os indivíduos no mesmo estágio de desenvolvimento em um período inferior a 24 horas. Entretanto, a concentração inferior à CL_{50}, 96h (0,002 ml de Vertimec.L^{-1}) quando ministrada em campo, assim como no laboratório, não causou mortalidade, mas implicou em atraso no desenvolvimento e maior período larval do que àqueles organismos que não estiveram em contato com o agrotóxico, já que atingiu os recursos disponíveis, promovendo um efeito indireto no sucesso dessa espécie. Não foi possível observar diferença entre as aplicações única e múltipla do Vertimec® 18CE, em decorrência da morte dos girinos do tratamento em dosagem múltipla, porém observou-se desequilíbrio das condições limnológicas do sistema ao sofrer nova intervenção do Vertimec® 18CE. Diante dos resultados obtidos é possível concluir que o Vertimec® 18CE é capaz de afetar diretamente (mortalidade, estágios de desenvolvimento e comportamento) e indiretamente (redução de recursos alimentares) a população de *Lithobates catesbeianus*, contribuindo para o declínio de anfíbios nos sistemas naturais.

Palavras-chave: ecotoxicologia, girinos, agrotóxico, mesocosmo

ABSTRACT

Vasconcelos, A. M. **Evaluation of the effects of the pesticide Vertimec® 18EC on tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Amphibia, Anura, Ranidae)**. Thesis (Ph.D.) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2014.

The intervention of anthropogenic activities to the environment has reflected in the structure and functions of ecosystems and the use of chemical additives, such as pesticides and fertilizers, has contributed for the disequilibrium. The Vertimec® 18EC, whose toxicity is described to different taxa, is widely used in agricultural crops, and it has been known about the intense handling practices, often irregular, which can reach higher concentrations than those expected in the aquatic environment. One group that has been highlighted in recent years by the increasing decline associated with the use of these products is the amphibians. Amphibians plays a central role in the food chain and several studies have related the ecological disequilibrium caused by the decline of this group due to the addition of contaminants, including pesticides. In this study, laboratory bioassays were developed to determine the more susceptible stage and the LC_{50},96h of *Lithobates catesbeianus* to Vertimec® 18EC. From these results, *in situ* experiments (mesocosms) were conducted with tadpoles in more advanced stage (25 of Gosner table) in order to compare the differences in toxicity of Vertimec® 18EC when manipulated both in field and in laboratory. Also, the effects caused by a single and multiple application of the pesticides were evaluated. The laboratorial results showed that earlier stages (21G) were more sensitive than more developing tadpoles (25G), and the effects of the pesticide were more aggressive under natural conditions (mesocoms), with 100% of mortality before 24 hours, at the same developmental stage. The results of laboratorial and *in situ* bioassays indicated that the lower concentration (0.002 ml Vertimec.L^{-1}) didn't cause mortality, but alterations on development stage and larval period time were observed, indicating indirect effects (available resources) on the success of this species. On the other hand, no difference was found between the single and multiple applications of Vertimec® 18EC because all organisms died in the unique dosage treatment, but it was possible to verify limnological alterations after the second application of the pesticide. Considering the results obtained we conclude that Vertimec® 18EC can affect directly (mortality, development stages and behavior) and indirectly (food reduction) the population of *Lithobates catesbeianus*, contributing to the decline of amphibians in the natural systems.

Keywords: ecotoxicology, tadpoles, pesticides, mesocosm

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das interações entre sistema terrestre e aquático associadas à distribuição dos agrotóxicos no ambiente (Modificado de Tomita; Beiruth, 2002). 20

Figura 2. Girino e adulto de *Lithobates catesbeianus*, a rã-touro. Disponível em http://www.amnh.org/ e http://www.hylawerkgroep.be/. Acesso em fevereiro de 2014. 36

Figura 3. Aquários de manutenção e aclimatação dos girinos de *L. catesbeianus* mantidos em laboratório sob condições controladas. 38

Figura 4. Montagem dos testes de toxicidade aguda e crônica laboratoriais com girinos de *L. catesbeianus* no estágio 25 de Gosner (1960). 39

Figura 5. Teste de toxicidade crônica com girinos de *L. catesbeianus*, com duração total de 576 horas e renovação parcial da solução de Vertimec® 18CE em 50% do volume total a cada 96 horas de experimento. 41

Figura 6. Esquematização do sistema de multi compartimentos para a realização do teste de evitamento, com destaque para um dos compartimentos. (Fonte: Araújo et al., 2014). . 42

Figura 7. (a) Área de realização do estudo em fase de preparação. (b) Montagem dos experimentos *in situ*. 44

Figura 8. (a) Representação do mesocosmo com pesos de concreto no entorno para assegurar sua fixação ao sedimento. (b) Revestimento interno de sombrite para facilitar a retirada e inspeção de girinos mortos e/ou metamorfoseados. 45

Figura 9. Vista geral da área de estudo, coberta por plástico durante a noite e períodos de chuva para evitar a diluição do agrotóxico. 45

Figura 10. Disposição dos mesocosmos no tanque de concreto, com a respectiva representação dos tratamentos, onde: C representa o controle; CG controle com girinos de *L. catesbeianus*; DM a aplicação do Vertimec® 18CE em duas doses com intervalos de 12 dias; DMG representa o tratamento com duas doses de Vertimec® 18CE com a presença de girinos de *L. catesbeianus*; DU, é a manipulação do Vertimec® 18CE em uma única dose equivalente a CL_{50}, 96h encontrada em laboratório para girinos de rã-touro; e DUG, que contava com as mesmas condições do tratamento anterior, porém com a inserção de girinos de *L. catesbeianus*. 46

Figura 11. Contaminação dos tratamentos com solução padrão de Vertimec® 18CE nas respectivas diluições, nos tratamentos DM (dose múltipla), DMG (dose múltipla com girinos), DU (dose única) e DUG (dose única com girinos) e homogeinização de cada mesocosmo anteriormente a inserção do lote de girinos. 47

Figura 12. Aclimatação dos girinos a temperatura dos mesocosmos anteriormente à adição destes a cada mesocosmo. 48

Figura 13. Medição de parâmetros limnológicos com sonda multi parâmetros da marca Horiba. 49

Figura 14. Coleta de amostras de sedimento através de tubo coletor de PVC. 51

Figura 15. Valores da CL_{50}, 96h, limite inferior e superior calculados nos testes de toxicidade aguda realizado com girinos de *L. catesbeianus* nos estágio 21G, expostos ao Vertimec® 18CE. 56

Figura 16. Média e desvio padrão dos valores dos parâmetros físicos e químicos obtidos nos três testes de toxicidade laboratoriais com girinos de *L. catesbeianus* no estágio 21G, onde i: inicial e f: final. 57

Figura 17. Valores de CL_{50}, 96h, limite superior e inferior calculados nos testes de toxicidade aguda realizado com girinos de *L. catesbeianus* no estágio 25G, expostos ao Vertimec® 18 CE. 58

Figura 18. Média e desvio padrão dos valores dos parâmetros físicos e químicos obtidos nos quatro testes de toxicidade aguda com girinos de *L. catesbeianus* no estágio 25G, onde i: inicial e f: final. 59

Figura 19. Percentual de girinos em cada estágio de desenvolvimento após as 576 horas de experimento em laboratório com o agrotóxico Vertimec® 18CE. Os estágios que não se encontram representados na figura são aqueles cujo valor foi igual a zero. 61

Figura 20. Valor do peso médio final e desvio padrão dos girinos sobreviventes de cada tratamento do teste crônico laboratorial com duração de 24 dias. 62

Figura 21. Valores de pH, oxigênio dissolvido, condutividade e temperatura obtidos durante o teste crônico laboratorial com a espécie *L. catesbeianus*, expostos ao Vertimec® 18 CE. 63

Figura 22. Percentual de evitamento dos girinos de *L. catesbeianus* expostos a diferentes percentuais do agrotóxico Vertimec® 18CE em um sistema de multi compartimentos no teste de evitamento. 64

Figura 23. Valores das variáveis físicas e químicas de água dos mesocosmos obtidas *in situ* durante 480 horas de experimento com a espécie *L. castebeianus* nos diferentes tratamentos. 67

Figura 24. Valores das concentrações das formas fosfatadas (fosfato inorgânico, fósforo total e fosfato total dissolvido) e silicato obtidas a partir de amostras da água dos mesocosmos durante o experimento em campo (480 horas) nos diferente tratamentos. 69

Figura 25. Valores das concentrações das formas nitrogenadas (íon amônio, nitrogênio orgânico total, nitrito e nitrato) obtidas a partir de amostras de água provenientes dos mesocosmos durante o período experimental (480 horas) em cada tratamento. 72

Figura 26. Dispersão dos escores das variáveis limnológicas consideradas e dos tratamentos ao longo do período de amostragem, representados nos dois primeiros eixos, sendo C: controle; CG: controle com girinos, DM: dose múltipla; DMG: dose múltipla com girinos; DU: dose única; DUG: dose única com girino; Temp: temperatura; OD: oxigênio dissolvido; Turb: turbidez; PT: fósforo total; PTD: fosfato total dissolvido; POI: fosfato inorgânico; NH4: iôn amônio; NT: nitrogênio total; NO2: nitrito; NO3: nitrato; SiO_2: silicato. 73

Figura 27. Distribuição temporal das variáveis físicas e químicas durante o experimento em mesocosmos obtida a partir da análise de componentes principais, e definição de grupos formados pelos tratamentos. C: controle; CG: controle com girinos, DM: dose múltipla; DMG: dose múltipla com girinos; DU: dose única; DUG: dose única com girino; Temp: temperatura; OD: oxigênio dissolvido; Turb: turbidez; PT: fósforo total; PTD: fosfato

total dissolvido; POI: fosfato inorgânico; NH4: iôn amônio; NT: nitrogênio total; NO2: nitrito; NO3: nitrato; SiO2: silicato. 75

Figura 28. Classificação dos mesocosmos em relação ao grau de trofia calculado em função das concentrações de fósforo total, clorofila *a* e do valor médio durante período de estudo, de acordo com os índices desenvolvidos para reservatório, segundo o Índice de Carlson, modificado por Lamparelli (2004). IET: Índice de Estado Trófico; C: controle; CG: controle com girinos; DM: dose múltipla; DMG: dose múltipla com girinos; DU: dose única; DUG: dose única com girinos. 77

Figura 29. Valores das concentrações de fósforo total, nitrogênio total e matéria orgânica obtidas em amostras de sedimento coletadas nos mesocosmos no período inicial (0 h) e final do experimento (480 h). (C: controle; CG: controle com girinos; DM: dose múltipla; DMG: dose múltipla com girinos; DU: dose única; DUG: dose única com girinos) 79

Figura 30. Sobrevivência dos girinos durante o período experimental em mesocosmos (480 horas) para cada tratamento. CG: controle com girinos; DMG: dose múltipla com girinos; DUG: dose única com girinos. 81

Figura 31. Percentual de girinos de *L. catesbeianus* em cada estágio de desenvolvimento para cada tratamento ao final do período experimental em campo. CG: controle com girinos; DMG: dose múltipla com girinos. 82

Figura 32. (a) Comparação entre peso do lote inicial de girinos de *L. catesbeianus* e o peso médio de todos os indivíduos sobreviventes ao final do experimento *in situ* (480 h) em cada tratamento, com o respectivo desvio padrão. (b) Comparação do peso médio dos girinos de *L. catesbeianus* dentro de cada estágio de desenvolvimento em cada tratamento do experimento *in situ* ao final das 480 horas do período experimental. (CG: controle com girinos; DMG: dose múltipla com girinos). 83

Figura 33. (a) Comparação entre o valor médio do comprimento dos girinos de *L. catesbeianus* peretencentes ao lote inicial (anteriormente ao início do experimento) e os valores médios do comprimento total dos girinos sobreviventes em cada tratamento ao final do período experimental em mesocosmos (480 h). (b) Comparação do valor médio do comprimento dos girinos de *L. catesbeinus* dentro de cada estágio de desenvolvimento em cada tratamento do experimento *in situ* ao final da 480 horas de experimento. (CG: controle com girinos; DMG: dose múltipla com girinos). 84

Figura 34: Desenho esquemático do comportamento das variáveis limninológicas em função da presença do agrotóxico Vertimec® 18CE e girinos de rã touro, *L. catesbeianus*, no experimento realizado em mesocosmos. 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Metodologia utilizada para análise das variáveis físicas, químicas e biológicas da água dos mesocosmos. 50

Tabela 2 - Metodologia utilizada para análise de nutrientes em amostras de sedimento dos mesocosmos. 51

Tabela 3 - Etapas de coletas de amostras de água e sedimento dos mesocosmos para análises laboratoriais e em campo, e identificação e monitoramento dos girinos de *L. catesbeianus*. 52

Tabela 4 - Classificação dos corpos d'água em função da concentração de nutrientes e níveis de produtividade quando comparados às condições naturais saudáveis. Adaptada da CETESB (2013) 53

Tabela 5 - Valores de CL_{50}, 96h encontrados para o cobre, para girinos de *L. catesbeianus* em diferentes estágios de desenvolvimento. 55

Tabela 6 - Comparação por ANOVA (Tukey) dos valores de CL_{50}, 96h obtidos para os dois diferentes estágios de desenvolvimento (21G e 25G) de *L. catesbeianus*. 60

Tabela 7 - Concentração de metais encontrada em amostras de água dos mesocosmos (em $mg.L^{-1}$) para cada tratamento em comparação aos valores máximos estabelecidos pela CONAMA 357/05 para águas de classe 1. Os tratamentos em que os números não estão expressos estiveram abaixo do limite de detecção do método (Apêndice B), e aqueles em destaques foram superiores ao valores comparados. C: controle; CG: controle com girinos, DM: dose múltipla; DMG: dose múltipla com girinos; DU: dose única; DUG: dose única com girino 76

Tabela 8 - Valores das concentrações de metais biodisponíveis (em $mg.kg^{-1}$) encontrados em amostras sedimento coletadas ao início (0 h) e final (480 h) do experimento para cada tratamento. (C: controle; CG: controle com girinos; DM: dose múltipla; DMG: dose múltipla com girinos; DU: dose única; DUG: dose única com girinos). 80

Tabela 9 - Valores dos *end points* analisados ao final do período experimental em mesocosmos para girinos de *L. catesbeianus*, onde CG: controle com girinos; DMG: dose múltipla com girinos; DUG: dose única com girinos. 84

Tabela 10 - Sensibilidade de diferentes espécies ao agrotóxico Vertimec® 18CE. *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae), *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Daphniidae), *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae), *Hydra viridissima* (Hydroida, Hydridae), *Girardia tigrina* (Plathyelminthes, Dugesiidae), *Lithobates catesbeianus* (Anura, Ranidae). 88

Tabela 11 – Comparação da sensibilidade de diferentes espécies ao cobre. *Lithobates catesbeianus* (Anura, Ranidae), *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae), *Pimephales promelas* (Cypriniformes, Cyprinidae), *Daphnia similis* (Cladocera, Daphniidae), *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae)..... 88

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18
2.1 Agrotóxicos 18
2.2 Distribuição dos agrotóxicos nos ecossistemas 19
2.3 Os estudos ecotoxicológicos 21
2.4 Importância de estudos *in situ* (mesocosmos) 24
2.5 Organismos bioindicadores da qualidade ambiental 26
2.6 Os efeitos antrópicos sobre os anfíbios 28
2.7 A utilização de anfíbios em mesocosmos 29
2.8 Estudo da comunidade em mesocosmos 31
3. JUSTIFICATIVA 32
4. OBJETIVO 34
4.1 Objetivo geral 34
4.2 Objetivos específicos 34
5. HIPÓTESE 35
6. METODOLOGIA 35
6.1 Considerações gerais sobre *Lithobates catesbeianus* 36
6.2 Aclimatação dos animais 37
6.3 Testes de sensibilidade 38
6.4 Experimentos laboratoriais 39
6.4.1 Testes agudos 39
6.4.2 Testes crônicos 40
6.4.3 Teste de evitamento 42
6.5 Experimentos em campo 43
6.5.1 Variáveis físicas e químicas da água *49*
6.5.2 Variáveis físicas e químicas do sedimento *50*
6.5.3 Frequência de amostragem *52*
6.5.4 Índice de estado trófico *52*
6.6 Análises estatística dos dados 54
6.6.1Testes de toxicidade laboratoriais 54
6.6.2 Experimentos em campo 54

7. RESULTADOS 55
7.1 Experimentos laboratoriais..... 55
7.1.1 Testes de sensibilidade 55
7.1.2 Testes de toxicidade aguda..... 55
7.1.3 Testes de toxicidade crônica 60
7.1.4 Teste de evitamento 63
7.2 Experimento em campo..... 64
7.2.1 Variáveis físicas e químicas da água 64
7.2.2 Formas fosfatadas e silicato reativo 68
7.2.3 Formas nitrogenadas 70
7.2.4 Análise de componentes principais 73
7.2.5 Metais biodisponíveis na água .....**Erro! Indicador não definido.**
7.2.6 Índice de Estado Trófico 77
7.2.7 Variáveis físicas e químicas do sedimento 78
7.2.8 Metais biodisponíveis no sedimento..... 79
7.2.9 Desenvolvimento e sobrevivência dos girinos..... 80
8. DISCUSSÃO 85
8.1 Análise dos efeitos do Vertimec® 18CE em *L. catesbeianus* por meio de testes laboratoriais agudos e crônicos 85
8.2 Análise do efeito do Vertimec® 18CE em *L. catesbeianus* por meio de testes *in situ* (mesocosmos): efeitos diretos e indiretos 94
8.3 A utilização de anfíbios em testes de toxicidade laboratorial e *in situ* 110
9. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS 114
10. REFERÊNCIAS 118
APÊNDICE A 131
APÊNDICE B..... 137
ANEXO 142

1. INTRODUÇÃO

A presença de agrotóxicos nos corpos d'água tem se tornado mais frequente nas últimas décadas e isso se deve, em grande parte, à intensa atividade agrícola, aumento da produtividade devido ao consumo e à exportação, uso indiscriminado de produtos e descarte inadequado de embalagens. Como consequência da presença indesejada desses produtos, ocorre ampla degradação da qualidade da água e redução das formas de vida nos ecossistemas aquáticos, sendo que os anfíbios estão entre aqueles que mais sofrem com o aporte desses produtos ao ambiente, verificando-se perda da biodiversidade.

Atualmente, os estudos que avaliam as consequências da adição dos agrotóxicos e monitoram a qualidade ambiental dos corpos d'água baseiam-se em testes utilizando espécies com normas padronizadas, as quais na maioria das vezes estão voltadas ao uso de invertebrados. Para os anfíbios ainda existem poucas normas estabelecidas, em sua maioria não muito difundidas, sendo estes pouco utilizados como organismos indicadores da qualidade ambiental, embora diversos aspectos contribuam para que esses animais sejam utilizados como ótimos bioindicadores.

Além da maioria dos anfíbios possuírem ciclo bifásico (aquático e terrestre), podendo estar em contato com poluentes de ambos os habitats, os anfíbios possuem pele e ovos permeáveis, sendo muito sensíveis às alterações ambientais. Por se tratarem de populações com importância significativa na teia trófica, qualquer alteração que sofram pode desencadear respostas em séries (efeito cascata), desequilibrando toda a cadeia trófica, ou seja, com efeito em todo o ecossistema. Atualmente o interesse no estudo desses animais tem aumentado, não somente pelos benefícios citados anteriormente, mas também pelo importante papel ecológico que os anfíbios podem representar e pelo alerta que o desequilíbrio dessas populações pode manifestar.

Uma das formas de estudar as respostas e comportamentos desses organismos na presença de poluentes é a observação e inserção dos mesmos em ambientes com características próximas às observadas no ambiente natural. Para isso tem crescido bastante o interesse em estudos utilizando mesocosmos, os quais representam unidades experimentais intermediárias entre os sistemas naturais e os laboratoriais, apresentando grande parte das interações de um ecossistema natural.

Os estudos utilizando anfíbios como indicadores da qualidade do ecossistema ainda são bastante escassos, bem como os estudos que envolvem anfíbios e mesocosmos, porém o interesse nessa área tem crescido consideravelmente, não somente com a intenção de

compreender a biologia e comportamento dos mesmos, mas também para melhor compreensão de diversas interações ecológicas. Considerando esse aspecto, a proposta dessa pesquisa foi avaliar os efeitos diretos e indiretos da adição de agrotóxicos nos ecossistemas aquáticos, por meio de estudos experimentais laboratoriais e em campo, utilizando a espécie de anfíbio anuro *Lithobates catesbeianus*, a rã-touro.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Agrotóxicos

As alterações causadas em ambientes aquáticos têm como uma das principais fontes as ações antrópicas, e dentre estas destacam-se as atividades ligadas à agricultura. A demanda pela alta produtividade agrícola que vem sendo aplicada a este setor nas últimas décadas, principalmente para atender às crescentes necessidades alimentares e as altas taxas de exportação, influenciou um aumento significativo no uso de agrotóxicos (VEIGA et al., 2006), fazendo com que, em 2008, o Brasil fosse considerado como o maior consumidor deste produto no mundo (SINDAG, 2009) e desde então ocupa o primeiro lugar no *ranking* dos países consumidores de agrotóxicos (CARNEIRO et al., 2012). Segundo a ANVISA (2009), entre os anos de 1999 e 2009, o mercado brasileiro de consumo desses produtos cresceu 176%, quase quatro vezes mais do que a média do consumo mundial, sendo o Brasil apontado como o país com o maior mercado e com maior ritmo de expansão no consumo de agrotóxicos em todo mundo.

Esse intenso aumento na utilização de agrotóxicos foi acompanhado pelo surgimento de novas moléculas e por alterações químicas destes produtos, capazes de propiciar funcionalidades diferenciadas e comportamentos ambientais distintos, resultando em grandes alterações nos perfis toxicológicos e ecotoxicológicos (ARMAS; MONTEIRO, 2005). Originalmente, os agrotóxicos eram estáticos, possuíam baixa solubilidade em água e tinham um forte poder de adesão ao solo. Com a evolução tecnológica, baseadas na manipulação de compostos químicos, os agrotóxicos passaram a ser mais solúveis, possuir baixa capacidade de adesão e a ser mais voláteis, além de se tornarem cada vez mais tóxicos, persistentes e eficientes para combater organismos nocivos (VEIGA et al., 2006). Atualmente, eles compreendem uma variedade de moléculas com distintas propriedades, que lhes conferem diferentes graus de persistência ambiental, mobilidade e potencial tóxico, carcinogênico, mutagênico e teratogênico a diversos organismos não alvos, inclusive ao ser humano (ARMAS; MONTEIRO, 2005).

O potencial de contaminação dos agrotóxicos deve-se principalmente ao fato de que a função biocida desses produtos não se restringe somente às pragas responsáveis pelo ataque às plantações (não exercem ação completamente seletiva), mas amplia-se a quaisquer outras comunidades que tenham contato, podendo introduzir-se direta ou indiretamente em corpos d'água, causando a vulnerabilidade de todo o sistema, com danos irreversíveis e em escalas incalculáveis (HOFFMAN et al., 2002). Essas alterações podem afetar tanto as comunidades aquáticas diretamente, como as características do sistema, atingindo indiretamente todos os seres ali presentes, sendo potencialmente danosos a todos os organismos vivos.

Por outro lado, é inegável como a utilização desses produtos impulsionou o setor agrícola, permitindo maior produtividade em um curto espaço de tempo por meio do controle dos vetores responsáveis pela devastação de lavouras, visando a melhoria da qualidade da produção agrícola, redução de custos e aumento da produção (CUNHA et al., 2003). Porém, as alterações nas características químicas sofridas pelos agrotóxicos também aumentaram e prolongaram ainda mais o potencial destes produtos em causar danos à saúde humana e ao meio ambiente, fazendo com que, mesmo com a sua comprovada eficácia em relação ao aumento da produção agrícola, sua utilização fosse questionada, principalmente quando o recurso hídrico potencialmente contaminado é utilizado para consumo humano (VEIGA et al., 2006).

O uso indiscriminado desses interversores químicos é apontado como uma importante fonte de contaminação ambiental (BOESTEN et al., 2007), sendo que sua presença em corpos d'água se tornou mais frequente nas últimas décadas, aumentando a preocupação por parte dos diversos segmentos da sociedade em virtude de seu potencial de risco ambiental e à saúde humana (CARNEIRO et al., 2012). Dentro desse contexto, tem sido intensamento questionado e debatido que os efeitos adversos decorrentes do uso do agrotóxico são muito superiores aos benefícios associados aos seus ganhos de produtividade (TOMITA; BEYRUTH, 2002), o que conduziu a uma releitura da situação.

2.2 Distribuição dos agrotóxicos nos ecossistemas

Os agrotóxicos podem alcançar os ambientes aquáticos de formas diversas (Figura 1), incluindo a aplicação intencional, deriva e escoamento superficial a partir de áreas onde ocorreram aplicações, por ocorrência de acidentes em depósito ou durante o transporte, ou ainda por descarte inadequado das embalagens (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 1999; SILVA; SANTOS, 2007).

A alta solubilidade de um agrotóxico em água e o baixo poder de adesão ao solo faz com que ele seja carreado facilmente pela água da chuva através do escoamento superficial, contaminando águas superficiais, ou através da lixiviação, carreando-o dentro do perfil do solo, podendo causar a contaminação dos lençóis freáticos (EDWARDS, 1973), cuja descontaminação apresenta grande dificuldade. Se for insolúvel em água, o mesmo tende a ficar aderido ao solo e também preso a partículas e organismos, podendo ser arrastado pelo *run off* (RIEDER, 2005).

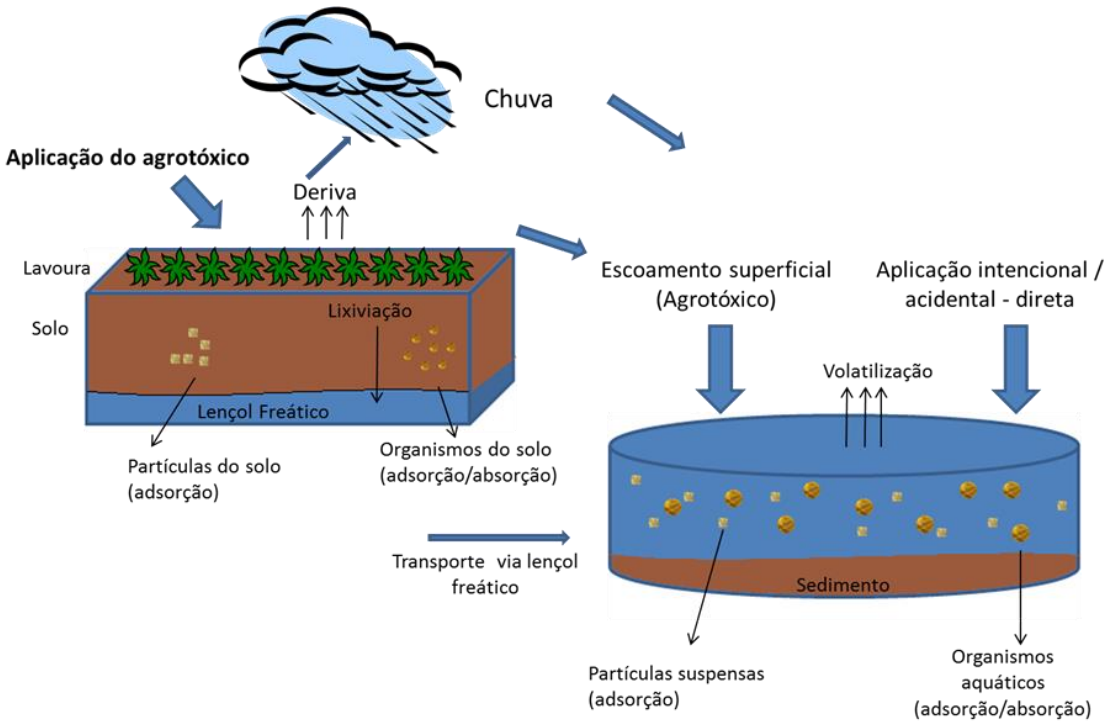


Figura 1. Representação esquemática das interações entre sistema terrestre e aquático associadas à distribuição dos agrotóxicos no ambiente (Modificado de Tomita; Beiruth, 2002).

O uso de agrotóxicos na agricultura pode resultar na contaminação de águas superficiais adjacentes, já que a intercomunicabilidade dos sistemas hídricos possibilita que qualquer contaminação em um determinado corpo d'água resulte em uma contaminação distante das áreas em que foram originalmente aplicados (VEIGA et al., 2006). Por isso, a contaminação de um sistema hídrico não representa só a contaminação do corpo d'água que o poluente entrou em contato, mas sim a contaminação de todos os sistemas de abastecimento interligados a ele (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 1999). Segundo Veiga et al. (2006), diversos estudos já comprovaram que a presença de agrotóxicos no corpo hídrico é muito

maior do que se previa, principalmente em sistemas hídricos próximos às regiões agrícolas com utilização intensiva de agrotóxicos.

Por exemplo, durante a aplicação do agrotóxico, somente uma parte do produto atinge o seu alvo, enquanto outra parte pode atingir outros organismos, como insetos, microrganismos do solo e outros organismos aquáticos, podendo causar efeitos adversos, como redução do número de espécies, alteração na reprodução, comportamento, dentre outros (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 1999).

A dinâmica ambiental dos agrotóxicos é influenciada por uma série de fatores, incluindo desde a sua composição química e meia vida, até a forma de manuseio e aplicação do produto (BROWN et al., 2006). Além disso, os agrotóxicos podem se comportar de maneiras distintas de acordo com o local em que estão inseridos, variando em função do tipo de solo, hidrogeologia e topografia. No ambiente aquático podem tanto se ligar ao material particulado em suspensão, como se depositar no sedimento do fundo, ou ser absorvido por organismos, podendo então ser detoxificados ou acumulados (TOMITA; BEYRUTH, 2002).

A movimentação do agrotóxico do solo para a atmosfera, que pode ocorrer por volatização direta, co-vaporização com a água e associação com o material particulado carreado pelo vento, é também um fator importante para a distribuição destes produtos no ambiente e sua entrada nos ambientes aquáticos. Uma vez na atmosfera, o agrotóxico pode entrar no ambiente aquático por deposição da poeira ou precipitação, o que em geral pode ocorrer em local distante do ponto de emissão (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 1999). A volatilização permite que alguns agrotóxicos possam retornar à atmosfera, evidenciando que existe uma interação contínua dos agrotóxicos entre sedimento, corpo d'água e atmosfera, influenciada pelo movimento da água, turbulência e temperatura (NIMMO, 1995). Devido a essa interação dos produtos com o sedimento e a água, os organismos aquáticos podem estar expostos a compostos tóxicos por mais tempo (TOMITA; BEYRUTH, 2002). Quando presentes no meio ambiente os agrotóxicos podem atingir os organismos vivos de diversas formas, e seu grau de acumulação pode variar de acordo com o tipo de cadeia alimentar, da disponibilidade e persistência do contaminante na água e, principalmente, devido às suas características físicas e químicas inerentes a cada agrotóxico (SPACIE; HAMELINK, 1995).

2.3 Os estudos ecotoxicológicos

Por diversas vezes as contaminações que ocorrem em ambientes aquáticos mostram-se imperceptíveis às análises químicas tradicionais. Para tanto, como forma de avaliar e evidenciar a presença de poluentes, análises de efeitos causados em organismos aquáticos,

como mortalidade e alterações comportamentais e fisiológicas (LEBBORONI et al., 2006), podem indicar e alertar a respeito da presença de substâncias com alto potencial de devastação ambiental. Nesse sentido, a ecotoxicologia aquática surgiu com o princípio de explicitar essas contaminações algumas vezes imperceptíveis através da análise das respostas de espécies com aspectos biológicos e ecológicos bem conhecidos (LEBBORONI et al., 2006), que sejam sensíveis a perturbações ambientais e representativas da teia trófica, onde qualquer alteração causada nesses indivíduos poderá desencadear uma série de respostas, sendo capaz de afetar todos os níveis tróficos.

O aumento da poluição de recursos hídricos por diversas fontes de contaminantes tem tornado a ecotoxicologia aquática uma ferramenta essencial para avaliar, quantificar e definir limites para a emissão destas substâncias, revelando-se como um importante instrumento no estabelecimento de padrões de qualidade da água, além de avaliar o nível de periculosidade dessas substâncias quando presentes no ambiente, visando sempre o controle da poluição hídrica (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Dada a sua importância, os testes de toxicidade são desenvolvidos por diversas instituições e órgãos de monitoramento ambiental, gerando conhecimentos necessários à formulação de normas, programas e diretrizes, já que possibilitam o estabelecimento de limites permissíveis para várias substâncias químicas e ainda possibilitam a avaliação do impacto destes poluentes sobre a biota dos recursos hídricos receptores (MAKI; BISHOP, 1995).

Os testes de toxicidade constituem-se basicamente da exposição de organismos aquáticos às substâncias potencialmente tóxicas, visando à observação e análise das respostas destes organismos à substância testada. Podem ser utilizados para avaliar a concentração e o tempo de exposição a agentes químicos potencialmente tóxicos necessários para produzir um efeito adverso ou danoso (RAND; PETROCELLI, 1995), bem como alertar para as substâncias químicas que representem risco e, assim, sugerir a aplicação de medidas preventivas antes que ocorram graves danos aos ecossistemas naturais (DORNFELD et al., 2006).

Por meio desses testes são fornecidas informações sobre o perigo potencial dos efeitos de uma substância tóxica aos organismos aquáticos, que podem incluir tanto a letalidade quanto efeitos subletais, como alterações no desenvolvimento, crescimento e reprodução, mutagênese, teratogênese, carcinogênese e desordens comportamentais (BAUDO, 1987), sendo que, como já citado, a toxicidade dos compostos pode ser alterada devida à composição de cada um, o que influencia tanto na quantidade de substâncias biodisponíveis, como também na duração e frequência da exposição dos organismos a estas substâncias.

Na exposição aguda, os organismos entram em contato com o composto químico, considerado potencialmente tóxico por um curto período de tempo em um evento único (ADAMS, 1995). Nesse tipo de exposição, onde o agente químico é assimilado rapidamente, os efeitos observados são imediatos (TOMITA; BEYRUTH, 2002). O principal efeito observado nos testes de toxicidade aguda é a letalidade, a partir da onde se determina a CL_{50}, que é a concentração do contaminante responsável por causar mortalidade em 50% dos organismos expostos em cada tratamento (RAND; PETROCELLI, 1995).

Na exposição crônica, os organismos geralmente são expostos a uma concentração menor do composto, porém que é liberado continuamente, ou com certa periodicidade por um período maior de tempo. Os efeitos causados por esse tipo de exposição podem se demonstrar rapidamente, como em uma exposição aguda, ou se manifestarem ao longo do ciclo de vida, devido à acumulação desses compostos (TOMITA; BEYRUTH, 2002). Podem ser observadas alterações no crescimento, na reprodução, fisiologia e histologia, além de alterações comportamentais.

Além dos testes ecotoxicológicos tradicionais, estudos comportamentais também tem se mostrado muito eficazes na busca de respostas a intervenções químicas no meio ambiente. Um dos exemplos são os testes de evitamento (ou de preferência), onde os organismos são capazes de mover-se por diferentes gradientes quando expostos a diferentes concentrações de um mesmo composto, sendo avaliada como resposta a capacidade dos mesmos em detectarem ambientes tóxicos, evitando as concentrações consideradas mais prejudiciais. São testes de curta duração, capazes de fornecer respostas comportamentais altamente relevantes (ROSA et al., 2012), já que o evitamento de um ambiente potencialmente contaminado pode fornecer respostas consideráveis sobre o deslocamento de uma população e de toda a dinâmica do ecossistema (ARAÚJO et al., 2014).

Atualmente, as análises químicas são utilizadas em conjunto com as análises das comunidades biológicas e dos ensaios ecotoxicológicos (DORNFELD et al., 2006). Os testes de toxicidade devem ser considerados, portanto, como uma análise indispensável ao controle da poluição hídrica, pois detectam os efeitos de contaminantes sobre a biota, enquanto as análises químicas apenas identificam e quantificam as substâncias presentes nas amostras ambientais (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Essas duas análises são convergentes e complementares, o que proporciona um melhor diagnóstico da qualidade ambiental do ecossistema em estudo (DORNFELD et al., 2006).

2.4 Importância de estudos *in situ* (mesocosmos)

A contaminação do sistema ocorre de forma natural e/ou por ação antrópica, e o contato desses poluentes com o ambiente afeta as populações, as comunidades e o ecossistema como um todo, criando situações com um alto nível de complexidade e que não podem ser facilmente replicadas em laboratório (BOONE; JAMES, 2005). Em um ecossistema natural, existe alta influência exercida pelos fatores bióticos e abióticos na dinâmica dos poluentes, bem como na estrutura de uma comunidade, que pode interferir tanto direta quanto indiretamente no comportamento dos indivíduos e respostas do meio, como a alteração do grau de toxicidade desses produtos e a formação de compostos secundários tóxicos. Nesse sentido, estudos realizados *in situ* são capazes de proporcionar resultados mais realísticos do que os laboratoriais, já que envolvem todas essas variáveis (inclusive a interação entre elas), resultando em respostas com maior proximidade ao ambiente, e permitem a análise de um conjunto de fatores que ocorrem de forma natural, o que em laboratório ocorreria sob condições controladas.

Entretanto, a maioria dos padrões de qualidade para proteção de comunidades aquáticas foi, e ainda é, estabelecido com base em estudos de laboratório, entre eles experimentos de bioacumulação, de comportamento e testes ecotoxicológicos (PEREIRA et al., 2009), que fornecem conhecimentos básicos e apresentam custo reduzido, e ainda simulam o que pode acontecer nos sistemas aquáticos com razoável aproximação (BERTOLETTI, 2000). Porém, o nível de complexidade envolvido no processo de contaminação dos sistemas aquáticos por agrotóxicos vai muito além dos estudos realizados em laboratório (BOONE; JAMES, 2005).

Reconhece-se, portanto, que os estudos laboratoriais são bastante eficazes para apontar os efeitos diretos causados por substâncias tóxicas (BERTOLETTI, 2000), e essenciais para definir o desenho experimental (concentrações, espécies que serão focadas), podendo ser considerados como dados primários (OECD, 2006). No entanto, não são tão favoráveis na obtenção de respostas envolvendo níveis populacionais e de comunidade, como alteração de cadeia trófica e influência de fatores bióticos e abióticos, ou até mesmo o comportamento natural de algumas populações (BOONE; JAMES, 2005). Os testes laboratoriais nos mostram como concentrações constantes de um contaminante agem em determinados indivíduos. Essa situação se difere da aplicação de pesticidas que geralmente é feita em campo, tanto na concentração quanto no tempo e frequência de aplicação e degradação do agrotóxico (McCONNEL et al., 1998).

Atualmente tem sido dada maior ênfase aos estudos *in situ* pelo fato de expressarem uma situação muito mais próxima do real quando comparados aos experimentos realizados em laboratório. Através desses estudos é possível extrapolar as condições reais para o campo experimental, sendo possível simular da maneira mais próxima o ocorrido no ambiente natural (DORNFELD et al., 2006).

Uma alternativa para a realização de bioensaios *in situ* é a utilização de mesocosmos, que são capazes de preencher algumas lacunas que existem entre os experimentos laboratoriais e o ocorrido no ambiente natural, minimizando ao máximo o risco de simplificação do ambiente. Segundo Odum (1984), mesocosmo é definido como um termo mais apropriado para sistemas de tamanho médio, entre os microcosmos de laboratório e os macrocosmos complexos do mundo real. Porém, a definição de mesocosmos ainda é bastante controversa. Alguns autores definem mesocosmos pelo seu tamanho e outros pela sua complexidade. Para Graney et al. (1995), os mesocosmos representam uma parte do ambiente natural no qual os sistemas são manualmente tratados com as substâncias tóxicas nas concentrações teste pré-determinadas, e surgiram como uma alternativa para minimizar os problemas encontrados nos testes de laboratório. Para Boone e James (2005) os mesocosmos são sistemas externos artificiais, aquáticos ou terrestres, que sejam independentes e possuam teias alimentares e processos representativos dos sistemas naturais. Para Caquet et al. (1996) são ecossistemas artificiais colocados sob condições ambientais naturais, que apresentam complexidade e estabilidade suficiente para serem autossustentáveis. Entretanto, o desenho experimental para esse tipo de experimento é bastante flexível (CAMPBEL, 1989).

Os mesocosmos não são utilizados para recriar as condições naturais completa e perfeitamente, e sim para simular as interações tróficas e processos, fazendo com que as respostas possam ser inferidas em um curto espaço de tempo (DAEHLER; STRONG, 1996), aproximando-se o máximo possível das condições reais. Para Pestana et al. (2009) o uso de mesocosmos em combinação com testes laboratoriais abrange parâmetros funcionais e estruturais em diversos níveis de organização biológica, que pode ajudar a identificar os mecanismos responsáveis pelos efeitos diretos e indiretos da contaminação por agrotóxicos (ou qualquer outro contaminante) em todo o ecossistema. O uso de mesocosmos também aumenta a relevância ambiental do estudo em questão e maximiza os benefícios dos experimentos em laboratório e no campo, mantendo as variáveis ambientais monitoradas, além de incorporar elementos naturais, como luz solar e alteração de temperatura, que estariam presentes em um ambiente típico (ROWE; DUNSON, 1994).

Esse tipo de estudos deve ser realizado para testar hipóteses oriundas de experimentos anteriores em laboratório, com o intuito de averiguar se as informações contidas em experimentações laboratoriais podem ser transpostas para o ambiente natural (OECD, 2006), minimizando o risco de erros e agregando aos resultados obtidos alta relevância ecológica (VAN DEN BRINK et al., 2005).

O importante papel ecológico que os mesocosmos representam pode explicar o fato dos estudos em mesocosmos terem aumentado na última década (BOONE; JAMES, 2005; PESTANA et al., 2009), além de terem sido sugeridos como uma alternativa ou complementação na avaliação de risco, uma vez que oferecem dados altamente relevantes ecologicamente, podendo ser utilizados para validar e melhorar modelos teóricos (MASUTTI, 2006). No entanto, o desenvolvimento desses experimentos ainda é raro em ambientes tropicais sul americano, possivelmente devido à complexidade e infraestrutura necessária para o desenvolvimento dos mesmos (GARCIA et al., 2008), custo envolvido e a dificuldade na utilização de réplicas (CAQUET et al., 1996; LEBBORONI et al., 2006). Outro motivo que torna os estudos em mesocosmos, em ambientes naturais ou artificiais, pouco difundidos é a grande quantidade de produtos que necessitam serem analisados todos os anos por órgão de monitoramento, o que torna muito mais fácil, barato e prático os estudos laboratoriais (BOONE; JAMES, 2005).

Mesmo tratando-se de estudos em campo, a maioria deles indica efeitos em espécies como resultados de uma única aplicação do agrotóxico, mas poucos consideram as aplicações múltiplas, realizadas em um curto intervalo, que frequentemente ocorre no campo. É esperado que em situações de aplicações múltiplas do pesticida a comunidade esteja em constante distúrbio, dificultando o estabelecimento e diminuindo a capacidade de resiliência das populações (RELYEA; DIECKS, 2008). No caso dessas aplicações múltiplas, mesmo em concentrações muito menores do que as concentrações comumente encontradas no ambiente, podem ser observados efeitos com impactos muito maiores do que altas concentrações aplicadas em uma única dose.

2.5 Organismos bioindicadores da qualidade ambiental

O uso de organismos como bioindicadores ambientais tem ocorrido de maneira específica, e na grande maioria das vezes incluindo invertebrados (LEBBORONI et al., 2006). Muitos estudos têm gerado normas padronizadas que são frequentemente utilizadas por órgãos de monitoramento ambiental de diferentes países apara avaliar a qualidade biológica dos corpos d’água. Geralmente, os estudos ecotoxicológicos responsáveis por indicar o nível

de substância segura a ser lançada no ambiente têm como base experimentos com algumas poucas espécies, que são utilizadas como um padrão das concentrações ideais para que organismos não alvo não sejam afetados e o máximo de efetividade possa ocorrer na ação e aplicação dos pesticidas (BOONE; JAMES, 2005).

Os organismos mais comumente utilizados como bioindicadores da qualidade da água são microcrustáceos, peixes e larvas de quironomídeos. O uso da comunidade de anfíbios na avaliação da qualidade ambiental ainda é incipiente e não existem métodos muito difundidos e validados (LEBBORONI et al., 2006), apesar de alguns deles terem sido desenvolvidos em alguns lugares do mundo (APHA, 1989; USEPA, 2002; ASTM, 2004). Entretanto, os estudos com esses animais tem se ampliado largamente, tornando-se mais frequente e de maior interesse na identificação de devastações ambientais, principalmente devido ao declínio dessas populações e às ameaças que esses animais têm sofrido (HOULAHAN et al., 2000, SPARLING, et al., 2000).

Esse interesse em estudos com anfíbios é reforçado pelo fato de esses animais poderem ser utilizados como bons indicadores da qualidade da água e de estresse ambiental, já que podem indicar diversos efeitos subletais quando expostos a poluentes, como mudança no crescimento e na taxa de desenvolvimento e alterações morfológicas (PECHMANN; WILBUR, 1994). Boone e James (2005) sugerem que os anfíbios são mais sensíveis do que outros vertebrados devido à sua pele e ovos permeáveis, além de diversas outras características que aumentam seu valor como bioindicadores, tais como: o complexo ciclo de vida, que engloba estágios aquáticos e terrestres (ciclo bifásico) e faz com que estejam expostos aos poluentes de ambos os ambientes; espécies com larvas aquáticas, o que facilita a detecção de efeitos diretos dos poluentes no crescimento dessas espécies, ou dos efeitos indiretos via rede trófica; brânquias e/ou pele em contato muito próximo com a água e com o solo, aumentando a chance de absorção de poluentes (ROWE; DUNSON, 1994). Por serem animais ectotérmicos podem se mostrar mais susceptíveis às variações ambientais do que os organismos endotérmicos. Além disso, quando estão inativos, muitas espécies estivam no solo, o que os expõem a sedimentos tóxicos (ROWE; DUNSON, 1994).

Em estudos realizados por Birge et al. (2000) foi avaliada a sensibilidade de diversas espécies de anfíbios para múltiplos contaminantes, e quando comparados com a sensibilidade apresentada por peixes observou-se que, em 67% dos casos em que foram utilizados metais como substância teste, os anfíbios eram mais sensíveis, e para metais e outros compostos químicos orgânicos esse percentual foi de 64%. Bridges et al. (2002) verificaram que girinos de *Lithobates pipiens* foram muito mais tolerantes do que peixes quando submetidos a

exposição de componentes orgânicos, como carbaril e permetrin, e muito mais sensíveis a outros componentes, como o cobre.

Alterações sofridas pelas populações de anfíbios podem ser significativas para todo o ecossistema, já que esses organismos têm participação efetiva em diferentes habitats, podendo agir como predadores, presas ou competidores, sendo capazes de refletir efeitos em todos os níveis tróficos. Para Boone e James (2005) os anfíbios são os organismos que mais podem maximizar o controle experimental e o realismo ecológico, tanto em trabalhos realizados em laboratórios como em condições de campo.

Para Bridges e Semlitsch (2000) existe um grande desafio em relação à variabilidade de espécies entre os anfíbios, o que dificulta a padronização de testes e do comportamento dos contaminantes quando testados em uma única espécie. Uma determinada concentração de um poluente pode se mostrar altamente nociva a uma espécie, enquanto nenhum efeito é observado em outra. Entretanto, entender e determinar o nível de sensibilidade de algumas espécies, as quais possuam relevância ecológica, é bastante útil, uma vez que auxilia na determinação de concentrações seguras de substâncias a serem lançadas no ambiente.

2.6 Os efeitos antrópicos sobre os anfíbios

Outro fator que ressalta a importância da utilização de anfíbios como bioindicadores é o aumento acentuado no declínio dessas populações nas últimas décadas e a crescente diminuição da biodiversidade desses animais (HOULAHAN et al., 2000). Apesar da dificuldade para estabelecer uma ligação entre esse declínio e a presença de contaminantes ambientais, já que se sabe muito pouco em relação à toxicidade de compostos em anfíbios (SPARLING et al., 2001), muitos estudos (FORDHAM et al., 2001; HAYES et al., 2003; RELYEA, 2005; SPARLING; FELLERS, 2009; STORRSS; KIESECHER, 2004) apontam que esses fatores estão fortemente relacionados à crescente utilização de agrotóxicos e que a contaminação química ambiental tem sido listada como uma das principais causas relacionadas a perda de espécies por essas populações (SEMLITSCH et al., 2000).

O estudo de Davidson et al. (2002), realizado nos Estados Unidos, demonstrou forte relação entre o declínio dessas populações e a prática de atividades agrícolas. Nos estudos de Bishop et al. (1999) foi constatado que existe sempre uma menor riqueza e abundância de anfíbios em locais em que a agricultura é praticada e agrotóxicos são aplicados do que em lugares onde não existem atividades agrícolas próximas.

Lagos, rios, reservatórios e outros locais de reprodução de anfíbios, como poças efêmeras ou permanentes, próximos a campos agrícolas, podem ser depósitos de pesticidas

oriundos do *run off* (STORRS; KIESECKER, 2004), o que pode expor machos vocalizadores e casais reprodutores em amplexo a altas concentrações desses componentes a águas contaminadas, tornando muitas populações de anfíbios vulneráveis a exposição química (SANDERS, 1970). Para Hayes et al. (2003) o escoamento dos pesticidas pode ter efeitos ainda mais significativos sobre espécies anfíbias, já que podem ser encontradas em locais de reprodução mesmo após um ano da suspensão do uso desses produtos.

Uma das consequências causadas pela presença de contaminantes na água está relacionada ao aumento do período larval, isto é, um maior tempo de desenvolvimento do girino até a metamorfose, o que os torna mais susceptíveis e também mais afetados pelos efeitos negativos causados pelo pesticida no ambiente (RELYEA; DICKES, 2008). Girinos com curto prazo de desenvolvimento, ou seja, que logo sofrem metamorfose, estão menos sujeitos aos efeitos gerados pelos pesticidas presentes nos corpos d'água devido ao menor tempo que ficam expostos, enquanto as espécies que possuem a fase larval com prazos de desenvolvimento mais longos são mais afetadas. Porém, em estudos realizados por Boone et al. (2001), foi constatado que a exposição a contaminantes é capaz de reduzir o período larval de girinos de *Lithobates clamitans*, fazendo com que a metamorfose ocorresse de maneira precoce, como maneira de evitar o tempo de exposição a essas substâncias, o que resulta em animais metamorfoseados menores do que em condições normais.

Para Rowe et al. (1998), girinos de *Lithobates catesbeianus*, quando na presença de contaminantes, podem sofrer metamorfose em tamanho menor do que em condições normais, já que a energia utilizada para o crescimento e desenvolvimento é desviada para suprir custos metabólicos da desintoxicação, trazendo consequências para a sobrevivência e sucesso reprodutivo. No entanto, para entender a extensão que os contaminantes estão contribuindo para esse declínio é necessário estabelecer a toxicidade de diversos compostos sob condições controladas de laboratório, além de desenvolver experimentos em campo, que identifiquem o comportamento desses organismos em seu habitat natural.

2.7 A utilização de anfíbios em mesocosmos

Vários bioensaios *in situ* têm sido desenvolvidos para monitorar os sistemas aquáticos, utilizando diferentes tipos de organismos, como peixes, dafinídeos, anfípodas, quironomídeos, entre outros (DORNFELD et al., 2006), sendo possível identificar como a presença de contaminantes no corpo d'água afeta a diversidade de toda a comunidade presente no ambiente. Porém, tanto pelo fato da utilização de mesocosmos ser pouco difundida quanto pelo fato dos anfíbios não serem utilizados rotineiramente como animais indicadores das

condições ambientais (SPARLING et al., 2010), trabalhos que envolvem ecotoxicologia de anfíbios são comumente desenvolvidos em laboratório, tendo seu foco maior nos testes agudos, os quais oferecem respostas em curto prazo (BOONE; JAMES, 2005), sendo raros os estudos utilizando anfíbios realizados em mesocosmos.

Em uma revisão bibliográfica feita por Boone e James (2005), onde foram analisados trabalhos publicados em 6 revistas entre os anos de 2002 e 2004, verificou-se que 72% dos 60 estudos envolvendo ecotoxicologia de anfíbios foram realizados em laboratório. Em outra revisão, Sparling et al. (2001) concluíram que a grande maioria dos estudos ecotoxicológicos tinha foco na utilização de peixes, e que somente 4% destes utilizavam anfíbios como organismos teste.

Os anfíbios possuem diversas características que tornam sua utilização propícia para esses estudos, incluindo tamanhos relativamente pequenos e desenvolvimento larval em sistemas fechados, como lagoas, além das outras características tratadas anteriormente. As espécies de anfíbios que utilizam o ambiente aquático para sua reprodução e desenvolvimento podem permanecer nos corpos d'água por meses, ou até mesmo anos, dependendo do período larval da espécie e das condições ambientais (SCHMUCK et al., 1994). Isso torna possível que alguns indivíduos estejam expostos a contaminantes repetidamente durante o seu desenvolvimento (BOONE et al., 2001) por um longo período de tempo, principalmente quando refere-se à aplicação de agrotóxicos, que geralmente passam por aplicações múltiplas. As concentrações de agrotóxicos encontradas em campo nem sempre são suficientes para causar efeitos diretos na espécie anfíbia analisada, como mortalidade, porém as consequências das concentrações subletais, quando aplicadas repetidamente, podem causar efeitos mais severos a essas populações, pois podem interferir na sobrevivência de outros indivíduos da comunidade, alterando toda a rede trófica (RELYEA; DICKES, 2001).

Para Rowe e Dunson (1994) os modelos utilizados para a simulação de comunidades de anfíbios utilizando tanques experimentais são úteis não somente na avaliação de ameaças ecológicas aos anfíbios e no entendimento da biologia e do comportamento desses animais, mas também como bioindicadores dos riscos ambientais em geral, como ferramenta ideal para o estudo dos efeitos de contaminantes em nível populacional e de comunidade. A toxicidade de contaminantes aos anfíbios pode mudar em um ambiente complexo, em que predadores e/ou competidores estão presentes, e algumas variáveis abióticas, como temperatura e pH oscilam (RELYEA; MILLS, 2001; RELYEA, 2005, BOONE; JAMES, 2005). Por conta disso, analisar o comportamento de poluentes de forma realística é essencial para o entendimento do funcionamento de um sistema, e os estudos em mesocosmos mostram-se

uma alternativa adequada, já que produzem resultados mais representativos das condições naturais do que experimentos laboratoriais, sendo considerados como uma valiosa ferramenta ecotoxicológica.

2.8 Estudo da comunidade em mesocosmos

Para detectar impactos causados no sistema são utilizados diferentes níveis de complexidade biológica, entretanto, nos últimos anos, tem sido dada grande ênfase aos estudos que avaliam a qualidade biológica envolvendo a comunidade como um todo (RELYEA et al., 2005). Quando vários integrantes de uma comunidade são analisados, além dos efeitos diretos causados em uma determinada espécie, efeitos indiretos causados por predadores e competidores podem estimular respostas, tanto positivas quanto negativas, na população em foco (RELYEA; DIECKS, 2008). Entretanto, esses efeitos indiretos são mais complexos e podem demorar um tempo maior para apresentarem respostas do que os efeitos diretos. Sendo assim, os testes que utilizam uma única espécie representativa da cadeia trófica excluem as interações interespecíficas entre os organismos de um ecossistema.

Nos estudos em mesocosmos utilizando girinos podem ser avaliados alguns resultados diretos, tais como sobrevivência, tempo até a metamorfose e tamanho na metamorfose, além dos efeitos indiretos, como, por exemplo, a relação da densidade de fitoplâncton e zooplâncton com a sobrevivência e desenvolvimento de girinos, envolvendo a análise de toda a comunidade. A utilização de mesocosmos é capaz de indicar que esses efeitos indiretos da contaminação, como alterações na cadeia alimentar, podem ser mais importantes que os efeitos diretos causados na sobrevivência, fisiologia e metabolismo, e são essenciais para entender como contaminantes podem afetar populações de anfíbios (BOONE; JAMES, 2005).

Mills e Semlitsch (2004), por exemplo, conduziram um estudo em que foram contrastados os efeitos diretos e indiretos causados pela exposição de anfíbios a um contaminante, o carbaril, e obtiveram como resposta que os efeitos indiretos eram amplamente mais significativos do que os efeitos diretos, mesmo quando esses animais eram expostos a concentrações subletais do xenobióticos.

Alterações na cadeia trófica devido à exposição a contaminantes pode ser um importante fator no desequilíbrio da população de anfíbios, já que a presença de contaminantes também pode agir na interação presa-predador, desequilibrando toda a cadeia trófica (BOONE; JAMES, 2005). Em uma comunidade com a presença de fitoplâncton, zooplâncton, perifíton e girinos, a diminuição da comunidade zooplanctônica acarretaria um aumento da comunidade fitoplanctônica, o que reduziria a quantidade de luz disponível para o

perifíton, reduzindo também a comunidade perifítica. Devido ao fato dos girinos utilizarem o perifíton como recurso alimentar, essa escassez pode causar efeitos no crescimento e desenvolvimento dos girinos, interferindo no tempo e tamanho até a metamorfose (RELYEA; DICKES, 2008).

Em baixas concentrações do agrotóxico (menor que CL_{50}) é esperado que efeitos diretos não sejam causados aos girinos, mas sim na comunidade zooplanctônica, já que invertebrados aquáticos são mais sensíveis a contaminantes, afetando os girinos indiretamente. Esses efeitos indiretos negativos podem ser percebidos quando os girinos possuem período larval longo e em condições em que os recursos disponíveis são limitados, expondo-os por um maior tempo a essas condições, ou quando as aplicações múltiplas do agrotóxico ocorrem, reafirmando esse efeito em cascata e impedindo a comunidade zooplanctônica de se restabelecer (BOONE et al., 2001). Relyea e Diecks (2008) sugerem ainda que a interação de dois fatores, como aplicações de pesticidas em dose única e múltipla e o estudo da interação entre as populações, resultem em trabalhos com resultados bem mais complexos e relevantes ecologicamente.

3. JUSTIFICATIVA

O aumento da demanda por produtos agrícolas intensificou ainda mais a utilização de agrotóxicos a fim de obter uma produção em larga escala em menor espaço de tempo, fazendo com que a presença destes no corpo hídrico fosse cada vez mais frequente. Com isso houve aumento significativo dos riscos ambientais e à saúde humana, já que esses compostos, quando em contato com o meio ambiente, podem ser extremamente tóxicos a todos os organismos. A alta solubilidade dos agrotóxicos faz com que após sua aplicação no campo uma grande quantidade do produto aplicado seja carreada através do *run off* para corpos d'água próximos, onde geralmente ocorre a reprodução de anfíbios (CREWS; PEOPLES, 2004).

Como citado anteriormente, diversos autores relacionam o declínio das populações de anfíbios com a presença de pesticidas em corpos d'água (ALLRAN; KASAROV, 2000; BISHOP et al., 1999; BOONE et al., 2001; SPARLING, et al., 2001; SPARLING; FELLERS, 2009). Esses produtos podem causar uma série de efeitos adversos em anfíbios, incluindo a diminuição na taxa de crescimento e desenvolvimento, aumento de anormalidades e influência direta na reprodução e sobrevivência destes animais (BISHOP et al., 1999; SPARLING; FELLERS, 2009).

O produto testado nesse estudo é o Vertimec® 18CE (Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., São Paulo, Brasil) classificado como acaricida, inseticida e nematicida. Devido à sua

eficácia no controle de pragas é um dos pesticidas mais utilizados no Brasil, principalmente na cultura do morango (NUNES; ESPÍNDOLA, 2012), e possui registro para a utilização em 23 diferentes culturas (MAPA, 2013). Ainda, segundo o MAPA (2013), a classificação toxicológica do Vertimec® 18CE é classe III, medianamente tóxico, porém a classificação do potencial de periculosidade ambiental o indica como classe II, sendo altamente persistente no meio ambiente, extremamente tóxico para peixes e microcrustáceos e muito perigoso ao meio ambiente.

No trabalho realizado por Verhaelen et al. (2013) foi testada a eficiência de 8 pesticidas (4 inseticidas e 4 fungicidas) no combate ao norovírus (murino), um vírus transmitido pela ingestão de alimentos crus, utilizando a máxima diluição desses compostos permitida. Os resultados mostraram que a persistência do vírus não foi afetada por nenhum dos pesticidas testados, exceto pelo Vertimec® 18CE. Esses resultados evidenciam a agressividade do Vertimec® 18CE a organismos não alvo e o seu potencial de toxicidade quando comparados a outros agrotóxicos. Em trabalho realizado por Nunes e Espíndola (2012) na área rural do município de Bom Repouso, Minas Gerais, foi encontrada grande quantidade deste produto no solo e corpos d'água próximos às atividades agrícolas.

O ingrediente ativo do Vertimec® 18CE é a abamectina, pertencente à família das avermectinas, a qual é produzida naturalmente pela fermentação de uma cultura de bactérias, *Streptomyces avermitilis* (FISHER; MORZIK, 1992), e é uma mistura de 80% da avermectina B1a e 20% avermectina B1b (WISLOCKI et al., 1989). Age neurologicamente, interagindo com o glutamato nos canais de cloro e com o neurotransmissor gama aminobutírico (GABA), podendo causar a interrupção de sinais neurais, e a paralisia, tanto em invertebrado como em vertebrados (McCAVERA et al., 2007).

A abamectina é pouco solúvel em água (FISHER; MORZIK, 1992), possui meia vida curto (entre 4 e 21 horas), sendo rapidamente fotodegradada em compostos menos bioativos (HALLEY et al. 1993), que são adsorvidos pela matéria orgânica, solo e partículas do sedimento (TIŠLER; ERŽEN, 2006). De acordo com experimentos realizados por Tišler e Eržen (2006), a abamectina pode ser classificada como muito tóxica a organismos aquáticos, pois mesmo que concentrações muito baixas (da ordem de $ng.L^{-1}$) atinjam os corpos d'água, efeitos tóxicos (e até mesmo letais) podem ser vistos, já que algumas espécies (fitoplâncton, zooplâncton e peixes) apresentam alta sensibilidade a esse composto.

A concentração de abamectina encontrada na formulação comercial Vertimec® 18CE é $18g.L^{-1}$, ou seja, 1,8%, sendo que 94,2% do seu volume é composto por ingredientes inertes (SYNGENTA, 2013), os quais não se tem conhecimento e tratam-se de substâncias que não

são ativas no pesticida, mas são incluídas para promover a estabilidade e eficácia do mesmo (VERHAELEN et al., 2013). Portanto, a formulação comercial Vertimec® 18CE pode indicar toxicidade distinta dos testes feitos com abamectina.

No entanto, ainda existem poucas pesquisas sobre a toxicidade de abamectina nos ecossistemas aquáticos e, mais raros ainda, com a fórmula comercial, o Vertimec® 18CE (CASALI-PEREIRA, 2013; MENDES, 2011; NOVELLI et al., 2012a, b; RAMOS, 2013; VIEIRA, 2010). Assim, pouco se sabe sobre as interações entre os compartimentos e os organismos, o que justifica o desenvolvimento desta pesquisa.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo geral

O objetivo dessa pesquisa é avaliar os impactos ambientais nos ecossistemas aquáticos em decorrência da aplicação do Vertimec® 18CE em solos agricultáveis, utilizando, para tal finalidade, a espécie *Lithobates catesbeianus* (Amphibia, Anura, Ranidae) como organismo-teste em experimentos laboratoriais e *in situ* (mesocosmos), permitindo inferir sobre os riscos diretos e indiretos do uso de agrotóxicos na agricultura.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar os efeitos agudos (mortalidade) e crônicos (taxa de crescimento e alterações no tempo e tamanho da metamorfose) do Vertimec® 18CE sobre girinos de *L. catesbeianus*, obtendo concentrações letais e subletais em experimentos de toxicidade laboratoriais;
- Avaliar, por meio de experimentos *in situ* (mesocosmos), os efeitos diretos (ação sobre o organismo-teste – causa proximal) e indiretos (ação sobre outros organismos – causa distal) do Vertimec® 18CE, avaliando sobrevivência, crescimento e diferenças na metamorfose (tempo e tamanho) mediante a adição única ou múltipla do contaminante.
- Verificar a potencialidade de uso da espécie *L. catesbeianus* em experimentos laboratoriais e *in situ*, identificando a susceptibilidade dos diferentes estágios de desenvolvimento dos girinos e as melhores respostas (*end point*) para avaliação da toxicidade.

5. HIPÓTESE

Para o desenvolvimento da pesquisa, algumas hipóteses foram formuladas, as quais, mediante a definição dos objetivos e do estabelecimento de metodologias adequadas, poderão ser aceitas ou refutadas. Assim, as seguintes hipóteses norteiam essa pesquisa:

- A espécie *L. catesbeianus* (Amphibia, Anura, Ranidae), na fase de girino, tem potencial de utilização em estudos ecotoxicológicos, tanto pelas características do grupo (como pele e ovos permeáveis e ciclo de vida bifásico) quanto pela facilidade de obtenção e manutenção da espécie, diante dos resultados obtidos para a sensibilidade ao agrotóxicov Vertimec® 18CE;
- Respostas diferenciadas dos organismos-teste poderão ser estabelecidas mediante a adição única e múltipla do agrotóxico Vertimec® 18CE, implicando em adaptações comportamentais e/ou fisiológicas da espécie;
- Efeitos diretos (causa proximal) e indiretos (causa distal) poderão ser identificados nos experimentos *in situ*, considerando que a adição do contaminante poderá causar efeito agudo (mortalidade) e/ou interferir no crescimento dos organismos (efeito crônico), mediante a alteração de fatores abióticos e consequentemente bióticos, como a qualidade e disponibilidade dos recursos alimentares.
- Estudos experimentais *in situ* (mesocosmos) podem ser mais representativos para avaliar os efeitos tóxicos de um contaminante em relação aos estudos laboratoriais;

6. METODOLOGIA

Os experimentos de toxicidade laboratoriais foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia e Ecofisiologia de Organismos Aquáticos, do Núcleo de Estudos em Ecossistemas Aquáticos (NEEA), e os estudos de campo foram conduzidos em tanques experimentais externos, ambos localizados no Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA), da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo (USP), localizado no município de Itirapina/SP, Brasil. Informações sobre a espécie, manutenção, determinação da faixa de sensibilidade, metodologia e forma de análise dos dados estão descritos nos itens subsequentes.

6.1 Considerações gerais sobre *Lithobates catesbeianus*

Lithobates catesbeianus (Figura 2), popularmente conhecida como rã-touro, é uma espécie exótica, originária da América do Norte, e enquadra-se na família Ranidae, que agrupa as rãs verdadeiras. Essa família possui ampla distribuição mundial, com cerca de 23 gêneros e centenas de espécies, dentre os quais destaca-se o gênero *Lithobates*. Este gênero possui grande importância em decorrência de seu emprego em criações comerciais. No Brasil essa espécie tem interesse econômico, o que intensifica cada vez mais os estudos do ponto de vista biológico e de produção.

Figura 2. Girino e adulto de *Lithobates catesbeianus*, a rã-touro. Disponível em http://www.amnh.org/ e http://www.hylawerkgroep.be/. Acesso em fevereiro de 2014.

Além disso, *L. catesbeianu*s tem sido identificada como uma espécie com alto potencial na avaliação de efeitos deletérios de águas contaminadas. Vários autores (BOONE et al., 2007; BUENO-GUIMARÃES et al., 2001; FERREIRA et al., 2004; FORDHAM et al., 2001; GERVASI et al., 2013; LOMBARDI et al., 2002; OSSANA et al., 2013; PAETOW et al., 2013) propõem a utilização de girinos de *L. catesbeianus* em experimentos de toxicidade e poluição aquática pela sua ampla ocorrência, facilidade de criação e aquisição, e por tratar-se de um animal importante na cadeia alimentar (FERREIRA et al., 2001). Essa espécie possui longo período larval, o que aumenta a probabilidade de exposição a contaminantes, principalmente em casos de exposições múltiplas. Espécies com período larval mais curto são mais propícias a evitar exposições múltiplas nos ambientes aquáticos e podem não ser organismos ideais para experimentos ecotoxicológicos (BOONE et al., 2001).

A manutenção e reprodução de anfíbios em laboratório para fins acadêmicos ainda é bastante dificultada, já que se torna necessário desenvolver habitats compatíveis aos naturais, principalmente para estabelecer e manter um modelo experimental de anfíbio padronizado e

alcançar um ambiente laboratorial propício, minimizando trabalhos e custos (BUENO-GUIMARÃES et al., 2001). Entretanto, a criação da rã-touro por ranicultores permite que essa espécie seja utilizada em todas as fases de seu desenvolvimento e praticamente durante todo o ano, independente do período reprodutivo, o que facilita seu estudo.

A utilização da *L. catesbeianus*, uma espécie exótica, em testes ecotoxicológicos é validada, ainda, pela necessidade de uma espécie modelo representante dos anfíbios para avaliação dos riscos à exposição a xenobióticos, e corroborada pelas características descritas anteriormente. As espécies modelo geralmente apresentam características peculiares, como facilidade no cultivo e aclimatação em laboratório, baixo custo de aquisição/manutenção, sensibilidade a concentrações ambientais relevantes de compostos potencialmente tóxicos, poder de adaptação a diversas condições adversas e robustez (CHAPMAN, 2002), as quais são muitas vezes condizentes com aquelas características de espécies invasoras/exóticas (GIOVANELLI; HADDAD, 2008).

Diante desses fatos, dos inúmeros trabalhos realizados com essa espécie e considerando sua favorável contribuição aos estudos experimentais, de campo e laboratório, podemos dizer que *L. catesbeianus* se enquadra como uma espécie modelo adequada e eficaz para a realização de testes ecotoxicológicos, devendo ser mais bem explorada em investigações científicas como organismo bioindicador das condições ambientais.

6.2 Aclimatação dos animais

Os organismos utilizados no desenvolvimento deste trabalho, tanto nos estudos laboratoriais como nos estudos em campo, foram obtidos no ranário Ranaville Ranicultura Ltda., localizado no município de São Roque, estado de São Paulo, Brasil, a 250 km da área de estudo. Cada lote adquirido teve 10% dos seus indivíduos pesados, com o auxílio de balança analítica Mettler, modelo AE240, tendo o peso médio calculado. Os indivíduos utilizados nas medições iniciais não foram utilizados nos testes, a fim de evitar alterações comportamentais e fisiológicas pela manipulação e estresse dos mesmos.

Anteriormente à realização dos experimentos os girinos de *Lithobates catesbeianus* foram aclimatados por 96 horas em sala com temperatura e iluminação controlada. Os girinos foram mantidos em aquários de 150 litros, respeitando a densidade de 1 girino por litro (APHA, 1989), preenchidos com água de torneira declorada e aeração constante (Figura 3). A temperatura manteve-se em 24ºC±2 e o fotoperíodo de 12 horas (MURTY, 1988).

Figura 3. Aquários de manutenção e aclimatação dos girinos de *L. catesbeianus* mantidos em laboratório sob condições controladas.

Durante esse período a água dos aquários foi renovada uma vez (BRIDGES et al., 2002; HAYES et al., 2003), em 50% do seu volume total, para que as condições físicas e químicas se mantivessem adequadas para a sobrevivência dos girinos (FERREIRA, 2002). Os girinos foram alimentados durante os três primeiros dias com ração de peixe, sendo que nas últimas 24 horas anteriores a realização dos testes de toxicidade a alimentação foi interrompida.

6.3 Testes de sensibilidade

Todos os lotes de girinos adquiridos foram submetidos aos testes de sensibilidade, a fim de se verificar as condições fisiológicas dos animais e assegurar que as possíveis causas da mortalidade nos testes de toxicidade estivessem relacionadas somente à substância tóxica testada e não a nenhuma debilidade na saúde dos indivíduos.

A substância de referência utilizada para os girinos de *L. catesbeianus* foi o sulfato de cobre – $CuSO_4.5H_2O$ (FERREIRA et al., 2004; MARCANTONIO, 2005; OSSANA et al., 2010), com metodologia baseada em normas utilizadas para organismos aquáticos (ABNT, 2004), já que não existem normas padronizadas desenvolvidas para essa espécie de anfíbio.

Após o período de aclimatação, os girinos foram expostos por 96 horas a três concentrações de sulfato de cobre (0,64, 1,28 e 1,92 $mg.L^{-1}$ de cobre, baseadas em testes preliminares e nos trabalhos de FERREIRA et al., 2004; MARCANTONIO, 2005; OSSANA et al., 2010) e um tratamento controle, em triplicata, sem alimentação. Os girinos foram acondicionados em baldes plásticos preenchidos com 6 litros da solução a ser testada, na densidade de 1 indivíduo/litro, com aeração constante. Internamente os baldes foram revestidos com sacos plásticos para evitar a adsorção de substâncias às paredes e

contaminação dos recipientes. A temperatura foi mantida a 24ºC ±2, e o fotoperíodo foi de 12 horas.

Diariamente foram monitorados os valores de pH (potenciômetro da marca Micronal, modelo B374), condutividade elétrica (condutivímetro ORION, modelo 145 plus), temperatura e oxigênio dissolvido (oxímetro da marca YSI, modelo 55-25FT). Após o período de exposição (96 horas) foi avaliada a sobrevivência/imobilidade dos indivíduos. A partir dos dados obtidos foi calculada a CE_{50}, 96h em presença do cobre, e comparado com resultados obtidos em outros trabalhos (FERREIRA et al., 2004; MARCANTONIO, 2005; OSSANA et al., 2010).

6.4 Experimentos laboratoriais

6.4.1 Testes agudos

Para determinar a CL_{50} do Vertimec® 18CE para girinos de *L. catesbeianus*, foram realizados testes de toxicidade aguda em laboratório, do tipo estático, os quais foram montados com quatro réplicas por tratamento e com duração de 96 horas (LOMBARDI, 2004). Para definir as concentrações a serem utilizadas nesse ensaio foram realizados testes preliminares de exposição ao contaminante (Apêndice A).

Cada réplica foi montada em baldes plásticos com capacidade para 8 litros, revestidos internamente com sacos plásticos transparentes (para evitar a adsorção do produto e contaminação dos recipientes), preenchidos com 6 litros da solução a ser testada, todos com aeração individual, conforme descrito no item anterior (Figura 4).

Figura 4. Montagem dos testes de toxicidade aguda e crônica laboratoriais com girinos de *L. catesbeianus* no estágio 25 de Gosner (1960).

Os testes de toxicidade tiveram duração de 96 horas e todos os indivíduos foram mantidos sem alimentação. O experimento foi monitorado diariamente, registrando-se a mortalidade e/ou metamorfose dos girinos, e os valores de pH (potenciômetro da marca Micronal, modelo B374), condutividade elétrica (condutivímetro ORION, modelo 145 plus), temperatura e oxigênio dissolvido (oxímetro da marca YSI, modelo 55-25FT).

Foram utilizados girinos em dois diferentes estágios de desenvolvimento: 1) recém eclodidos, a partir do estágio 21 da tabela de Gosner (1960 - Anexo), enquanto ainda apresentavam brânquias externas; e 2) no estágio 25 de Gosner, estágio usado preferencialmente em estudos ecotoxicológicos, pois é a fase em que os animais são livre natantes e passam a se alimentar independentemente, sendo maior a probabilidade de ingestão de substâncias tóxicas (ALLRAN; KASAROV, 1999; SPARLING et al., 2010; ORTIZ-SANTALIESTRA, 2007), a fim de se observar diferença na sensibilidade entre os diferentes estágios de desenvolvimento de uma mesma espécie.

Os *end points* analisados ao final desses testes foram mortalidade e nível de atividade. Foram realizados testes preliminares para determinar a faixa de sensibilidade da espécie para esse produto, e a partir desses resultados, os testes definitivos de toxicidade aguda 96 horas foram desenvolvidos, sendo três realizados com girinos no estágio 21 da tabela de Gosner (1960) e quatro com girinos no estágio 25G. O nível de atividade foi avaliado de acordo com a atividade natatória dos girinos, observada por um período ininterrupto de 30 segundos, e pela resposta a estímulos nos baldes.

6.4.2 Testes crônicos

As concentrações do Vertimec® 18CE utilizadas nos testes crônicos foram definidas a partir dos resultados encontrados nos testes de toxicidade aguda. Foram utilizadas 3 concentrações, onde a mais alta delas correspondia a 100% do valor da CL_{50}, 96h (0,008 $ml.L^{-1}$), e as demais a 50% (0,004 $ml.L^{-1}$) e 25% deste valor (0,002 $ml.L^{-1}$), além do tratamento controle. Para cada tratamento houveram 4 réplicas e o teste foi conduzido em sistema semi estático.

O teste de toxicidade crônica (Figura 5) foi feito somente com girinos que se encontravam inicialmente no estágio 25 da tabela de Gosner (1960). Os indivíduos foram mantidos da mesma forma descrita nos testes de toxicidade aguda e de sensibilidade (item 6.4.1). A renovação parcial da solução (50% do seu volume total) e limpeza dos recipientes para retirar fezes e restos de alimentos foram feitas a cada 96 horas através de sifonagem (FERREIRA, 2002), juntamente com medidas dos parâmetros físicos e químicos (pH,

oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade elétrica, utilizando os mesmos aparelhos citados no item anterior). Os organismos foram alimentados a cada 96 horas, cerca de 1 hora antes da renovação parcial da solução, *ad libitum*. Diariamente foram avaliados comportamento, nível de atividade, desenvolvimento e sobrevivência.

O experimento teve duração de 24 dias, onde, ao final deste período, todos os girinos sobreviventes foram pesados e tiveram seu estágio de desenvolvimento identificado de acordo com a tabela de Gosner (1960).

Figura 5. Teste de toxicidade crônica com girinos de *L. catesbeianus*, com duração total de 576 horas e renovação parcial da solução de Vertimec® 18CE em 50% do volume total a cada 96 horas de experimento.

6.4.3 Teste de evitamento

O teste de evitamento foi realizado em um sistema composto por multi compartimentos desenvolvidos por Araújo et al. (2012). Cada compartimento correspondeu a duas garrafas plásticas, com volume de 100 ml cada, cortadas de acordo com a figura 6, totalizando 7 compartimentos, interligados entre si pela junção da boca da garrafa pertencente ao compartimento adjacente, e cada um deles foi preenchido com 125 ml da solução a ser testada.

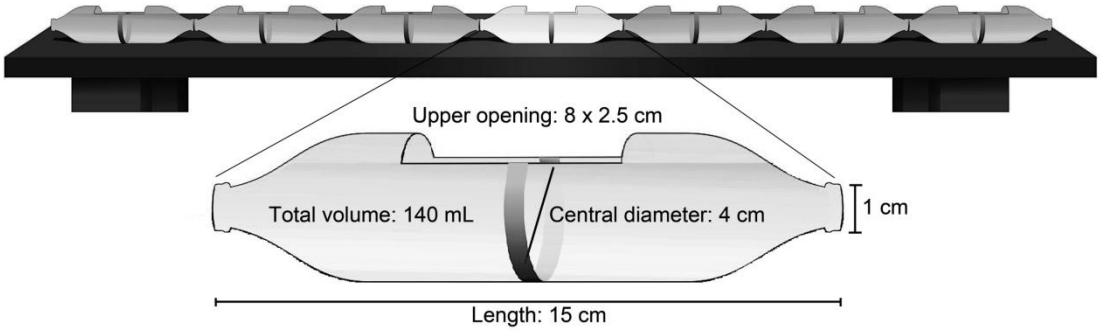


Figura 6. Esquematização do sistema de multi compartimentos para a realização do teste de evitamento, com destaque para um dos compartimentos. (Fonte: Araújo et al., 2014).

Anteriormente à realização do teste foi feita a calibração do sistema para verificar a manutenção do gradiente de contaminação por meio de uma solução de NaCl, já que essa substância possui forte relação com os valores de condutividade, podendo suas concentrações serem inferidas precisamente. As concentrações foram divididas nos compartimentos em ordem decrescente, com o primeiro compartimento contendo a concentração 100% da solução preparada (100 $mg.L^{-1}$). Os demais compartimentos seguiram a diluição da solução na seguinte ordem: 83%, 66%, 50%, 33%, 17% e 0%, formando um gradiente de concentração linear. Anteriormente à adição das soluções, os compartimentos foram isolados por meio de tampas moldáveis envoltas em parafilme na abertura das garrafas, as quais foram retiradas somente após os compartimentos terem sido preenchidos com a solução de calibração a ser testada.

A duração do experimento foi de 12 horas, com os valores de condutividade aferidos no início (0h) e final (12h), diretamente em cada compartimento. A calibração do sistema foi

realizada em tréplica, sem adição de girinos, no escuro e a 25ºC, nas mesmas condições a serem utilizadas nos testes.

Para assegurar a não preferência dos girinos pelos compartimentos e a sobrevivência em determinadas condições, foi feito um teste utilizando-se água de diluição (água do mesocosmo controle sem contaminante), em todos os sete compartimentos, esperando-se uma distribuição homogênea dos organismos nos compartimentos.

Para o teste de evitamento com girinos de *L. catesbeianus*, seguiu-se o mesmo procedimento utilizado na calibração do sistema. A solução de Vertimec® 18CE preparada foi de 0,002 $ml.L^{-1}$, definida em testes preliminares, e a partir desta, foram feitas as devidas diluições (0, 17, 33, 50, 66 e 83%), com concentrações finais de 0,00034; 0,00066; 0,001; 0,00132; 0,00166 $ml.L^{-1}$ do Vertimec® 18CE.

Anteriormente à retirada das tampas dos compartimentos, foi adicionada solução nas devidas concentrações de cada compartimento, e 5 girinos em cada um deles, totalizando 35 indivíduos no experimento em cada uma das réplicas (triplicata). A distribuição dos organismos ao longo do sistema foi registrada após 12 horas de exposição e o ensaio foi mantido em escuro, a 25ºC. O teste de evitamento foi realizado com girinos recém eclodidos, a partir do estágio 21 de Gosner (1960), devido ao tamanho corporal dos indivíduos que o sistema desenvolvido seria capaz de comportar.

A taxa de evitamento foi calculada como a diferença entre o número de indivíduos esperados por réplica e o número de indivíduos observados. O número de indivíduos esperados em cada réplica foi determinado como descrito por Moreira-Santos et al. (2008), em que, para o compartimento com a maior concentração, esse número equivale ao número de girinos introduzidos inicialmente, e para os demais compartimentos equivale ao número de organismos introduzido inicialmente em cada um deles mais os organismos introduzidos nos compartimentos adjacentes de concentração mais elevada. Por exemplo, no compartimento de maior concentração a quantidade de indivíduos esperada é de 5, para o segundo compartimento é 10, e o último é de 35 indivíduos, ou seja, sem evitamento (ARAÚJO et al., 2014).

6.5 Experimentos em campo

Para obter resultados o mais próximo possível do ocorrido no ambiente natural, foram simuladas situações de contaminação em ambientes aquáticos utilizando mesocosmos. A estrutura para os mesocosmos foi montada em um tanque de concreto, com área de 10,24 m^2, com profundidade de 1,15m, localizado próximo à Represa do Lobo, nas imediações do

Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA), da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo (USP), localizado no município de Itirapina/SP, e próximo ao laboratório onde foram feitas as análises. Dentro deste tanque foram alocados 18 barris de polietileno (cilíndricos, abertos na superfície e no fundo, em contato com o sedimento e lavados previamente com acetona e ácido nítrico 10%), cada um com volume de 200 litros (Figura 7).

(a) **(b)**

Figura 7. (a) Área de realização do estudo em fase de preparação. (b) Montagem dos experimentos *in situ*.

Anteriormente ao início do experimento, o tanque de concreto já se encontrava preenchido com água proveniente da represa do Lobo, uma camada de sedimento com cerca de 10 cm e uma comunidade biológica estabelecida. Para assegurar a fixação dos mesocosmos no sedimento, quatro pesos de concreto (com cerca de 12 quilos) foram amarrados externamente a cada unidade experimental, de forma a impedir a passagem de água, contaminante e organismos para o meio externo (Figura 8).

Os mesocosmos foram colocados no tanque de concreto oito dias antes do início do experimento para a readaptação do sistema (temperatura e coluna d'água) e sedimentação do material particulado, procurando manter uma estabilização do sistema nas águas confinadas nos mesocosmos, com sistema de aeração individual constante e monitoramento diário. Durante todo o experimento os mesocosmos permaneceram cobertos com uma proteção de tule, individual, para evitar a ação de predadores e colonização de outras espécies. Para facilitar a retirada e observação dos girinos, foi inserido um saco de sombrite, nas mesmas medidas do mesocosmo (Figura 8). Durante a noite e em períodos de chuva, o tanque permaneceu coberto com plástico transparente para evitar a diluição das soluções dos mesocosmos contaminados (Figura 9).

(a) **(b)**

Figura 8. (a) Representação do mesocosmo com pesos de concreto no entorno para assegurar sua fixação ao sedimento. (b) Revestimento interno de sombrite para facilitar a retirada e inspeção de girinos mortos e/ou metamorfoseados.

Figura 9. Vista geral da área de estudo, coberta por plástico durante a noite e períodos de chuva para evitar a diluição do agrotóxico.

O experimento foi realizado com seis tratamentos, todos em tréplica, submetidos à ausência ou presença de agrotóxico, em diferentes dosagens, e presença ou ausência de girinos, conforme descrito (Figura 10):

- Controle **(C)**: água da Represa do Lobo com a comunidade aquática já presente no tanque de concreto;
- Controle girinos (**CG**): água da Represa do Lobo com adição de girinos, na densidade de 0,4 indivíduos/litro.
- Dose múltipla **(DM)**: água da Represa do Lobo com aplicação direta do agrotóxico Vertimec® 18CE na concentração de 0,002 $ml.L^{-1}$ (que corresponde a 3,6 $\mu g.L^{-1}$de abamectina), com recontaminação na mesma dosagem às 288 horas de experimento;
- Dose múltipla girinos (**DMG**): aplicação do agrotóxico do Vertimec® 18CE nas mesmas condições do item anterior, com adição de girinos na densidade de 0,4 indivíduos/litro.
- Dose única **(DU)**: água da Represa do Lobo com adição de agrotóxico Vertimec® 18CE na concentração de 0,008 $ml.L^{-1}$ (a qual corresponde a 14,4 $\mu g.L^{-1}$de abamectina), em uma única aplicação ao início do experimento.
- Dose única girinos (**DUG**): Vertimec® 18CE aplicado diretamente à água em dosagem única com a presença de girinos na densidade de 0,4 indivíduos/litro.

Figura 10. Disposição dos mesocosmos no tanque de concreto, com a respectiva representação dos tratamentos, onde: C representa o controle; CG controle com girinos de *L. catesbeianus*; DM a aplicação do Vertimec® 18CE em duas doses com intervalos de 12 dias; DMG representa o tratamento com duas doses de Vertimec® 18CE com a presença de girinos de *L. catesbeianus*; DU, é a manipulação do Vertimec® 18CE em uma única dose equivalente a CL_{50}, 96h encontrada em laboratório para girinos de rã-touro; e DUG, que contava com as mesmas condições do tratamento anterior, porém com a inserção de girinos de *L. catesbeianus*.

A concentração do Vertimec® 18CE para o tratamento DM foi definida a partir de experimentos anteriores (NOVELLI, 2010), em que foi feita análise cromatográfica de amostras provenientes de escoamento superficial (*run off*) em área pulverizada com o agrotóxico, de acordo com informações contidas na bula para a cultura do morango (0,75 $mL.L^{-1}$, o que representa 0,125 litros de calda por m^2). Com essas análises encontrou-se a concentração de 0,002 $ml.L^{-1}$de Vertimec® 18CE na amostra de *run off*, o que representa 100% da concentração do agrotóxico escoada superficialmente. Para a definição da concentração de DU foram realizados testes laboratoriais de toxicidade aguda, onde foi definida a CL_{50}, 96h (concentração subletal) para girinos de *Lithobates catesbeianus* (0,008 $ml.L^{-1}$).

Para ambos os tratamentos o experimento contou com a concentração nominal do Vertimec® 18CE devido à dificuldade nas análises e quantificação de agrotóxicos. A aplicação do produto aos mesocosmos contaminado foi feita por meio de uma solução mãe na concentração de 16 $ml.L^{-1}$ de Vertimec® 18CE, a fim de diminuir o erro, sendo que no tratamento DM e DMG (0,002 $ml.L^{-1}$) foram adicionados 25 ml dessa solução em cada unidade experimental e para o tratamento DU e DUG (0,008 $ml.L^{-1}$) foram adicionados 100 ml (Figura 11).

Figura 11. Contaminação dos tratamentos com solução padrão de Vertimec® 18CE nas respectivas diluições, nos tratamentos DM (dose múltipla), DMG (dose múltipla com girinos), DU (dose única) e DUG (dose única com girinos) e homogeinização de cada mesocosmo anteriormente a inserção do lote de girinos.

Antes da adição dos girinos aos mesocosmos foi feita a pesagem de 10% dos indivíduos utilizados no teste, com balança de precisão (marca Mettler, modelo AE240), os quais foram desconsiderados na utilização para os testes, a fim de evitar estresse da manipulação, capaz de alterar o comportamento dos indivíduos. Esses dados foram comparados aos obtidos ao final do experimento para o cálculo de taxa de crescimento. Todos os girinos utilizados nesse experimento encontravam-se incialmente no estágio 25 da tabela de Gosner (1960), estágio em que os girinos não possuem mais brânquias externas.

As primeiras medidas das variáveis caracterizaram o tempo 0 h. Depois de feitas as primeiras coletas e aferidos parâmetros físicos e químicos, foi feita a contaminação dos tratamentos DM, DMG, DU e DUG com o Vertimec® 18CE nas concentrações já citadas e, posteriormente, a inserção dos girinos, na densidade de 0,4 indivíduos por litro. No momento anterior à adição dos girinos aos mescosmos, todos os indivíduos foram mantidos em sacos plásticos com oxigênio e colocados dessa maneira na água por cerca de 20 minutos (Figura 12) para evitar mudanças climáticas bruscas. Após a contaminação (0 hora) realizou-se outra amostragem, às 3 horas de experimento. Diariamente registrou-se o número de girinos mortos ou metamorfoseados, os quais, quando encontrados, eram retirados dos barris.

Figura 12. Aclimatação dos girinos a temperatura dos mesocosmos anteriormente à adição destes a cada mesocosmo.

A recontaminação do sistema nos tratamentos de dosagem múltipla foi feita às 288 horas de experimento. Para a recontaminação, uma nova solução mãe foi preparada, na mesma concentração descrita inicialmente, e adicionada na mesma proporção aos mesocosmos DM e DMG.

O experimento teve duração de 20 dias (480 horas). Ao final desse período todos os girinos sobreviventes foram pesados e tiveram seu estágio de desenvolvimento identificado de

acordo com a tabela de Gosner (1960), avaliando-se o tempo até a metamorfose (duração do período larval), tamanho corporal na metamorfose (quando houve) e a proporção de indivíduos metamorfoseados (número de indivíduos que atingiram a metamorfose/número de indivíduos inicial), utilizando os parâmetros anteriormente citados. A taxa de crescimento (TC) foi calculada pela expressão:

TC = [(peso final - peso inicial)x100]/período experimental (dias).

6.5.1 Variáveis físicas e químicas da água

A variáveis pH, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade foram medidas, em campo, para monitoramento das características da água, utilizando uma sonda multi parâmetros, marca Horiba, modelo U-10 (Figura 13). A análise de turbidez foi feita através de espectrofotometria, em laboratório, seguindo metodologia designada por APHA (1995).

Figura 13. Medição de parâmetros limnológicos com sonda multi parâmetros da marca Horiba.

Os nutrientes foram analisados por espectrofotometria seguindo as metodologias específicas para cada nutriente (Tabela 1). As amostras para nutrientes totais e dissolvidos foram coletadas diretamente da água de superfície, e mantidas congeladas até o momento da análise. Para a análise de metais as amostras coletadas foram acidificadas com ácido nítrico (pH = 2) para posterior análise. A análise da concentração de clorofila *a* foi feita através da filtragem das amostras em filtros de fibra de vidro com membrana tipo GF/C de 0.45 µm,

seguida da extração em etanol 80% a quente, com posterior determinação por espectrofotometria UV (Espectrofotômetro 600, Femto).

As coletas para todos os parâmetros da água foram feitas a cada 96 horas, com as duas coletas iniciais ocorrendo antes da contaminação (0h) e logo após (3h), a exceção do metal, a qual foram feitas medidas inicial, intermediária e final.

Tabela 1 - Metodologia utilizada para análise das variáveis físicas, químicas e biológicas da água dos mesocosmos.

Variável	Metodologia	Referência
pH Temperatura Oxigênio dissolvido Condutividade elétrica	Sonda multi parâmetros HORIBA – modelo U-10	-
Turbidez	Espectrofotometria	APHA, 1995
Clorofila *a*	Espectrofotometria	NUSCH, 1980
Nitrito e nitrato	Espectrofotometria	MACKERETH et al., 1978
Íon amônio	Espectrofotometria	KOROLEFF, 1976
Nitrogênio orgânico total, fósforo total, fosfato total dissolvido e fosfato inorgânico	Espectrofotometria	APHA, 1995
Silicato reativo	Espectrofotometria	GOLTERMAN, 1978
Metais biodisponíveis	Espectrofotometria de absorção atômica (forno e chama de grafite)	APHA, 1995

6.5.2 Variáveis físicas e químicas do sedimento

As amostras de sedimento foram coletadas com um coletor de tubo de PVC (figura 14) anteriormente ao início do experimento e ao final, todas em tréplica. Esse intervalo entre as coletas ocorreu no sentido de prevenir ressuspensão de partículas, o que poderia influenciar na sobrevivência de organismos e na qualidade da água.

Figura 14. Coleta de amostras de sedimento através de tubo coletor de PVC.

Assim que coletadas, as amostras de sedimento foram homogeneizadas e mantidas em potes plásticos. As amostras permaneceram abertas em temperatura ambiente para secagem do material e posterior análise (Tabela 2).

Tabela 2 - Metodologia utilizada para análise de nutrientes em amostras de sedimento dos mesocosmos.

Variável	Metodologia	Referência
Matéria orgânica	Incineração em mufla	TRINDADE, 1980
Fósforo total	Espectrofotometria	ANDERESEN, 1976
Nitrogênio total	Espectrofotometria	APHA, 1995
Metais potencialmente biodisponíveis	Espectrofotometria (absorção atômica por chama)	SILVÉRIO, 1999

Como não existem índices máximos permissíveis da concentração de metais no sedimento em legislação vigente, foram utilizados como referência, para efeito de comparação, os valores obtidos por Nascimento e Mozeto (2008) em sedimentos de reservatórios do Rio Tietê. Nesse trabalho, os valores para metais são propostos como um

auxílio aos demais estudos, dada a importância da Bacia do Rio Tietê, localizada em uma das regiões antropizadas do Brasil. Outro comparativo foi feito utilizando-se a legislação CONAMA 454/2012, que estabelece diretrizes e procedimentos para o gerenciamento de material a ser dragado em águas.

6.5.3 Frequência de amostragem

A frequência da amostragem para coleta e análise de água, sedimento e girinos encontra-se descrita na tabela 3, juntamente com a variáveis quantificadas em cada compartimento avaliado.

Tabela 3 - Etapas de coletas de amostras de água e sedimento dos mesocosmos para análises laboratoriais e em campo, e identificação e monitoramento dos girinos de *L. catesbeianus*.

	HORAS						
	0	3	96	192	288	384	480
ÁGUA							
pH							
Oxigênio dissolvido							
Condutividade							
Temperatura							
Análise de nutrientes							
Clorofila a							
Metais							
RECONTAMINAÇÃO							
SEDIMENTO							
Metais							
Análise de nutrientes							
GIRINOS							
Sobrevivência							
Peso							
Comprimento							
Desenvolvimento							

6.5.4 Índice de estado trófico

O índice de estado trófico (IET) classifica os corpos d’água em diferentes graus de trofia, avaliando a qualidade da água quanto ao enriquecimento por nutrientes responsáveis por interferir na produtividade dos ecossistemas aquáticos (ESTEVES, 2011), podendo resultar em efeitos adversos, como mudanças na biodiversidade aquática, crescimento excessivo de algas e infestação de macrófitas aquáticas (CETESB, 2013).

Para o cálculo do IET, foram utilizados os valores de: fósforo total, classificado como principal agente causador do processo de eutrofização; e clorofila *a*, cujo resultado é considerado como resposta do corpo d'água ao agente causador, indicando o nível de crescimento das algas (CETESB, 2013). Utilizou-se o índice desenvolvido por Carlson (1977), modificado por Lamparelli (2004), para ambientes lênticos, o qual também foi adotado pela CETESB para identificar a qualidade dos corpos d'água.

As equações utilizadas foram:

$$IET\ (CL) = 10x(6-((0{,}92-0{,}34x(\ln CL))/\ln 2))$$

$$IET\ (PT) = 10x(6-(1{,}77-0{,}42x(\ln PT)/\ln 2))$$

Para o cálculo final foi feita a média aritmética entre os índices calculados para fósforo total e clorofila *a*, segundo a equação:

$$IET = [\ IET\ (\ PT\ ) + IET\ (\ CL)\ ]\ /\ 2$$

Na tabela 4 encontram-se essa classificação dos grau de trofia dos corpos d'água, conforme CETESB (2013), que permite identificar as condições dos mesocosmos através dos resultados obtidos a partir das equações acima .

Tabela 4 - Classificação dos corpos d'água em função da concentração de nutrientes e níveis de produtividade quando comparados às condições naturais saudáveis. Adaptada da CETESB (2013)

Valor IET	Classificação	Concentração de nutrientes	Produtividade	Consequências
<47	Ultraoligotrófico	Insignificante	Muito baixa	Sem prejuízo aos usos da água. Corpos d'água limpos.
47<IET<52	Oligotrófico	Baixa	Baixa	Sem interferências indesejáveis sobre os usos da água. Corpos d'água limpos.
52<IET<59	Mesotrófico	Aceitáveis	Intermediária	Possíveis implicações sobre a qualidade da água
59<IET<63	Eutrófico	Elevada	Alta	Redução da transparência e alterações indesejáveis na qualidade da água.
63<IET<67	Supereutrófico	Elevada	Alta	Baixa transparência e alterações indesejáveis na qualidade da água (como florações de alga).
IET>67	Hipereutrófico	Elevada, assim como a matéria orgânica	Alta	Comprometimento acentuado nos seus usos. (ex: florações de algas e mortandades de peixes).

6.6 Análises estatística dos dados

6.6.1Testes de toxicidade laboratoriais

Os resultados dos testes de toxicidade aguda laboratorial com o Vertimec® 18CE foram analisados através do método estatístico Trimmed Spearm-Karber (HAMILTON et al., 1977), para calcular os valores da CL_{50}, 96h.

Os resultados obtidos nos testes de toxicidade crônica (sobrevivência) foram submetidos à análise de normalidade dos dados (teste de Chi-Quadrado) e homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett), utilizando-se o programa computacional Toxstat 3.4 (GULLEY et al., 1994). Em caso de distribuição normal, ou seja, sendo paramétricos, foram analisados através do teste de Dunnett, o qual compara cada tratamento com o controle experimental. Em casos em que os dados se apresentaram como não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, que compara todos os tratamentos entre si. Os resultados dos testes de toxicidade crônica referentes à duração do período larval, tamanho na metamorfose e taxa de crescimento foram comparados entre os tratamentos por meio de análise de variância univariada (one way ANOVA), usando o tamanho inicial dos girinos como co-variável nos modelos.

6.6.2 Experimentos em campo

Uma análise de componentes principais (ACP) foi utilizada para verificar a variação espacial e temporal das variáveis limnológicas, com o intuito de hierarquizar as variáveis componentes do sistema.

Para verificar o comportamento das variáveis limnológicas e do sedimento entre os tratamentos durante as 480 horas de experimento, em cada período de coleta (0, 3, 96, 192, 288, 384 e 480 horas), foi feita análise de variância univariada (one way ANOVA). Quando identificada diferença significativa entre os dados utilizou-se a teste de Tukey. As análises numéricas dos dados foram realizadas com auxílio do pacote estatístico PAST versão 2.06 (HAMMER et al., 2001).

Período larval, tamanho na metamorfose e taxa de crescimento foram comparados entre os tratamentos por meio de análise de variância univariada (one way ANOVA), usando o tamanho inicial dos girinos como co-variável nos modelos.

7. RESULTADOS

7.1 Experimentos laboratoriais

7.1.1 Testes de sensibilidade

Em todos os testes de sensibilidade os valores da CL_{50}, 96h estiveram abaixo do obtido por outros autores para a mesma espécie (Tabela 5), o que pode estar relacionado à fase de desenvolvimento dos girinos, uma vez que organismos em fase de desenvolvimento mais precoce tendem a ser mais sensíveis do que aqueles que estão em estágios superiores, conforme mencionado por Ossana (2010). Porém, os resultados para *L. catesbeianus* neste trabalho mostraram-se homogêneos entre os diferentes lotes de girinos adquiridos.

O valor da CL_{50}, 96h obtido em laboratório para girinos de *Lithobates catesbeianus* 25G, para a substância de referência $CuSO_4$, foi de 0,64 mg de $Cu^{2+}.L^{-1}$.

Tabela 5 - Valores de CL_{50}, 96h encontrados para o cobre, para girinos de *L. catesbeianus* em diferentes estágios de desenvolvimento.

Autor	CL_{50}, 96h	Estágio de desenvolvimento
Ferreira et al., 2004	2,4 $mg.L^{-1}$	31-36 G
Marcantônio, 2005	2,2 $mg.L^{-1}$	31 G
Ossana et al., 2010	3,96 $mg.L^{-1}$	25-26 G
Lombardi et al., 2002	2,8 $mg.L^{-1}$	Não informado
Este trabalho	0,64 $mg.L^{-1}$	25G

7.1.2 Testes de toxicidade aguda

Os resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda, na exposição de girinos de *Lithobates catesbeianus* ao agrotóxico Vertimec® 18CE em laboratório, encontram-se representados nas figuras 15 (estágio 21G) e 17 (estágio 25G).

O valor da CL_{50}, 96h calculado para girinos de *L. catesbeianus* no estágio 21 da tabela de Gosner foi de 0,0030 $ml.L^{-1}$, com limite inferior e superior de 0,0027 e 0,0033 $ml.L^{-1}$, respectivamente. Por meio de análise univariada (*one way* ANOVA) verificou-se que não houve diferença estatística significativa entre os três testes de toxicidade, portanto, o valor da CL_{50}, 96h foi calculado a partir da média entre os valores encontrados.

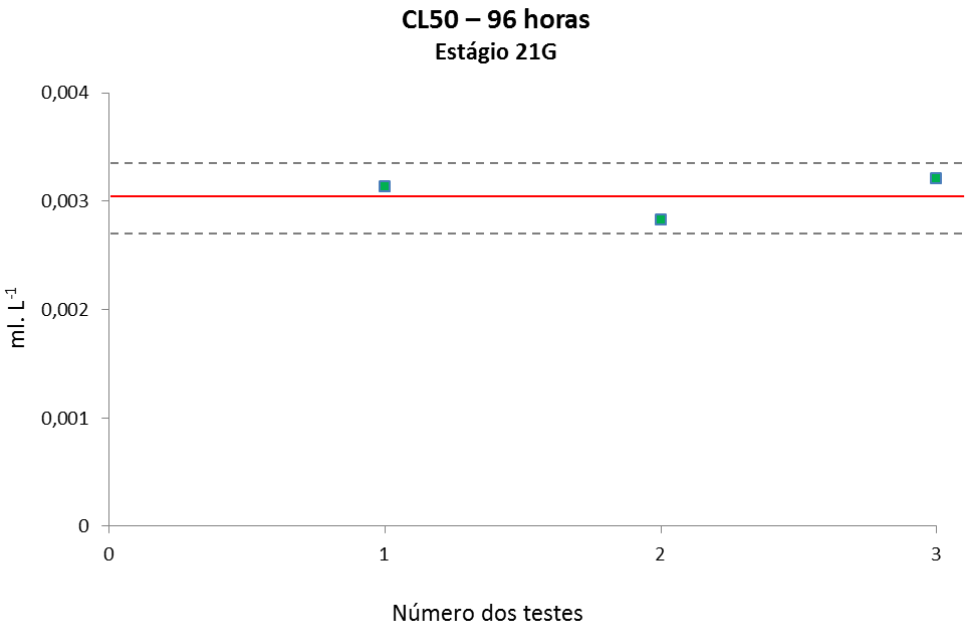


Figura 15. Valores da CL_{50}, 96h, limite inferior e superior calculados nos testes de toxicidade aguda realizado com girinos de *L. catesbeianus* nos estágio 21G, expostos ao Vertimec® 18CE.

Parâmetros físicos e químicos, aferidos no início e ao final do experimento (Figura 16), não apresentaram diferenças significativas entre os três testes realizados, tendo sido utilizado o valor médio, e mantiveram-se dentro de valores aceitáveis (ASTM, 2004). O pH manteve-se como neutro em todos os tratamentos, tanto no início como no final do experimental, atingindo valores mínimos de 6,8 e máximo de 7,5. As concentrações de oxigênio dissolvido apresentaram ligeiro aumento no decorrer do experimento, com valores mínimos e máximos de 6,15 e 7,7 $mg.L^{-1}$, respectivamente. A temperatura manteve-se constante, com variações de 24º±2. Os valores de condutividade diferiram-se ao final do experimento (máximo de 58,8 $\mu S.cm^{-1}$) em relação aos iniciais (valores médios de 26,6 $\mu S.cm^{-1}$).

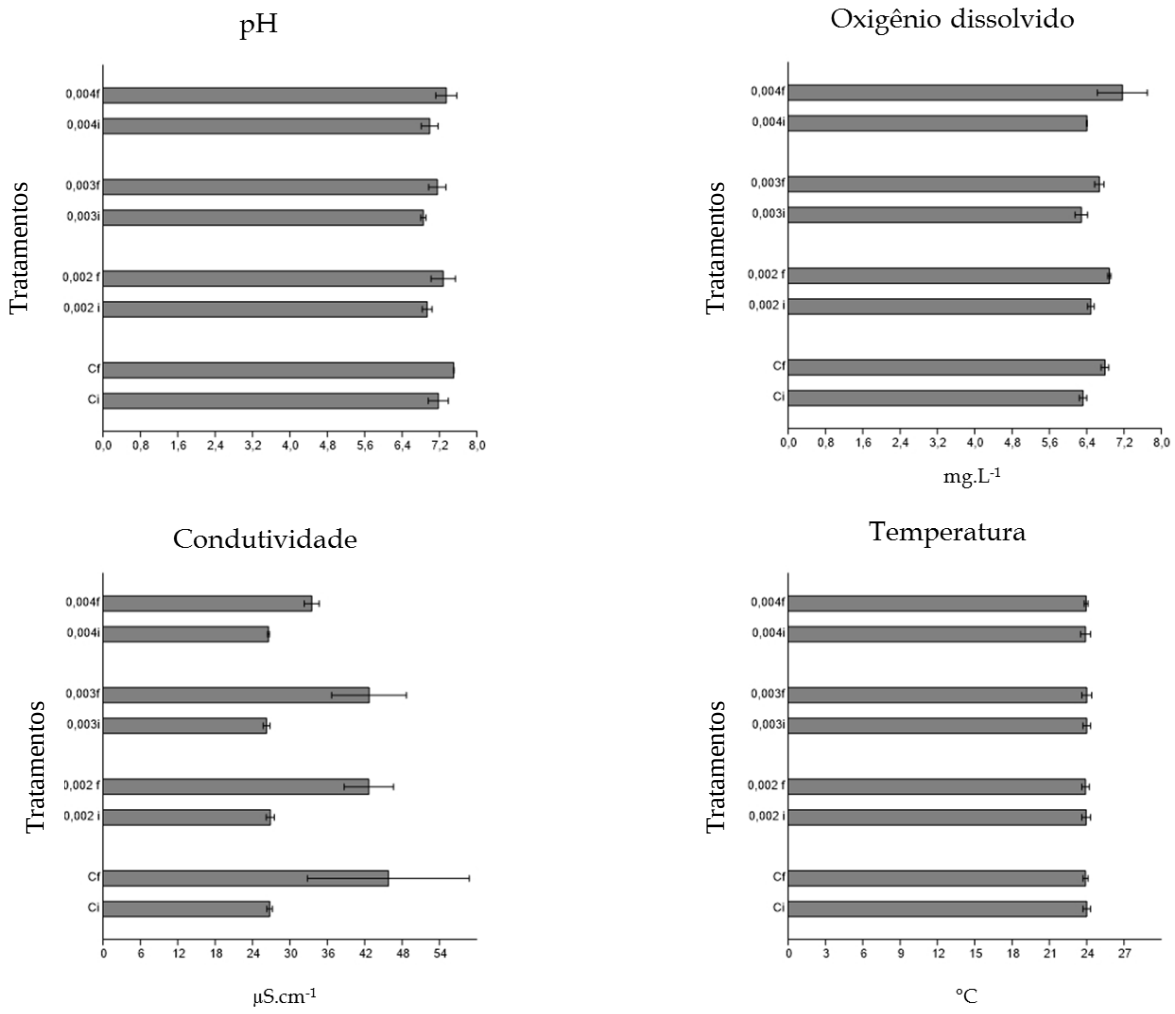


Figura 16. Média e desvio padrão dos valores dos parâmetros físicos e químicos obtidos nos três testes de toxicidade laboratoriais com girinos de *L. catesbeianus* no estágio 21G, onde i: inicial e f: final.

O valor médio da CL_{50}, 96h encontrado para girinos de *L. catesbeianus* no estágio 25 da tabela de Gosner exposto ao agrotóxico Vertimec® 18CE, foi de 0,00769 $ml.L^{-1}$, com limite inferior de 0,0059 e superior de 0,0094 $ml.L^{-1}$ (Figura 17). Os resultados obtidos nos quatro testes de toxicidade também não apresentaram diferença significativa entre si ($p>0,05$), sendo possível, portanto, calcular o valor médio entre os testes realizados.

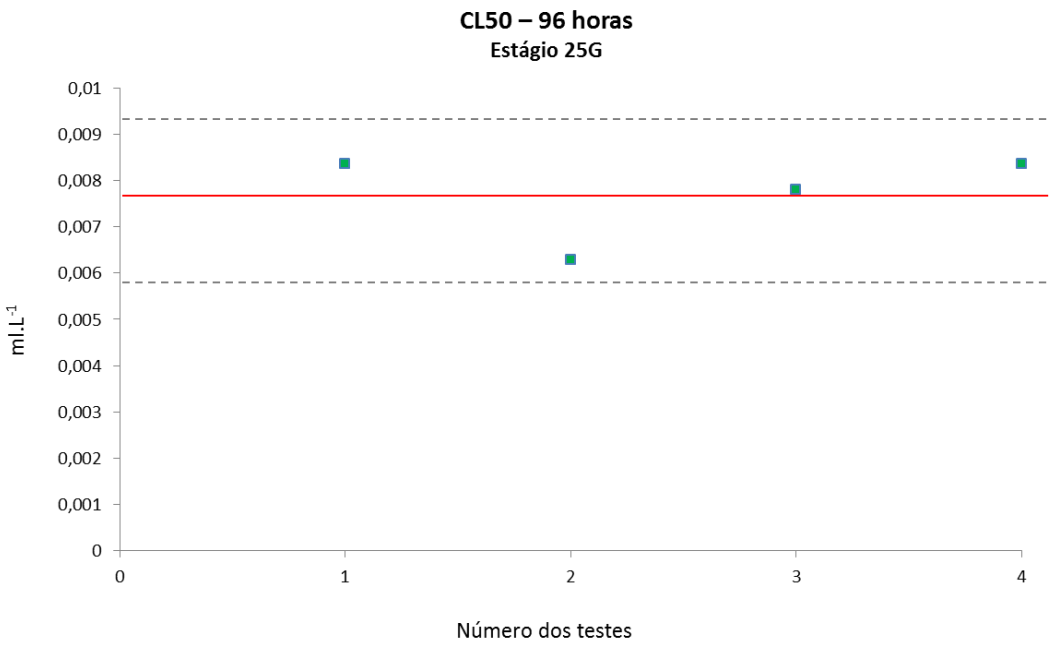


Figura 17. Valores de CL_{50}, 96h, limite superior e inferior calculados nos testes de toxicidade aguda realizado com girinos de *L. catesbeianus* no estágio 25G, expostos ao Vertimec® 18 CE.

No experimento com girinos no estágio 25G observou-se baixa atividade dos indivíduos sobreviventes no tratamento 0,008 $ml.L^{-1}$ nas primeiras 72 horas de experimento. Ao final do experimento (96 horas) os girinos apresentaram maior atividade, porém, ao ser oferecido alimento, não foram capazes de se alimentar, enquanto nos outros tratamentos (0,002 e 0,004 $ml.L^{-1}$) foram observados níveis de atividade e alimentação normal, semelhantes ao controle e aos aquários de manutenção.

Os valores médios dos parâmetros físicos e químicos, e seus respectivos desvios padrão, encontram-se descritos na figura 18. Durante o experimento observou-se aumento significativo nos valores de condutividade, sendo encontrado maior valor final no tratamento 0,002 $ml.L^{-1}$ (94,35 $\mu S.cm^{-1}$). O pH sofreu leve diminuição, porém manteve-se dentro dos níveis de neutralidade, variando entre 6,8 e 7,51. A concentração de oxigênio dissolvido (variação entre 6,15 e 6,92 $mg.L^{-1}$), e temperatura (com variação entre 23,5 e 24,4) mantiveram-se estáveis.

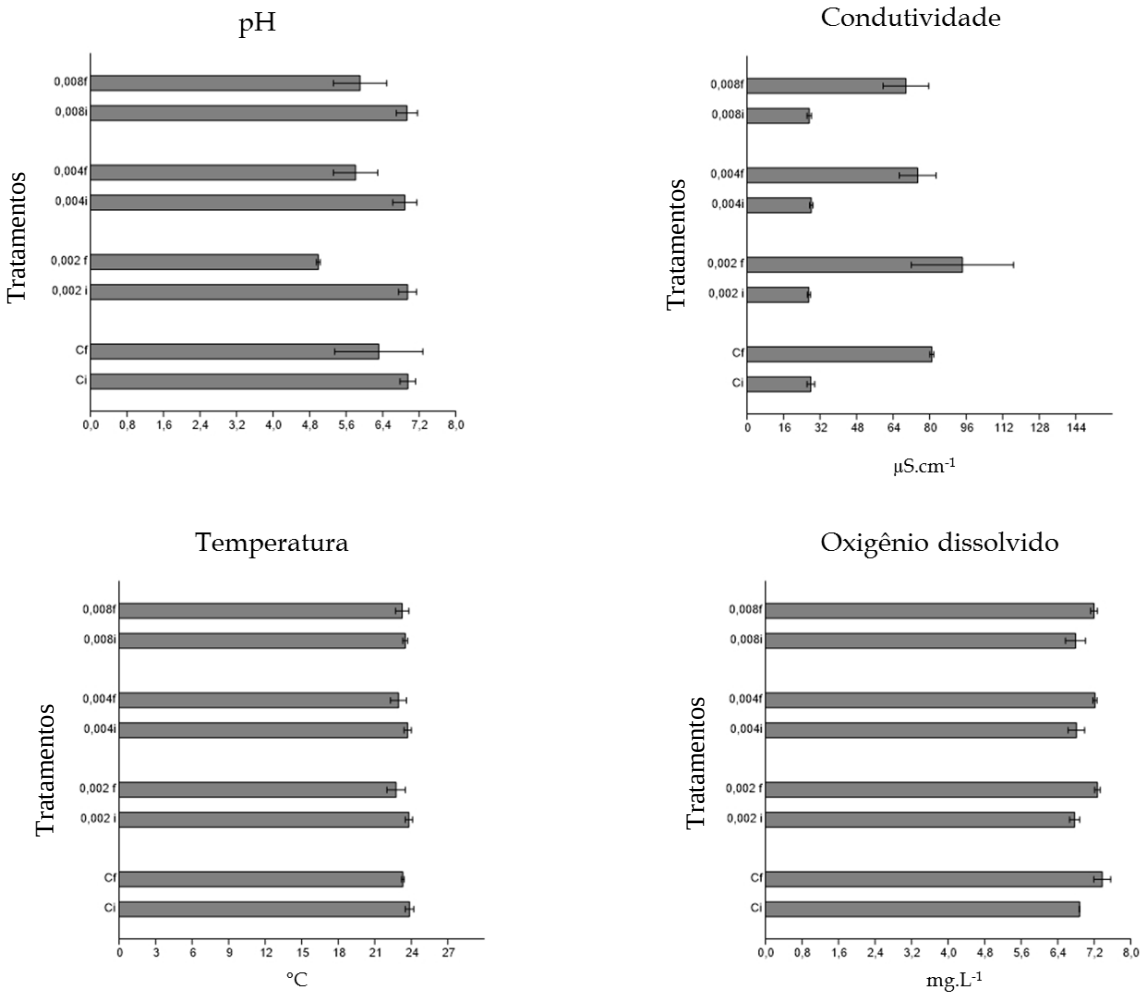


Figura 18. Média e desvio padrão dos valores dos parâmetros físicos e químicos obtidos nos quatro testes de toxicidade aguda com girinos de *L. catesbeianus* no estágio 25G, onde i: inicial e f: final.

Os testes de toxicidade aguda realizados em laboratório com girinos de *L. catesbeianus* expostos ao agrotóxico Vertimec® 18CE demonstraram diferença significativa na sensibilidade dos diferentes estágios de desenvolvimento ($p<0,05$ – Tabela 6). Os girinos em estágio de desenvolvimento precoce (recém eclodidos) apresentaram sensibilidade cerca de 2,5 vezes maior que estágios de desenvolvimento mais avançados. Todos os valores das concentrações de Vertimec® 18CE foram baseados nas concentrações nominais.

Tabela 6 - Comparação por ANOVA (Tukey) dos valores de CL_{50}, 96h obtidos para os dois diferentes estágios de desenvolvimento (21G e 25G) de *L. catesbeianus*.

	Soma dos quadrados	gl	Médias quadráticas	F	*p*
Entre grupos	3,663E-05	1	3,663E-05	57,69	0,0008314
Dentro dos grupos	3,17448E-06	5	6,34895E-07		
Total	3,98045E-05	6			

7.1.3 Testes de toxicidade crônica

Os dados obtidos nos testes de toxicidade crônica foram calculados utilizando girinos que se encontravam incialmente no estágio 25 da tabela de Gosner, e encontram-se descritos nas figuras 19 e 20. Ao final dos 24 dias de experimentos todos os girinos foram pesados e tiveram seu estágio de desenvolvimento novamente identificado.

De acordo com o teste de Dunnet, o tratamento com 0,008 $ml.L^{-1}$ de Vertimec® 18CE foi o único em que se verificou diferença significativa na porcentagem de girinos no estágio de 25G em relação ao controle. Isso se deve ao fato de alta mortalidade, que foi de 79,17% no decorrer das 576 horas de experimento. O teste de Tukey indicou ainda diferença significativa na porcentagem de girinos nesse estágio entre os tratamentos 0,004 e 0,008 $ml.L^{-1}$.

No estágio 32-37 de Gosner observou-se diferença significativa entre 0,002 e 0,008 $ml.L^{-1}$ e entre 0,002 e 0,004 $ml.L^{-1}$, porém nenhum dos tratamentos diferiu-se do controle. Nos demais estágios não foi observada diferença significativa na proporção de indivíduos em cada estágio de desenvolvimento, incluindo os metamorfoseados (estágio 46), sendo que no período analisado (24 dias) o único tratamento que apresentou girinos nesse estágio foi o de 0,002 $ml.L^{-1}$, porém com baixo percentual, não sendo significativo. Diante desses dados, a duração do período larval não pode ser calculada.

Os girinos sobreviventes do tratamento 0,008 $ml.L^{-1}$ apresentaram baixa atividade natatória durante todos os dias de experimento, com pouca ou nenhuma alimentação quando esta era oferecida (uma hora antes de cada renovação parcial da solução), sendo observado um ligeiro aumento dessa atividade nos sobreviventes a partir de 20º dia de experimento.

De acordo com o teste de Fisher o único tratamento que apresentou diferença significativa na sobrevivência em relação ao controle foi o de 0,008 $ml.L^{-1}$.

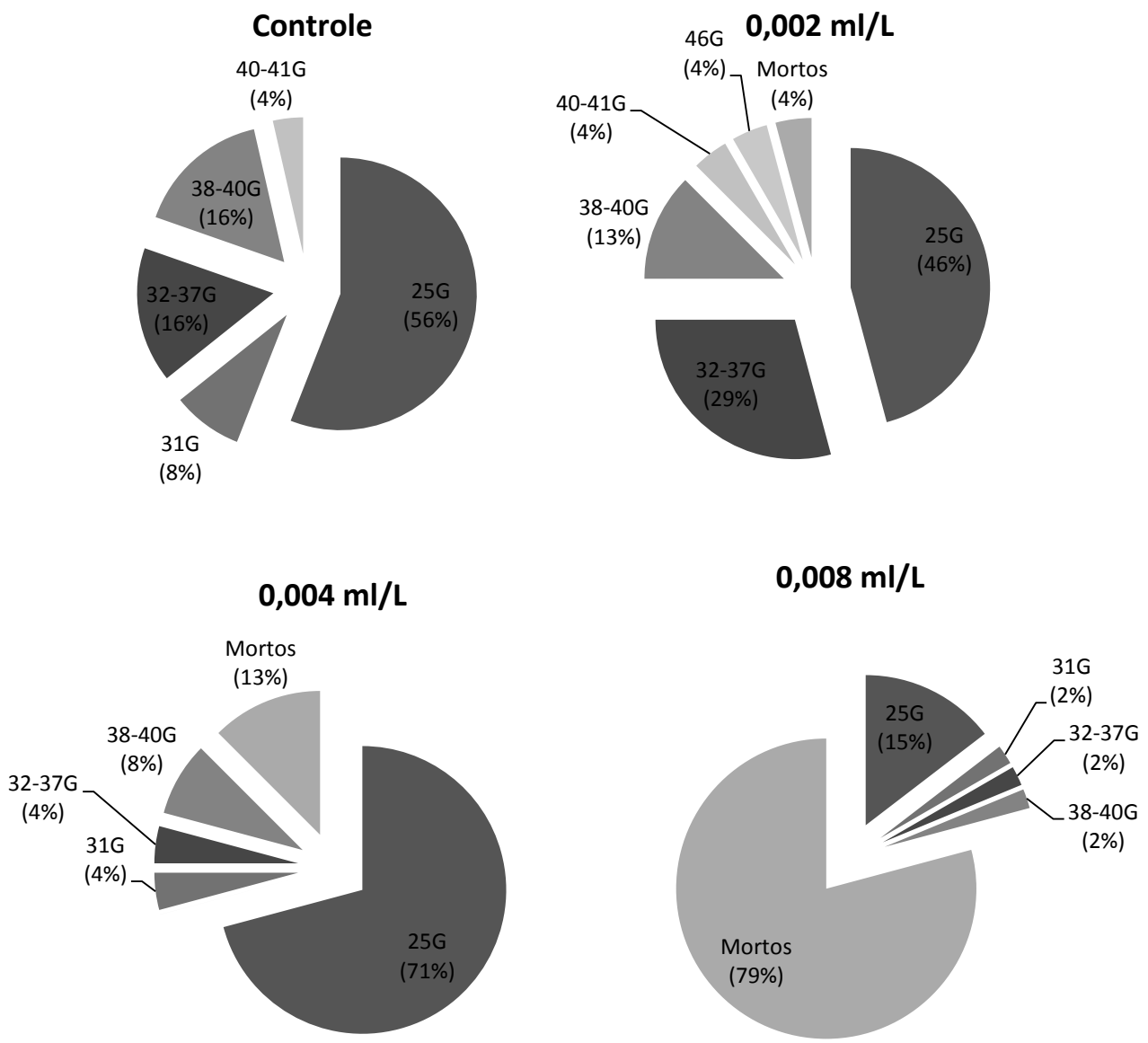


Figura 19. Percentual de girinos em cada estágio de desenvolvimento após as 576 horas de experimento em laboratório com o agrotóxico Vertimec® 18CE. Os estágios que não se encontram representados na figura são aqueles cujo valor foi igual a zero.

As análises univariadas demonstraram que não houve diferença significativa no peso dentro de cada estágio de desenvolvimento, entre os diferentes tratamentos e nem entre o valor médio de peso em cada tratamento em relação ao valor inicial. Os resultados obtidos são apresentados na figura 20.

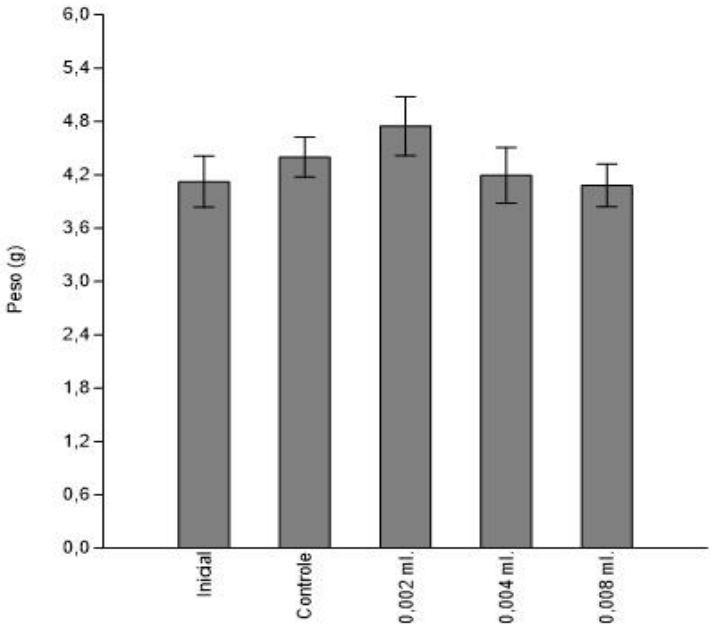


Figura 20. Valor do peso médio final e desvio padrão dos girinos sobreviventes de cada tratamento do teste crônico laboratorial com duração de 24 dias.

Os parâmetros físicos e químicos foram semelhantes entre os tratamentos (Figura 21), não diferindo significativamente entre si em cada período analisado. Os valores de pH mantiveram-se próximos a neutralidade, com valores mínimos ao início do experimento (6,88) e máximo ao final das 576 horas (7,74). A temperatura manteve-se dentro dos níveis de variação aceita pela ASTM (2004), de 24ºC ±2, durante todas as medições. A condutividade apresentou aumento até às 192 horas de experimento, com pequeno decréscimo após esse período. Os valores variaram entre os tratamentos em 26,3 $\mu S.cm^{-1}$, como mínimo, e 145,1 $\mu S.cm^{-1}$ como valor máximo. Os valores de oxigênio dissolvido diminuíram nas primeiras 192 horas do teste, atingindo valores mínimos de 3,44 $mg.L^{-1}$ no tratamento controle. Após esse período esses valores voltaram a aumentar, atingindo valores entre 4,65 e 5,59 $mg.L^{-1}$, estabilizando-se até o final do experimento.

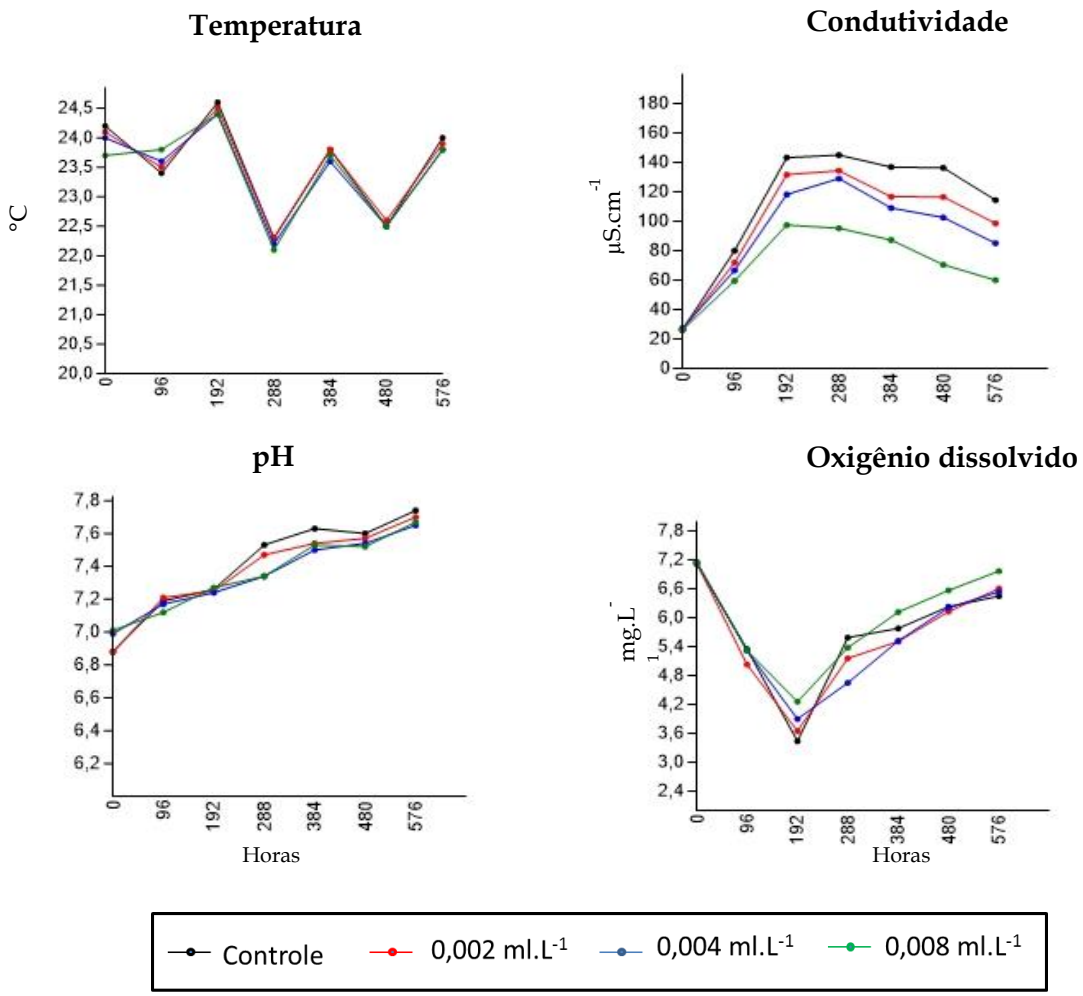


Figura 21. Valores de pH, oxigênio dissolvido, condutividade e temperatura obtidos durante o teste crônico laboratorial com a espécie *L. catesbeianus*, expostos ao Vertimec® 18 CE.

7.1.4 Teste de evitamento

O teste de calibração do sistema mostrou que, através da medição dos valores de condutividade em cada compartimento, as concentrações de NaCl foram estáveis durante as 12 horas de observação. Além disso, o teste de distribuição dos organismos não identificou diferença significativa na preferência dos mesmos nos diferentes compartimentos, validando o teste realizado.

Ao final das 12 horas de exposição dos girinos às diluições da solução de Vertimec® 18CE no teste de evitamento definitivo não foi observada mortalidade de nenhum indivíduo, o que condiz com os resultados encontrados nos testes de toxicidade aguda em laboratório para girinos no estágio 21G, já que a maior concentração utilizada nesse teste foi de 0,002 ml.L^{-1}. Pôde-se observar que houve uma preferência significativa nos compartimentos de solução mediana (50 e 66%).

Em relação ao evitamento, observou-se que ocorreu somente nas três maiores concentrações (66, 83 e 100%), as quais equivalem respectivamente a 0,0013 0,0016, 0,002 ml.L^{-1} de Vertimec® 18CE (Figura 22).

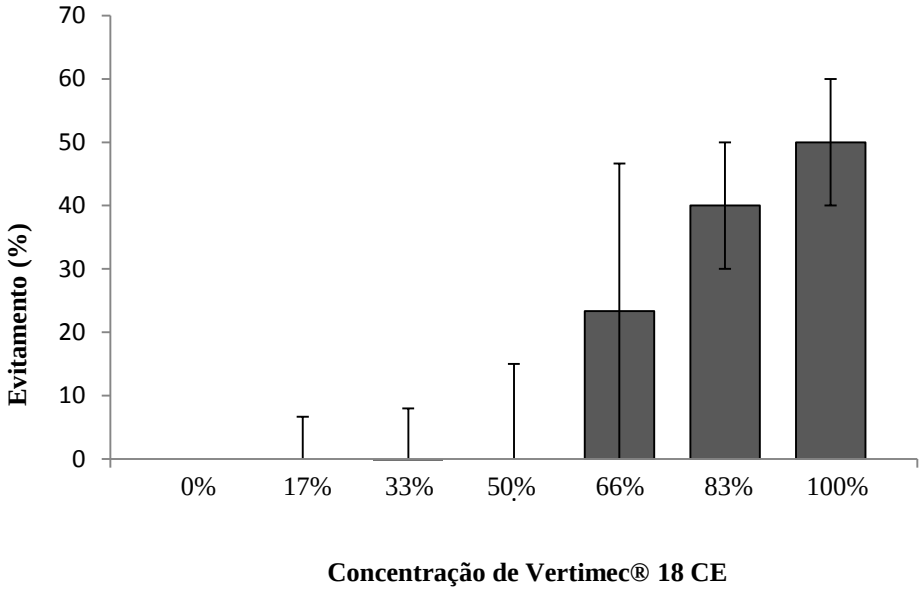


Figura 22. Percentual de evitamento dos girinos de *L. catesbeianus* expostos a diferentes percentuais do agrotóxico Vertimec® 18CE em um sistema de multi compartimentos no teste de evitamento.

7.2 Experimento em campo

7.2.1 Variáveis físicas e químicas da água

Os resultados obtidos para pH, condutividade, oxigêmio dissolvido, turbidez, temperatura e clorofila *a* encontram-se na Figura 23. Durante todo o experimento a única variável que não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, em cada coleta, foi a temperatura ($p>0,05$). Às 3 horas de experimento verificou-se temperatura elevada (valor médio de 29,9º C) pelo fato da coleta dos dados ter sido realizada em período inverso aos demais (a tarde), devido à contaminação do sistema.

Os valores de pH foram semelhantes entre todos os tratamentos durante o experimento, com exceção das 192 horas, quando os tratamentos controle (C e CG) tiveram diminuição desses valores (6,58 e 6,49, respectivamente), diferindo significativamente dos outros ($p<0,05$), mas não entre si. Na coleta seguinte (288 horas), o valor de pH no controle começou a aumentar, variando entre 6,74 e 7,45 até o final do experimento, e diferindo significativamente dos demais tratamentos, que apresentaram valores de pH mais baixos, entre 6,41 e 7,34. Às 384 horas, o controle foi diferente de todos os tratamentos, exceto

daqueles que haviam recebido uma única dose do Vertimec® 18CE (DU e DUG), os quais também diferiram daqueles que receberam as duas doses (tratamentos dose múltipla). Ao final do experimento, o tratamento controle foi diferente dos tratamentos contaminados, a exceção de DUG. Entretanto, durante todo o experimento, os valores mantiveram-se próximos a neutralidade, apresentando valores mínimo e máximo de, respectivamente, 6,41 e 7,46.

Durante as 480 horas de experimento, pôde-se observar um aumento significativo nos valores de condutividade elétrica para todos os tratamentos (de 31,83 para até 96,83 $\mu S.cm^{-1}$). Às 96 horas DUG (65,83 $\mu S.cm^{-1}$) apresentou diferença significativa em relação a todos os tratamentos. Ao final do experimento houve diferença significativa ($p<0,05$) entre CG, DM e DU (82,44, 52,33 e 63,5 $\mu S.cm^{-1}$, respectivamente), os quais foram diferentes dos tratamentos contaminados com a presença de girinos (DMG e DUG, 95,33 e 96,83 $\mu S.cm^{-1}$, respectivamente). Os tratamentos contendo girinos apresentaram valores de condutividade mais elevados que os demais, com valores finais de 82,44 $\mu S.cm^{-1}$ para CG e 95,33 $\mu S.cm^{-1}$ para DMG, à exceção das 288 horas, quando CG teve seus valores diminuídos para 63,5 $\mu S.cm^{-1}$ e diferiu-se significativamente de DUG e DMG (91,17 e 76,89 $\mu S.cm^{-1}$, respectivamente). O aumento da condutividade pôde ser observado em relação ao aumento da dosagem de Vertimec® 18CE (DUG>DMG>CG).

Houve grande variação nas concentrações de oxigênio dissolvido entre os tratamentos durante o experimento, com valores mínimos de 0,325 $mg.L^{-1}$ no tratamento DUG às 96h, e máximo de 7,59 $mg.L^{-1}$ às 3h para o tratamento DU. Logo às 3 horas do início do experimento os tratamentos contendo girinos apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($p<0,05$), com valores mais baixos (5,08 $mg.L^{-1}$ em CG e 3,65 $mg.L^{-1}$ em DMG). Às 96 horas, todos os tratamentos tiveram níveis de oxigênio diferente do controle, que apresentou concentração de 3,78 $mg.L^{-1}$, exceto DU, que atingiu concentração de 4,3 $mg.L^{-1}$. Os tratamentos com girinos (CG e DMG) foram diferentes de todos os outros, menos entre si, apresentando valores mais baixos (1,9 e 1,98 $mg.L^{-1}$, respectivamente). Mesmo com a aeração constante dos tanques, essa variável atingiu níveis extremamente baixos, com o menor valor ocorrendo no tratamento DUG (0,325 mg. L^{-1}) às 96 horas, onde todos os girinos morreram com menos de 24 horas de experimento. Às 192 horas o controle apresentou redução na concentração de oxigênio dissolvido (1,26 $mg.L^{-1}$), equiparando-se aos tratamentos contendo girinos (CG e DMG, 1,79 e 2,13 mg. L^{-1}, respectivamente). À exceção deste momento, pôde-se perceber que os tratamentos com menor concentração de OD foram os tratamentos que contavam com esses organismos (valor médio de 2,7 $mg.L^{-1}$). Ao final do experimento o controle (4,49 mg. L^{-1}) continuou a apresentar valores de oxigênio dissolvido diferentes dos

tratamentos que continham girinos (valor médio de 2,07 mg. L^{-1}), enquanto o controle com girinos (2,53 mg. L^{-1}) apresentou diferença significativa em relação aos tratamentos com ausência de girinos (valor médio de 4,57 mg. L^{-1}). Vê-se claramente a divisão de dois grupos que diferiram-se entre si (com e sem girinos) em função da concentração de oxigênio dissolvido.

A partir das 96 horas de experimento até às 288 horas a turbidez de DUG diferiu-se significativamente de todos os tratamentos ($p<0,05$), apresentando os maiores valores (28 UNT). Ao final, a turbidez mostrou-se diferente somente entre o controle e DUG (9,0 e 9,3 UNT, respectivamente) e os tratamentos contendo girinos, CG e DMG (4,0 e 4,5 UNT, respectivamente). Os valores para essa variável foram mais baixos nos tratamentos contendo girinos (entre 3 e 7 UNT), do que para aqueles que não os continham (entre 5 e 13 UNT).

A concentração de clorofila *a* também foi diferente às 3 horas de experimento entre os grupos contendo girinos e aqueles que não continham, apresentando valor médio de 10,99 e 21,98 µg.L^{-1}, respectivamente. Às 96 horas o controle foi diferente de todos os tratamentos, exceto de DMG e DU, com valor de 13,95 µg.L^{-1}. O tratamento CG diferiu-se de todos, apresentando concentrações mais baixas que os demais tratamentos (5,58 µg.L^{-1}). DM também diferiu-se de todos, exceto de DUG, por apresentar valores mais altos (24,18 µg.L^{-1}). Às 192 horas as concentrações de clorofila *a* em DU e DUG foram diferentes de todos os outros tratamentos (29,76 e 352,01 µg.$L^{-1,}$ respectivamente), porém DUG apresentou concentração muito mais alta (cerca de 12 vezes). Às 288 horas somente DUG diferiu-se entre os tratamentos, porém na coleta seguinte (384 h) a concentração de clorofila *a* desse tratamento diminuiu para 49,29 µg.L^{-1}, fazendo com que se diferisse somente de CG e DMG (com valores de 3,72 e 4,65 µg.L^{-1}, respectivamente). Na última coleta ocorreu nova diminuição na concentração de clorofila *a* de DU (43,71 µg.L^{-1}), mas mesmos assim verificou-se diferença significativa em relação aos demais tratamentos. De acordo com a figura 23, observa-se que as concentrações de clorofila *a* foram maiores para os tratamentos contaminados durante todo o experimento, exceto para DMG, com valores máximos atingidos por DUG. Todos os valores apresentados referem-se às médias das três réplicas utilizadas no experimento.

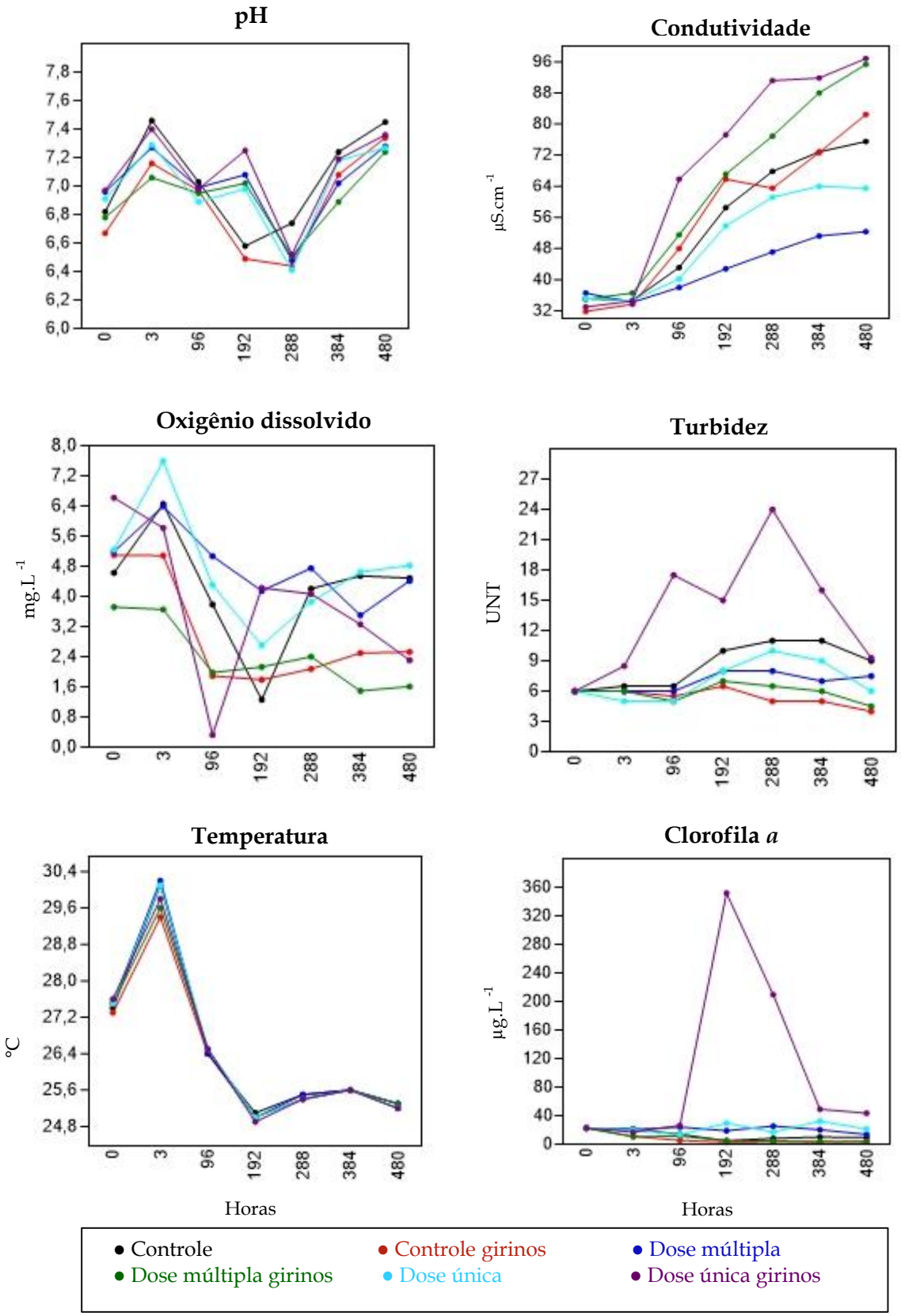


Figura 23. Valores das variáveis físicas e químicas de água dos mesocosmos obtidas *in situ* durante 480 horas de experimento com a espécie *L. castebeianus* nos diferentes tratamentos.

7.2.2 Formas fosfatadas e silicato reativo

Ao início do experimento (3 h) até a terceira coleta (192 h) CG apresentou diferença significativa entre todos os tratamentos para todas as formas fosfatadas (fosfato inorgânico - POI, fósforo total - PT e fosfato total dissolvido - PTD) – Figura 24. O controle obteve níveis de fosfato inorgânico diferente de todos os tratamentos às 3 horas de experimento (21,82 $\mu g.L^{-1}$), exceto para DU e DUG (21,36 e 23,17 $\mu g.L^{-1}$). Os tratamentos DM e DMG também foram diferentes de todos, menos entre si (36,1 e 34,28 $\mu g.L^{-1}$, respectivamente). Às 96 horas, o tratamento DUG apresentou aumento na concentração de todas as formas fosfatadas, diferindo-se estatisticamente dos demais tratamentos, situação que se manteve até a última coleta (480 h).

A partir da 192 horas, os tratamentos contendo girinos passaram a apresentar diferença significativa daqueles que não continham girinos para PTD e POI, mostrando distinção de grupos em função da presença ou ausência destes organismos, com os tratamentos contendo girinos apresentando inclusive diferença entre si. Essas condições mantiveram-se para PTD até o final do experimento, enquanto na última coleta, para POI, o tratamento CG (27,29 $\mu g.L^{-1}$) apresentou diferença significativa entre todos os tratamentos, exceto para DM e DU (20,88 e 20,98 $\mu g.L^{-1}$, respectivamente), que não continham girinos. PTD atingiu valores de 129,85 e 71,51 $\mu g.L^{-1}$ para os tratamentos que continham girinos e que não continham, respectivamente, e POI apresentou valores entre 98,55 e 37,4 $\mu g.L^{-1}$, sendo sempre mais elevados para os tratamentos com girinos.

Para P total, ao final do experimento (480h) foi observada diferença significativa somente para DMG (305,52 $\mu g.L^{-1}$) e entre C e DU (253,97 e 254,59$\mu g.L^{-1}$). O tratamento DUG apresentou diferença significativa em relação a todos os tratamentos para todas as formas fosfatadas.

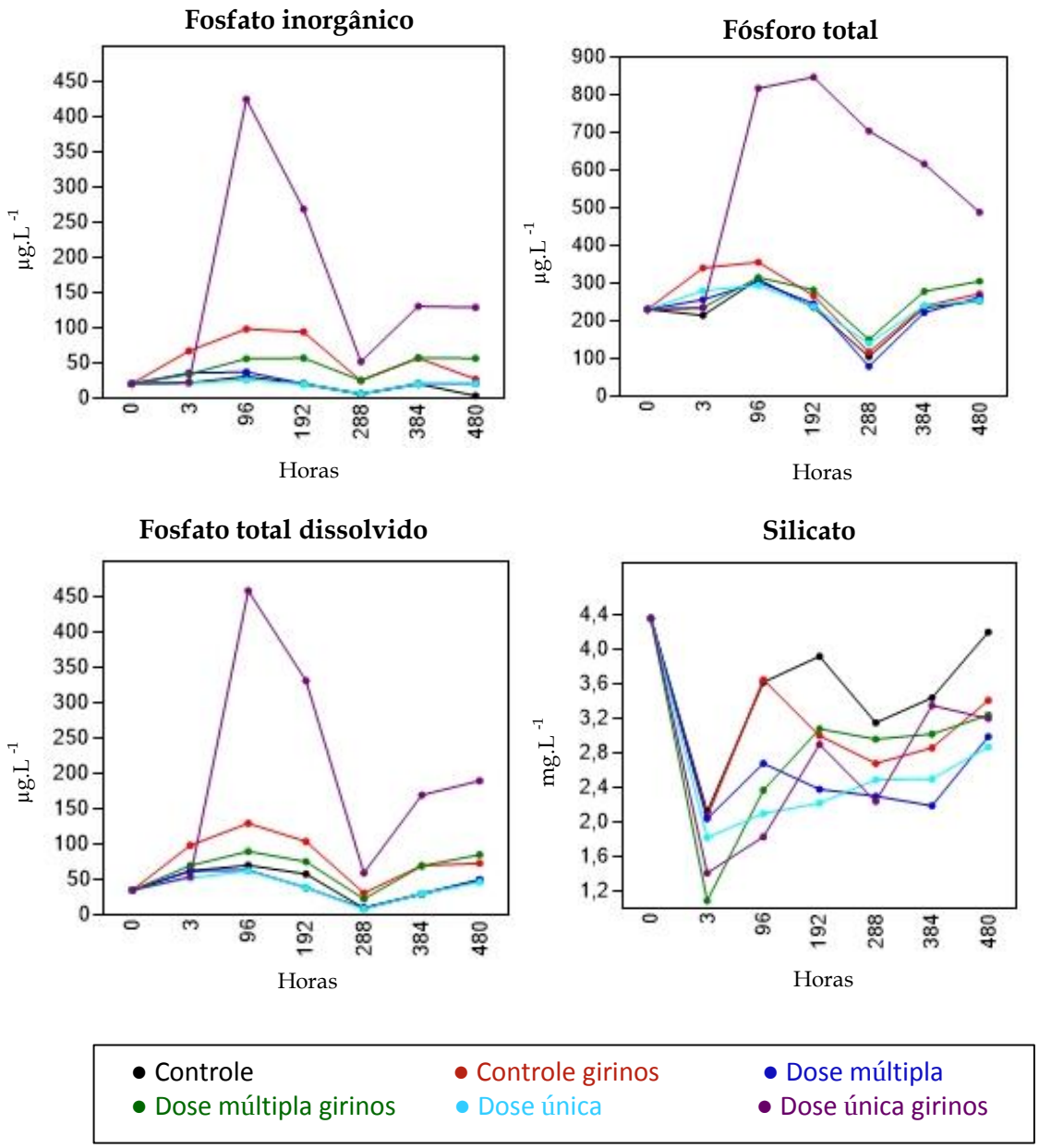


Figura 24. Valores das concentrações das formas fosfatadas (fosfato inorgânico, fósforo total e fosfato total dissolvido) e silicato obtidas a partir de amostras da água dos mesocosmos durante o experimento em campo (480 horas) nos diferente tratamentos.

Logo após a contaminação dos tanques (3 horas) o tratamento DMG apresentou concentrações de silicato muito baixas (1,09 mg.L^{-1}), diferindo-se significativamente de todos os tratamentos, exceto de DUG (1,41 µg.L^{-1}). Percebe-se que os tratamentos que foram contaminados e possuíam girinos foram os que sofreram maior redução na concentração de silicato após a primeira contaminação (de 4,36 para 1,09 µg.L^{-1}), seguido dos tratamentos que foram contaminados mas não continham girinos (de 4,36 para 2,04 e 1,82 µg.L^{-1} em DM e

DU, respectivamente). Às 96 horas os tratamentos não contaminados, C e CG, foram diferentes de todos, menos entre si, com concentrações muito mais altas que os demais tratamentos (3,62 e 3,65 mg.L$^{-1,}$ respectivamente). Às 192 horas houve diferença significativa entre o controle (3,92 µg.L^{-}1) e os tratamentos que não continham girinos (2,38 e 2,22 µg.L^{-1}, DM e DU, respectivamente), mostrando comportamento diferente das concentrações de silicato devido à intervenção do Vertimec® 18CE. Na coleta seguinte, às 288 horas, não houve nenhuma diferença significativa entre os tratamentos. Às 384 horas DM (2,19 µg.L^{-}1) foi diferente do controle e de DUG, que apresentou grande aumento na concentração de silicato (atingindo 3,35 mg.L^{-1}). A partir desse momento começa-se a perceber menores concentrações de silicato nos tratamentos com ausência de girino, contaminados pelo Vertimec® 18CE (DM e DU, 2,99 e 2,87 mg.L^{-1}, respectivamente), seguido dos contaminados contendo girinos (DMG e DUG, 3,24 e 3,20 mg.L^{-1}), e maiores valores nos tratamentos controle (C e CG, 4,2 e 4,41 mg.L^{-1}). Na última coleta o tratamento controle apresentou concentrações muito mais altas (4,2 mg.L^{-1}), diferindo-se de todos os tratamentos, exceto de CG (3,41 µg.L^{-1}).

7.2.3 Formas nitrogenadas

Os resultados obtidos para as formas nitrogenadas estão apresentados na Figura 25, verificando-se que logo às 3 horas após a primeira contaminação o tratamento DUG (em que houve maior dosagem do Vertimec® 18CE, e imobilização dos indivíduos) diferiu-se do controle em relação ao nitrato (com 17,89 µg.L^{-1} em DUG e 33,94 µg.L^{-1} em C), e dos tratamentos que haviam recebido menores doses de Vertimec® 18CE em relação ao nitrito ($p<0,05$) (DM e DMG, com 2,38 e 2,29 µg.L^{-1}, respectivamente, e 3,43 µg.L^{-1} em DUG). O tratamento DM já se diferia significativamente de todos os tratamentos em relação a concentração de nitrogênio total, com níveis mais altos que os demais tratamentos (0,79 µg.L^{-1}), tendo esses níveis diminuídos na coleta seguinte (0,163 µg.L^{-1}).

É possível perceber que após as 96 horas de experimento os tratamentos passaram a se dividir em dois grupos em função dos níveis de íon amônio e da presença ou ausência de girinos. Não houve diferença significativa entre os tratamentos contendo girinos (CG, DMG e DUG – valor máximo de 307,65 µg.L^{-1}), e nem entre os tratamentos sem girinos (C, DM e DU – com valor máximo de 41 µg.L^{-1}), porém houve diferença significativa entre os dois grupos, com essa diferença sendo ainda mais significativa até às 288 horas. A partir das 384 horas o tratamento DUG (o qual não tinha mais nenhum girino sobrevivente) passou a apresentar condições próximas ao controle e aos tratamentos sem girinos (309,1 µg.L^{-1}),

mostrando diferença significativa em relação a CG (565,91 µg.L^{-1}), mas não em relação a DU (237,79 µg.L^{-1}). O tratamento DM, o qual sofreu recontaminação na coleta das 288 horas, diferiu-se significativamente de todos os tratamentos, apresentando as concentrações mais baixas deste íon (144,78 µg.L^{-1}). Ao final do experimento (480 horas) os tratamentos com girinos continuaram apresentando diferença significativa entre os tratamentos sem girinos, tendo em vista que DUG não possuía mais girinos sobreviventes.

Às 96 horas o tratamento DUG sofreu aumento na concentração de nitrogênio total (0,98 µg.L^{-1}) e apresentou diferença significativa em relação a todos os tratamentos, assim como CG (0,677 µg.L^{-1}), que diferiu de todos, exceto do controle (0,607 µg.L^{-1}). Na coleta seguinte o tratamento DMG, que sofreu um aumento brusco na concentração deste nutriente (1,63 µg.L^{-1}), demonstrou diferença significativa entre todos os tratamentos. A partir das 288 horas até o final do experimento os tratamentos começaram a apresentar diferença significativa entre os tratamentos contendo girinos e os que não continham, dividindo-se em dois grupos em relação à concentração de N total, mostrando, assim como a amônia, diferença significativa entre esses dois grupos (com valores máximos de 1,98 µg.L^{-1} para tratamentos com girinos e 0,79 µg.L^{-1} sem girinos).

Para o nitrato, houve diferença significativa dos tratamentos DU e DUG às 192 horas em relação a todos os outros tratamentos, menos entre si (11,4 e 12,9 µg.L^{-1}, respectivamente), sendo diferente na coleta seguinte apenas do tratamento CG, o que demonstra a busca da estabilização em relação a esses níveis. Nesse mesmo momento (192 h) e na coleta seguinte (288 h) os tratamentos sem contaminação (C e CG, 3,24 e 3,02 µg.L^{-1}, respectivamente) foram diferentes dos tratamentos contaminados DM, DU e DUG (1,83, 2,22 e 1,82 µg.L^{-1}, respectivamente) em relação às concentrações de nitrito, mas não do tratamento DMG (2,71 µg.L^{-1}), que apresentou diferença significativa em relação ao seu correspondente, DM e a DUG, o que também ocorreu às 384h. O tratamento CG teve as concentrações de nitrito e nitrato aumentadas a partir das 384 horas (25,76 e 46,76 µg.L^{-1}, respectivamente), diferindo-se significativamente de todos os tratamentos até a última coleta, exceto para o nitrato, onde às 480h o tratamento CG (354,37 µg.L^{-1}) não mais diferia significativamente do controle (146,45 µg.L^{-}1) e DMG (201,175 µg.L^{-1}).

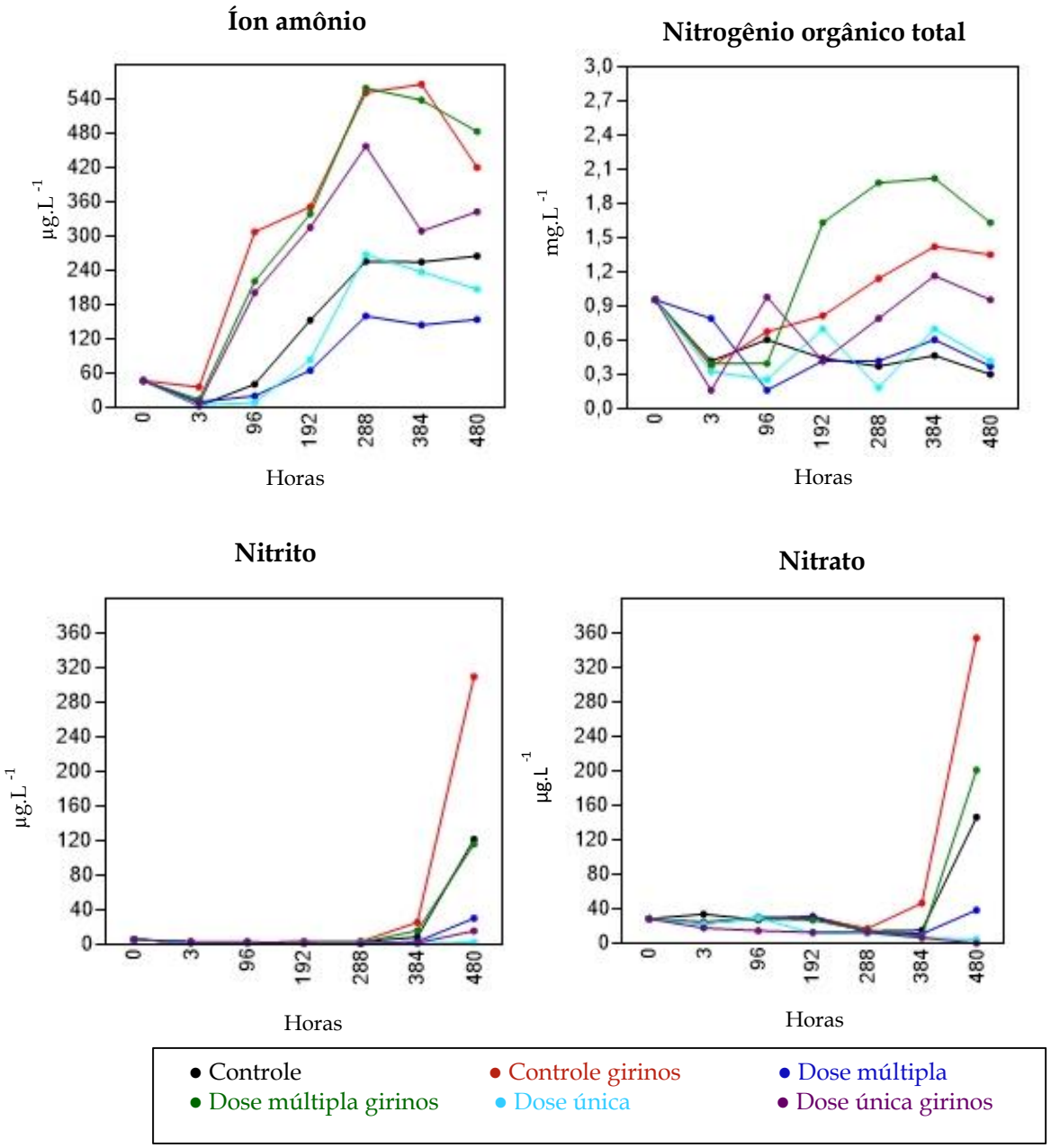


Figura 25. Valores das concentrações das formas nitrogenadas (íon amônio, nitrogênio orgânico total, nitrito e nitrato) obtidas a partir de amostras de água provenientes dos mesocosmos durante o período experimental (480 horas) em cada tratamento.

7.2.4 Análise de componentes principais

Os resultados das variáveis físicas, químicas e biológicas obtidos foram analisados através da análise estatística de componentes principais (ACP), verificando-se que o componente 1 indicou 32,22% da variabilidade dos dados, enquanto o componente 2 indicou 23,55%, o que resultou em uma importância de 55,77% (Figura 26), sendo representativos deste estudo por explicarem o maior percentual da variabilidade. O componente 1 esteve representado pelas formas nitrogenadas, fosfatadas, silicato, condutividade e turbidez por apresentarem maiores cargas para esse eixo, e o componente 2 pelo oxigênio dissolvido, pH, temperatura e clorofila *a* (Apêndice B).

Na figura 26 verifica-se a formação de gradiente temporal e espacial por essas variáveis, analisadas em intervalos de 96 horas, com uma medida intermediária às 3 horas, dividida nos dois eixos principais, com o agrupamento de variáveis que possuem inter-relação e da similaridade de cada tratamento ao longo do experimento em função destas. Pode-se observar a distinção de quatro grupos durante todo o experimento, inicialmente distribuídos de forma temporal e, posteriormente, espacial.

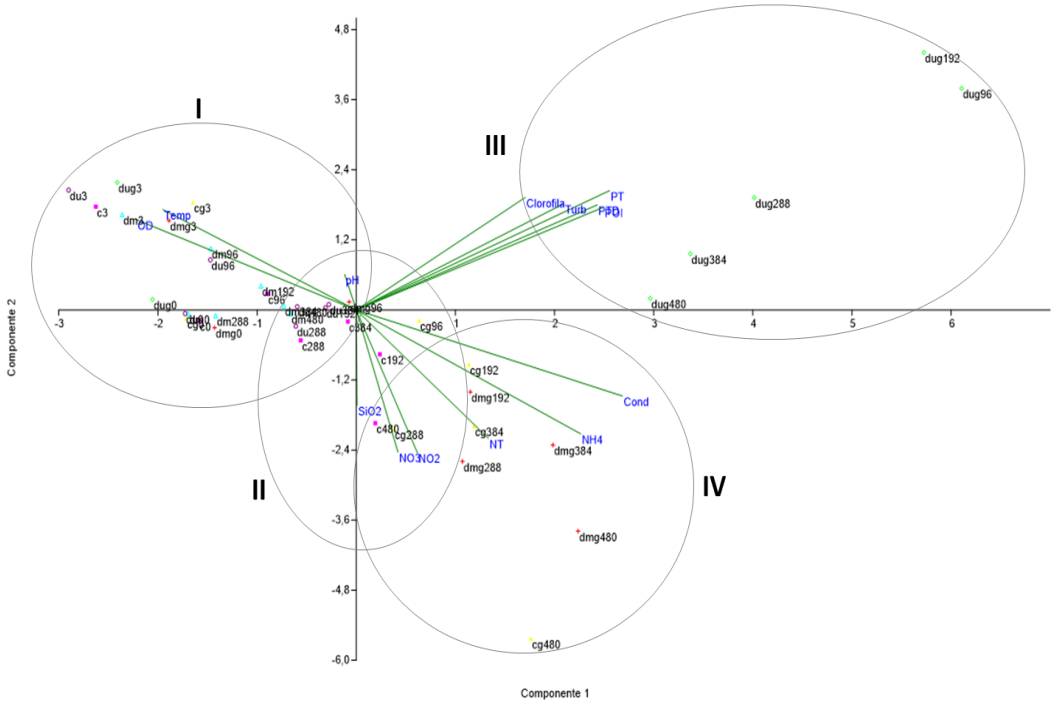


Figura 26. Dispersão dos escores das variáveis limnológicas consideradas e dos tratamentos ao longo do período de amostragem, representados nos dois primeiros eixos, sendo C: controle; CG: controle com girinos, DM: dose múltipla; DMG: dose múltipla com girinos; DU: dose única; DUG: dose única com girino; Temp: temperatura; OD: oxigênio dissolvido; Turb: turbidez; PT: fósforo total; PTD: fosfato total dissolvido; POI: fosfato inorgânico; NH4: iôn amônio; NT: nitrogênio total; NO2: nitrito; NO3: nitrato; SiO_2: silicato.

O momento inicial (0 e 3 horas) é representado pelo grupo I, definido temporalmente, com todos os tratamentos relacionados às mesmas variáveis (temperatura, oxigênio dissolvido e pH). Os tratamentos que foram contaminados, mas não contavam com a presença de girinos (DM e DU), continuaram relacionados às mesmas variáveis iniciais até o final do experimento, enquadrando-se neste grupo. A partir das 96 horas os valores se dispersaram, fazendo com que os tratamentos mostrassem comportamentos mais discrepantes entre si, sob a influência de variáveis distintas, sendo distribuídos espacialmente.

O controle passou a ser mais influenciado pelo pH, nitrito, nitrato e silicato (grupo II), o que pode ser um indício da recuperação do sistema. O tratamento DUG esteve fortemente relacionado às formas fosfatadas (fósforo total, fosfato total dissolvido e fosfato inorgânico), turbidez e clorofila *a* (grupo III), estando relacionado com a produtividade primária. Os tratamentos contendo girinos (CG e DMG) sofreram influência das formas nitrogenadas (nitrito, nitrato, amônia e nitrogênio total), silicato e condutividade (grupo IV). A condutividade elétrica pode ser um reflexo do aumento no número de partículas dissolvidas e de nutrientes na água, influenciados principalmente pela presença dos girinos nos mesocosmos.

A Figura 27 demonstra distribuição temporal das alterações sofridas pelos tratamentos em relação à concentração de nutrientes e das variáveis físicas e químicas durante as 480 horas de experimento. É possível verificar que os tratamentos com a presença de girinos apresentaram maior dinâmica nas variáveis, atingindo diferentes zonas de influência, enquanto os tratamentos que não contavam com a inserção desses organismos limitaram-se à influência das mesmas variáveis iniciais. Observa-se diferença de comportamento entre o tratamento controle e àqueles que não continham girinos, mas foram expostos ao Vertimec® 18CE (DM e DU), evidenciando a influência do agrotóxico nas condições físicas e químicas dos sistemas.

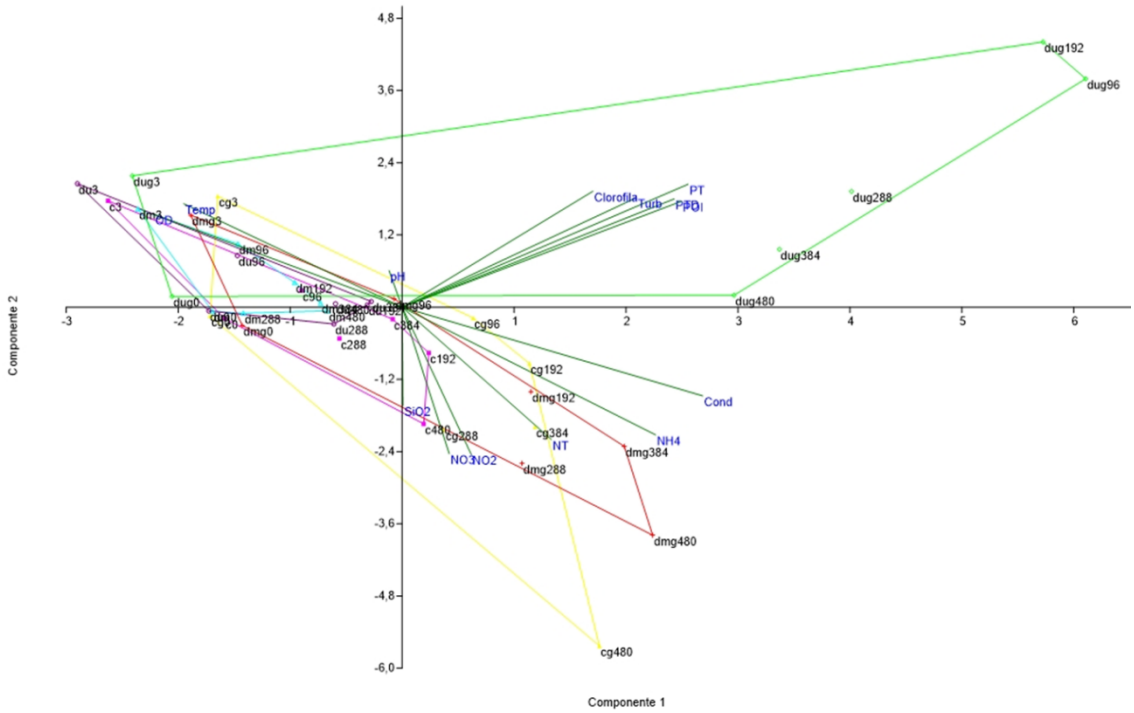


Figura 27. Distribuição temporal das variáveis físicas e químicas durante o experimento em mesocosmos obtida a partir da análise de componentes principais, e definição de grupos formados pelos tratamentos. C: controle; CG: controle com girinos, DM: dose múltipla; DMG: dose múltipla com girinos; DU: dose única; DUG: dose única com girino; Temp: temperatura; OD: oxigênio dissolvido; Turb: turbidez; PT: fósforo total; PTD: fosfato total dissolvido; POI: fosfato inorgânico; NH4: iôn amônio; NT: nitrogênio total; NO2: nitrito; NO3: nitrato; SiO2: silicato.

7.2.5 Metais biodisponíveis na água

Na tabela 7 apresentam-se os níveis máximos de metais permitido em águas de rio classe 1, que são águas destinadas ao abastecimento para consumo humano, segundo a resolução CONAMA 357 de 2005, seguido dos resultados encontrados nesse trabalho.

Tabela 7 - Concentração de metais encontrada em amostras de água dos mesocosmos (em $mg.L^{-1}$) para cada tratamento em comparação aos valores máximos estabelecidos pela CONAMA 357/05 para águas de classe 1. Os tratamentos em que os números não estão expressos estiveram abaixo do limite de detecção do método (Apêndice B), e aqueles em destaques foram superiores ao valores comparados. C: controle; CG: controle com girinos, DM: dose múltipla; DMG: dose múltipla com girinos; DU: dose única; DUG: dose única com girino

Metais	CONAMA 357/05	Início	Meio - 288 horas						Final - 480 horas					
			C	CG	DM	DMG	DU	DUG	C	CG	DM	DMG	DU	DUG
cobre	0,009	-	0,001	0,004	0,023	0,006	0,028	0,023	0,001	0,014	0,016	0,016	0,026	0,130
cádmio	0,001	0,001	-	-	0,014	0,006	0,020	0,001	0,007	0,019	0,013	0,026	0,021	0,057
cromo	0,05	0,052	0,019	0,030	0,068	0,042	0,079	0,099	-	-	-	-	-	-
chumbo	0,01	-	-	-	-	-	0,010	-	0,023	-	0,023	0,063	0,013	-
ferro	0,3	-	-	-	-	-	-	0,170	-	-	-	-	-	-
manganês	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
magnésio		1,041	1,207	0,898	0,835	0,979	0,840	0,936	1,332	1,072	0,760	1,130	0,865	1,062
zinco	0,18	1,040	1,206	0,897	0,834	0,978	0,839	0,935	1,274	1,014	0,702	1,073	0,808	1,005
níquel	0,025	1,027	1,193	0,884	0,826	0,965	0,831	0,922	-	-	-	-	-	-
cobalto	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
alumínio	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Pôde-se observar que ao início do experimento somente os valores de zinco e níquel encontravam-se acima do estabelecido na legislação (1,04 $mg.L^{-1}$ e 0,025 $mg.L^{-1}$, respectivamente). No momento anterior à contaminação (288 horas), os tratamentos contaminados que não continham girinos (DM, DU e DUG) apresentaram aumento nas concentrações de cobre (0,023, 0,028 e 0,023 $mg.L^{-1}$, respectivamente) e cromo (0,068, 0,079 e 0,099 $mg.L^{-1}$, respectivamente). Os níveis de cádmio tiveram grande aumento nos tratamentos DM, DMG e DU (0,014, 0,006 e 0,02 $mg.L^{-1}$, respectivamente). Os valores de zinco (entre 0,808 e 1,274 $mg.L^{-1}$) e níquel (entre 0,826 e 1,193 $mg.L^{-1}$) mantiveram-se acima dos valores permitidos, com menores valores para os tratamentos com girinos e contaminados.

Ao final do experimento (480 horas) cádmio, cobre, chumbo e zinco apresentaram valores acima do permitido em todos os tratamentos, à exceção do cobre que não ultrapassou esses valores no controle, e do chumbo, com valores abaixo do limite de detecção (Apêndice B) para CG e DUG.

7.2.6 Índice de Estado Trófico

Os valores obtidos para o grau de trofia com base na concentração de fósforo total demonstraram que todos os tratamentos mantiveram-se em condições hipereutróficas durante todo o experimento. Para a clorofila *a* verificou-se incialmente que todos os tratamentos encontravam-se em condições eutróficas, o que se manteve durante todo o experimento para os tratamentos DM e DU. O tratamento DUG foi o que obteve maior variação no IET em função da concentração de clorofila *a*, sendo incialmente, assim como os demais tratamentos, eutrófico, passando para hipereutrófico (com aumento dos índices) e estabilizando-se como supereutrófico. Os tratamentos C, CG e DMG apresentaram-se como mesotrófico a partir das 3 horas de coleta (exceto C, que apresentou essa condição a partir das 96h), conforme apresentado na Figura 28.

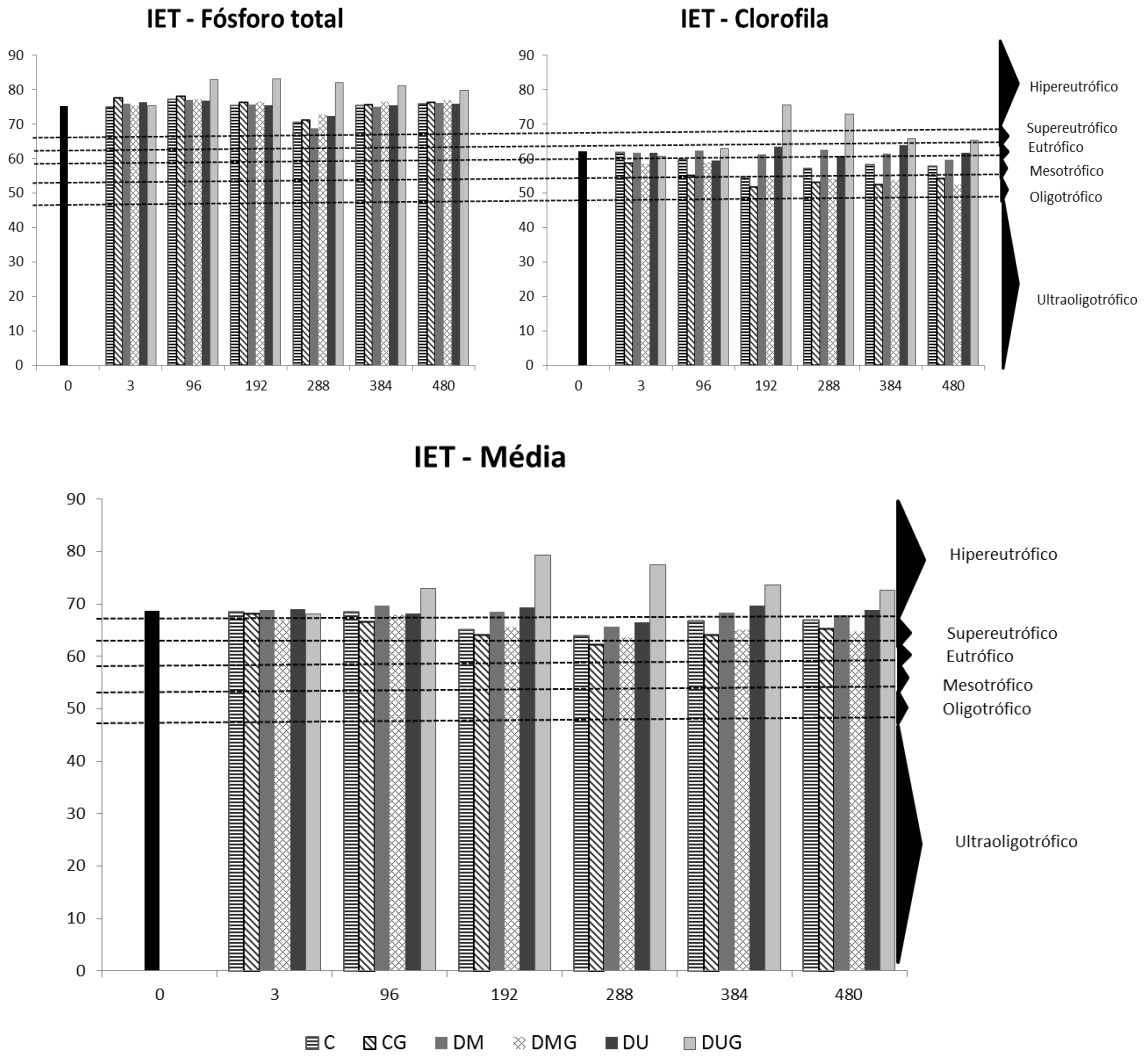


Figura 28. Classificação dos mesocosmos em relação ao grau de trofia calculado em função das concentrações de fósforo total, clorofila *a* e do valor médio durante período de estudo, de acordo com os índices desenvolvidos para reservatório, segundo o Índice de Carlson, modificado por Lamparelli (2004). IET: Índice de Estado Trófico; C: controle; CG: controle com girinos; DM: dose múltipla; DMG: dose múltipla com girinos; DU: dose única; DUG: dose única com girinos.

O resultado da média aritmética demonstrou que até às 96 horas todos os tratamentos encontravam-se em condições extremas em relação ao grau de trofia (hipereutrófico), o que manteve-se para os tratamentos DM, DU e DUG. Os demais tratamentos tiveram pequena diminuição dos valores, atingindo características de ambientes supereutrófico. Percebe-se que os tratamentos que foram contaminados e que não continham girinos mantiveram valores mais altos, embora não tenha sido encontrada diferença significativa entre os tratamentos.

Segundo CETESB (2013), os casos em que o índice do estado trófico calculado pela clorofila *a* é inferior ao índice calculado pelo fósforo total indicam que o processo de eutrofização é influenciado por fatores ambientais. Para um processo de eutrofização plenamente estabelecido, o índice do fósforo total deve coincidir com o da clorofila *a*. Sendo assim, os dados obtidos no presente estudo indicam a forte influencia das variáveis ambientais no experimento.

7.2.7 Variáveis físicas e químicas do sedimento

No sedimento foram feitas análises de fósforo total (PT), nitrogênio total (NT) e matéria orgânica (MO) no início e final do experimento, e os resultados obtidos constam na Figura 29. Para o fósforo total, após as 480 horas, houve diferença significativa ($p<0,05$) do controle (0,915 $\mu g.g^{-1}$) e de CG (1,01 $\mu g.g^{-1}$) em relação a DM (1,53 $\mu g.g^{-1}$), DMG (1,72 $\mu g.g^{-1}$) e DUG (1,67 $\mu g.g^{-1}$). Nenhum tratamento mostrou diferença em relação ao valor inicial de 1,36 $\mu g.g^{-1}$ ($p>0,05$). Para o nitrogênio total observou-se diferença de todos os tratamentos em relação ao controle (0,03%), e todos os tratamentos contaminados demonstraram diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,04% - $p<0,05$). Os tratamentos DM (0,11%) e DMG (0,13%) foram diferentes de DU (0,08%) e DUG (0,07%). Em relação ao percentual de matéria orgânica no sedimento, houve diferença somente entre o controle (6,31%) e DU (1,34%), com nenhum tratamento diferindo-se do valor inicial (6,79%).

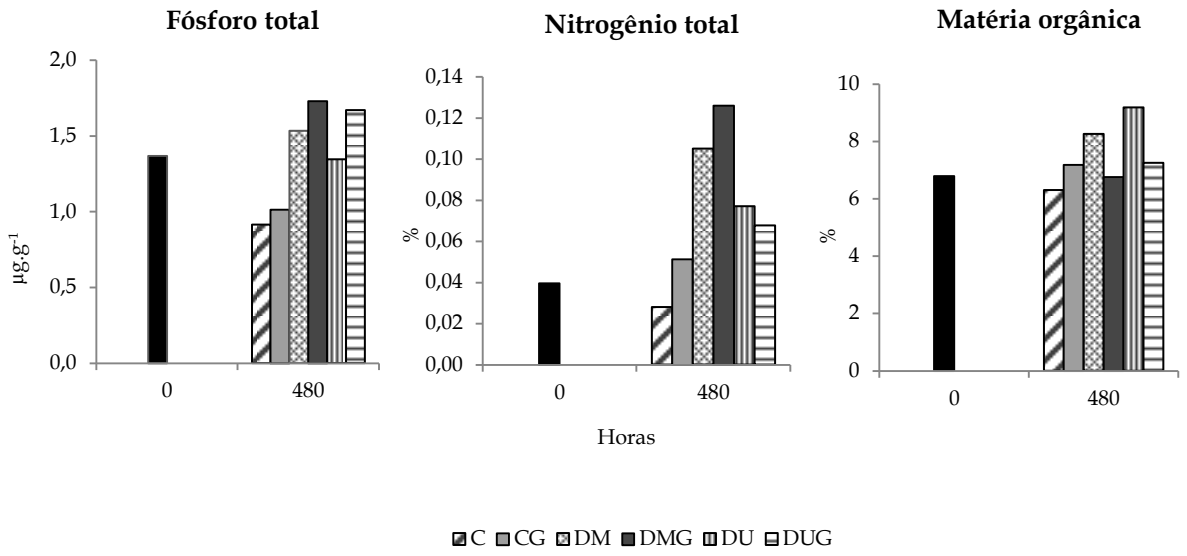


Figura 29. Valores das concentrações de fósforo total, nitrogênio total e matéria orgânica obtidas em amostras de sedimento coletadas nos mesocosmos no período inicial (0 h) e final do experimento (480 h). (C: controle; CG: controle com girinos; DM: dose múltipla; DMG: dose múltipla com girinos; DU: dose única; DUG: dose única com girinos).

7.2.8 Metais biodisponíveis no sedimento

De acordo com os valores obtidos para metais em amostras de sedimento dos mesocosmos, e em comparação com o trabalho de Nascimento e Mozeto (2008) – Tabela 8, o único metal que esteve em concentração elevada no sedimento foi o zinco, com concentração mínima de 102,69 $mg.kg^{-1}$ no controle e máxima de 200,48 $mg.kg^{-1}$ em DU, com os maiores valores nos tratamentos contaminados (entre 155,29 $mg.kg^{-1}$ em DM e 200,48 $mg.kg^{-1}$ em DU).

Em comparação aos valores da CONAMA 454/2012 nenhum dos valores atingiu aqueles encontrados para o nível 2, em que ocorre a maior probabilidade de efeitos adversos à biota. Os tratamentos contaminados apresentaram concentrações acima do permitidos para o nível 1 somente para cobre e zinco. As concentrações de cádmio estiveram acima do limiar permitido para o nível 1 para todos os tratamentos, exceto para CG.

Tabela 8 - Valores das concentrações de metais biodisponíveis (em $mg.kg^{-1}$) encontrados em amostras sedimento coletadas ao início (0 h) e final (480 h) do experimento para cada tratamento. (C: controle; CG: controle com girinos; DM: dose múltipla; DMG: dose múltipla com girinos; DU: dose única; DUG: dose única com girinos).

Metais	Nascimento e Mozeto (2008)	CONAMA 454/12		Início	Final - 480 horas					
		Nivel1*	Nivel2*		C	CG	DM	DMG	DU	DUG
cobre	62	35,7	197	24,08	21,69	26,53	39,42	38,21	45,12	38,81
cádmio	0,21	0,6	3,5	0,56	0,80	0,58	0,79	1,82	1,71	1,75
cromo	96	37,3	90	2,17	2,91	1,94	2,66	3,33	3,28	3,74
chumbo	52	35	91,3	12,00	12,50	20,33	15,17	12,00	13,33	15,42
zinco	94	123	315	77,87	102,69	115,72	155,29	179,59	200,48	186,68
níquel	45	18	35,9	0,93	0,88	3,33	4,36	5,03	3,08	5,41
cobalto	24	-		-	-	-	0,35	0,15	-	0,53
alumínio	-			1226,75	1058,67	1302,83	1532,75	1646,58	1756,58	1782,83
ferro	-			2523,25	2725,58	3311,33	4620,67	4844,83	4840,17	4050,25
manganês	-			874,00	468,08	937,00	1654,83	1438,67	1900,67	1656,25
magnésio	-			32,61	29,48	28,75	27,55	32,81	24,22	24,30

*Nível 1: limiar abaixo do qual há menor probabilidade de efeitos adversos à biota;

* Nível 2: limiar acima do qual há maior probabilidade de efeitos adversos à biota.

7.2.9 Desenvolvimento e sobrevivência dos girinos

Após a adição dos girinos de rã-touro aos mesocosmos (3 horas) observou-se alteração do comportamento dos indivíduos submetidos ao tratamento DUG, com redução da atividade natatória. Posteriormente, em um período inferior a 24 horas, observou-se a mortalidade de todos os indivíduos pertencentes a este tratamento (100%), os quais foram retirados dos mesocosmos.

Para atestar a degradação da abamectina (princípio ativo do Vertimec® 18CE) durante esse período, após a retirada dos girinos mortos foram adicionados 20 girinos em cada réplica do tratamento DUG, sem qualquer alteração das condições em que se encontravam. Porém, após 24 horas da inserção do novo lote de girinos (48 horas do início do experimento) foi observada novamente a morte de todos os indivíduos, demonstrando que, ou a degradação da abamectina não ocorreu no período observado, ou que os metabólitos secundários gerados pela sua degradação foram responsáveis por efeitos tão tóxicos aos girinos de rã-touro quanto à concentração inicial de Vertimec® 18CE adicionada a cada mesocosmo. Nos demais tratamentos o percentual de sobrevivência foi elevado durante todo o experimento (Figura 30), sendo de 100% para DMG, e de 99,29% para CG, não havendo diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,05$).

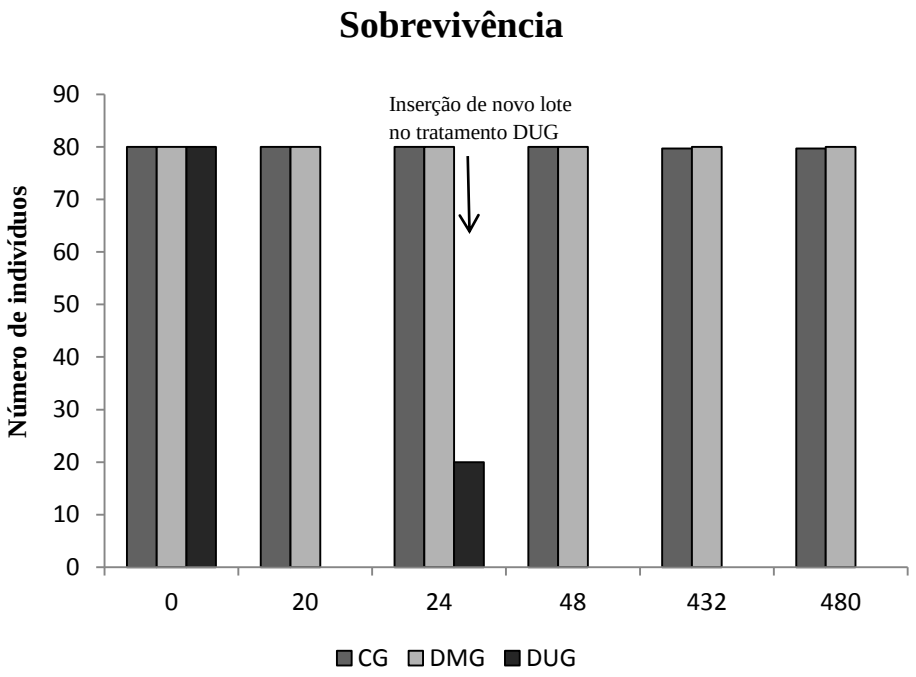


Figura 30. Sobrevivência dos girinos durante o período experimental em mesocosmos (480 horas) para cada tratamento. CG: controle com girinos; DMG: dose múltipla com girinos; DUG: dose única com girinos.

Em relação ao desenvolvimento dos girinos, nos tratamentos que apresentaram sobreviventes até o final do período experimental (CG e DMG) pôde-se observar diferença estatística significativa entre os estágios 32-37G e 40-41G ($p<0,05$), com maior percentual de indivíduos mais desenvolvidos no tratamento controle, demonstrando que nesse tratamento os girinos estavam em estágio de desenvolvimento mais avançado do que no tratamento contaminado (Figura 31).

Embora não exista diferença significativa entre os demais estágios de desenvolvimento, observa-se que o controle apresentou maior número de indivíduos metamorfoseados do que DMG, ou seja, os indivíduos submetidos a presença do agrotóxico Vertimec® 18CE demonstraram maior duração do período larval (tempo até a metamorfose) do que aqueles que estiveram em condições mais próximas ao ideal. A proporção de indivíduos metamorfoseados foi de 4,6% para o tratamento controle e de 0% para DMG.

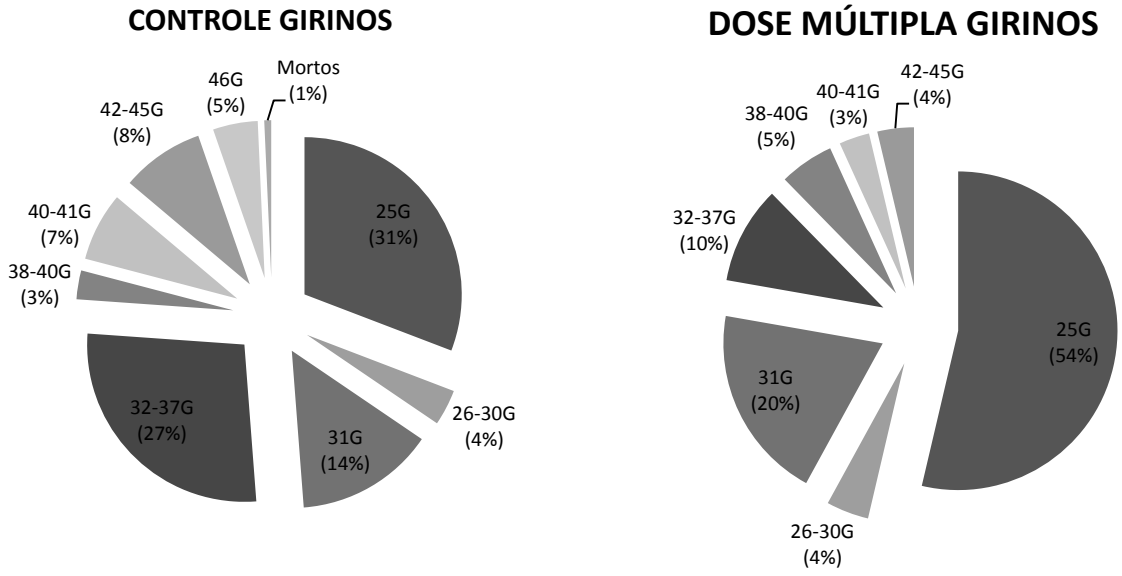


Figura 31. Percentual de girinos de *L. catesbeianus* em cada estágio de desenvolvimento para cada tratamento ao final do período experimental em campo. CG: controle com girinos; DMG: dose múltipla com girinos.

Foi observada perda de peso (média de 0,45 g para o controle e 0,71 g para DMG) e comprimento (média de 1,85 cm para CG e 0,41 cm para DMG) para todos os girinos, de ambos os tratamentos, submetidos ao experimento em mesocosmos em comparação às medidas iniciais calculadas a partir de girinos mantidos em laboratório anteriormente ao início do experimento.

A relação do peso final e inicial dos girinos dentro de cada tratamento pode ser observada na figura 32. De acordo com a análise estatística, somente o tratamento contaminado apresentou diferença significativa ($p<0,05$) em relação ao peso inicial, e também em relação a CG. Observa-se que a perda de massa corpórea foi mais relevante para os girinos que se encontravam em contato com o agrotóxico (taxa de crescimento (TC) de -0,54%) do que para o controle (TC de -0,33%).

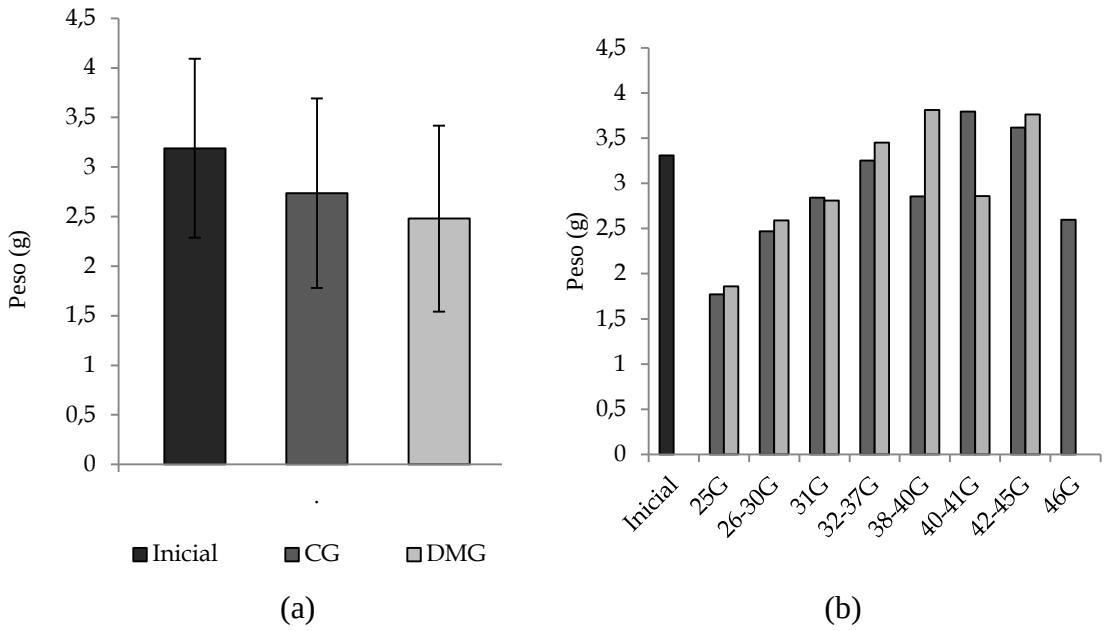


Figura 32. (a) Comparação entre peso do lote inicial de girinos de *L. catesbeianus* e o peso médio de todos os indivíduos sobreviventes ao final do experimento *in situ* (480 h) em cada tratamento, com o respectivo desvio padrão. (b) Comparação do peso médio dos girinos de *L. catesbeianus* dentro de cada estágio de desenvolvimento em cada tratamento do experimento *in situ* ao final das 480 horas do período experimental. (CG: controle com girinos; DMG: dose múltipla com girinos).

Em comparação às medidas feitas para cada tratamento em cada estágio de desenvolvimento, observa-se em quase todos os estágios maiores valores para os girinos do tratamento contaminado com Vertimec® 18CE, apesar de não haver diferença estatística significativa.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para o comprimento (Figura 33a), embora, dentro de cada estágio, é possível perceber, assim como nos valores para peso, que o tratamento contaminado possui os maiores valores (Figura 33b).

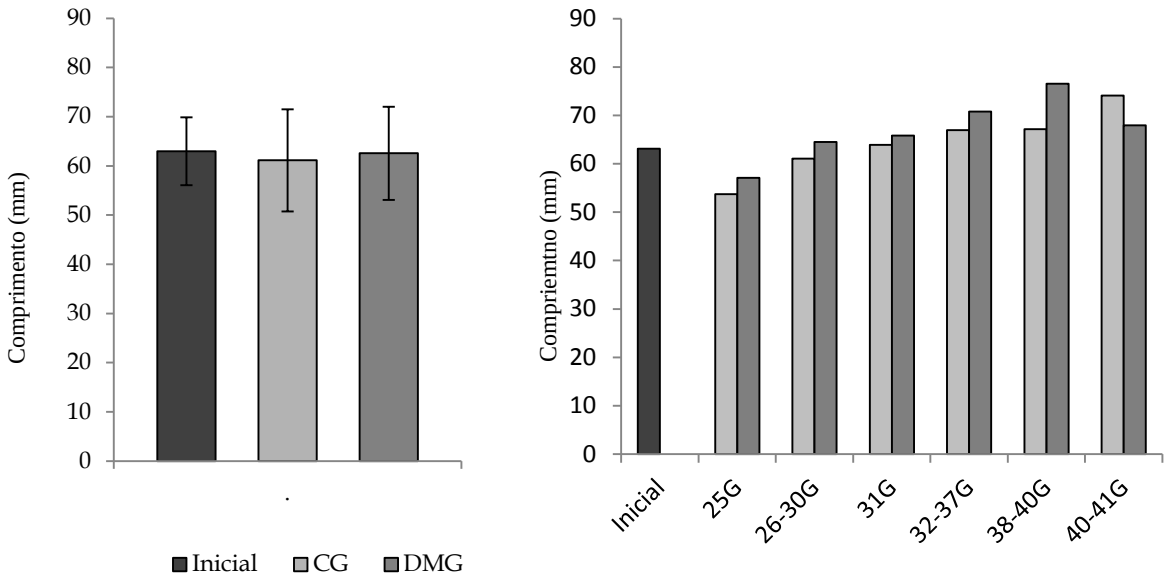


Figura 33. (a) Comparação entre o valor médio do comprimento dos girinos de *L. catesbeianus* peretencentes ao lote inicial (anteriormente ao início do experimento) e os valores médios do comprimento total dos girinos sobreviventes em cada tratamento ao final do período experimental em mesocosmos (480 h). (b) Comparação do valor médio do comprimento dos girinos de *L. catesbeinus* dentro de cada estágio de desenvolvimento em cada tratamento do experimento *in situ* ao final da 480 horas de experimento. (CG: controle com girinos; DMG: dose múltipla com girinos).

Na tabela 9 estão apresentados os resultados obtidos em cada tratamento, verificand-ser maior desenvolvimento nos girinos de *L. castebeianus* no tratamento em que não houve contaminação (CG), à exceção do comprimento, em que os indíviduos sofreram menor variação no valor final, atingindo maior tamanho médio no tratamento contaminado (DMG).

Tabela 9 - Valores dos *end points* analisados ao final do período experimental em mesocosmos para girinos de *L. catesbeianus*, onde CG: controle com girinos; DMG: dose múltipla com girinos; DUG: dose única com girinos.

	Girinos metamorfoseados	**Sobrevivência**	**Taxa de crescimento**	**Variação de peso**	**Variação de comprimento**
CG	4,6%	99,29%	-0,33%	- 0,45g	-1,85mm
DMG	0%	100%	-0,54%	-0,71g	-0,41mm
DUG	-	0%	-	-	-

8. DISCUSSÃO

8.1 Análise dos efeitos do Vertimec® 18CE em *L. catesbeianus* por meio de testes laboratoriais agudos e crônicos

Os testes agudos realizados com girinos de *L. catesbeianus* em dois diferentes estágios de desenvolvimento, expostos ao agrotóxico Vertimec® 18CE, demonstraram que existe diferença de sensibilidade em relação ao grau de desenvolvimento dos girinos de rã-touro para este produto. Os girinos em fase de desenvolvimento mais avançado (25G) apresentaram sensibilidade cerca de 2,5 vezes menor do que as fases anteriores, recém eclodidos.

Pelos resultados da pesquisa desenvolvida por Ossana et al. (2010), utilizando cobre como substância de referência, também se verifica maior sensibilidade de girinos de rã-touro em estágios menos desenvolvidos (25-26G) quando estes valores são comparados àqueles obtidos por Ferreira et al. (2004), que utilizou girinos nos estágio 31-37G, e por Marcantonio (2005), que avaliou os efeitos do cobre sobre girinos no estágio 31G. Os valores encontrados por Ossana et al. (2010) para a sensibilidade de girinos de rã-touro ao cobre foi de 3,6 mg de $Cu^{2+}.L^{-1}$ de cobre, enquanto Ferreira et al. (2004) e Marcantonio (2005) obtiveram 2,4 e 2,2 mg de $Cu^{2+}.L^{-1}$, respectivamente.

Rohr et al. (2010), ao avaliar a susceptibilidade de girinos de duas espécies de anfíbio (*Bufo americanus* e *Lithobates clamitans*), inicialmente entre os estágio 24 e 37 de Gosner, à infecção por larvas de trematódeos (Platyelminthes), concluiu que a sobrevivência dos girinos foi significativamente afetada pelo estágio de desenvolvimento dos indivíduos. A tolerância à infecção aumentou proporcionalmente ao estágio de desenvolvimento. Girinos mais desenvolvidos e maiores possuíam maior resistência a infecções do que em estágios mais precoces e menores, resultando em maior sobrevivência. Os autores concluíram que girinos mais jovens investem mais em mecanismos de resistência, que é o controle do patógeno através da redução da carga parasitária, enquanto aqueles em estágio mais avançado investem mais em mecanismos de tolerância, que é o controle dos danos causados pelo parasitas.

No trabalho de Ortiz-Santaliestra et al. (2006), em que girinos de *Discoglossus galgoni* foram expostos à mesma concentração de nitrato de amônia, os indivíduos pertencentes ao estágio 24G apresentaram 6% de mortalidade, enquanto girinos no estágio 21 G apresentaram mortalidade superior a 50%.

A maioria dos estudos ecotoxicológicos com anfíbios é realizado quando as brânquias, responsáveis pelas trocas iônicas nos girinos tornam-se internas, ou seja, entre os estágios 25 e 32 de Gosner (1960). Entretanto, muitas vezes esses estágios não devem ser considerados entre os mais sensíveis da fase aquática, pois as larvas menores possuem superfície de contato

superior em relação ao seu volume, o que pode resultar em maior absorção de contaminantes em relação à massa corporal (ORTIZ-SANTALIESTRA et al., 2006), fazendo com que haja maior sensibilidade nesse estágio. Além disso, como as brânquias ainda são externas nos girinos em estágios iniciais de desenvolvimento (GOSNER, 1960), supõe-se que esses estágios estejam mais sujeitos a intoxicação do que estágios posteriores, que possuem as brânquias cobertas pela pele, já que além das trocas iônicas as brânquias podem ser responsáveis também pela absorção de componentes tóxicos (POUGH et al., 2008). A internalização das brânquias e a espessura progressiva da pele durante o desenvolvimento larval pode dar maior proteção contra alterações osmorregulatórias e explicar a maior tolerância das fases larvais mais desenvolvidas (ORTIZ-SANTALIESTRA et al., 2006).

Entretanto, no estudo de McGrath e Alexander (1979), em que girinos de rã-touro foram expostos a quantidades de óleo combustível esperadas de serem encontradas em águas após derramamento de petróleo, a mortalidade e os efeitos subletais foram maiores em girinos que se encontravam nos estágios finais de desenvolvimento. No trabalho de Howe et al. (1998), com girinos de *Lithobates pipiens* e *Bufo americanus* em diferentes estágios de desenvolvimento (29 e 40G), os autores concluíram que os estágios mais jovens foram mais tolerantes a atrazina. Esses resultados podem ser justificados pelas mudanças fisiológicas que ocorrem nos estágios próximos ao clímax metamórfico, as quais tornam estes estágios tão susceptíveis a alterações ambientais quanto os estágios iniciais de desenvolvimento. Sparling et al. (2010) apontam estudos que indicam aumento dos efeitos negativos (como atraso no desenvolvimento e sobrevivência) sofridos por espécies anfíbias durante o processo de metamorfose, onde há alta demanda energética e fisiológica, tornando os organismos mais sensíveis a compostos tóxicos.

A rã-touro também foi utilizada no trabalho de Paetow et al. (2013) por ser resistente a ao fungo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis*, responsável pelo declínio das populações de anfíbios, sendo capaz de hospedá-lo nos dois estágios de vida (aquático e terrestre) sem sofrer infecções letais. *B. dendrobatidis* atinge o tecido epitelial de anfíbios adultos e o tecido queratinizado dos estágios larvais, podendo afetar a sobrevivência de diversas espécies de anuros e salamandras (GERVASI et al., 2013; PAETOW et al., 2013). Paetow et al. (2013) testaram a susceptibilidade de girinos de *L. catesbeianus* ao *B. dendrobatidis* após serem expostos a concentrações não letais de dois agrotóxicos (atrazina e glifosato), constatando que não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação ao peso, comprimento e estágio de desenvolvimento. Em exposições únicas (somente fungo ou somente agrotóxico) não houve mortalidade, porém as exposições sequenciais (agrotóxico + fungo) demonstraram

efeitos significantes na erosão da pele e tiveram redução significativa na taxa de sobrevivência quando comparado aos girinos do tratamento não exposto ao produto comercial. Esses resultados demonstram que a exposição a agrotóxicos, mesmo quando em concentrações consideradas subletais, podem alterar a imunidade de anfíbios, aumentando a susceptibilidade à infecção por patógenos (ROHR et al. 2010), influenciando indiretamente na sobrevivência dos organismos.

Gervasi et al. (2013), testando o efeito do mesmo fungo em indivíduos pós metamórficos de *L. catesbeianus*, demonstraram que a resistência da rã-touro ocorre, mas o alojamento do patógeno pode trazer importantes consequências para o hospedeiro. Os autores ressaltam ainda que os custos envolvidos em casos em que há infecção podem gerar efeitos indiretos na sobrevivência, tanto dos estágios larvais como dos adultos. O alto investimento energético responsável por evitar a infecção pode resultar em efeitos colaterais mesmo quando em baixos níveis, causando atraso no desenvolvimento e/ou mortalidade desses indivíduos (ROHR et al., 2010). Essa demanda energética para evitar infecções pode ser transposta aos experimentos realizados com agrotóxicos e outros xenobióticos, em que o custo para manter-se livre de contaminações e de distúrbios fisiológicos é tão alto que pode ser capaz de influenciar o desenvolvimento e sucesso do indivíduo estudado.

Em comparação aos trabalhos realizados com o agrotóxico Vertimec® 18CE (CASALI-PEREIRA, 2013; MENDES, 2011; RAMOS, 2013) utilizando diferentes espécies (*Ceriodaphnia silvestrii* - microcrustáceo, *Danio rerio* – peixe e *Chironomus sancticaroli* - inseto, respectivamente) verifica-se que a espécie anfíbia *L. catesbeianus* no estágio 25G possui a menor sensibilidade dentre os organismos avaliados (Tabela 10). Porém, a fase de desenvolvimento inicial, logo após a eclosão (21G), demonstrou sensibilidade semelhante à encontrada para espécimes de *D. rerio* em 48 horas (MENDES, 2011).

Entretanto, no trabalho desenvolvido por Ramos (2013), onde foram realizados testes de toxicidade aguda com *Hydra viridissima* e *Girardia tigrina* (Tabela 10) expostos ao Vertimec® 18CE, os valores da CL50, 96h foram muito superiores aos encontrados para os girinos de rã-touro.

Tabela 10 - Sensibilidade de diferentes espécies ao agrotóxico Vertimec® 18CE. *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae), *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Daphniidae), *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae), *Hydra viridissima* (Hydroida, Hydridae), *Girardia tigrina* (Plathyelminthes, Dugesiidae), *Lithobates catesbeianus* (Anura, Ranidae).

Espécie	*End point*	Valor	Autor
D. rerio	CE_{50}, 48h	3,66 µl.L^{-1}	Mendes (2011)
C. silvestrii	CL_{50}, 48h	8,16.10^{-2} µL.L^{-1}	Casali-Pereira (2013)
C. sancticaroli	CL_{50}, 96h	5,4.10^{-3} µL.L^{-1}	Ramos (2013)
H. viridissima	CL_{50}, 96h	140 µL.L^{-1}	Ramos (2013)
G. tigrina	CL_{50}, 96h	27,5 µL.L^{-1}	Ramos (2013)
L. catesbeianus 21G	CL_{50}, 96h	3,05 µL.L^{-1}	Este estudo
L. catesbeianus 25G	CL_{50}, 96h	7,69 µL.L^{-1}	Este estudo

Ainda em relação à sensibilidade dos girinos de rã-touro, pode-se perceber que estes também possuem maior tolerância ao cobre quando comparados a outras espécies aquáticas, conforme descrito na Tabela 11. Ferreira et al. (2004) concluiram que os girinos de *L. catesbeianus* são mais resistentes ao cobre que outras espécies de anfíbios (*Bufo aeranarum*) e outros organismos aquáticos, como o camarão de água doce (*Macrobrachium rosenbergii*) e algumas espécies de peixes (*Salmo gairdneri*, *Pimephales promelas, Lepomis macrochirus e Carassius auratus).*O trabalho de Moutinho (2013), desenvolvido com girinos de *Hypsiboas pardalis*, *Hypsiboas faber* e *Physalaemus cuvieri* com os princípios ativo acetocloro, metribuzim, glifosato e ametrina, também demonstra a menor sensibilidade das espécies de anuro para os quatro compostos quando comparados a peixes, microcrustáceos e algas, mostrando maior tolerância de anfíbios em relação a outros táxons.

Tabela 11 – Comparação da sensibilidade de diferentes espécies ao cobre. *Lithobates catesbeianus* (Anura, Ranidae), *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae), *Pimephales promelas* (Cypriniformes, Cyprinidae), *Daphnia similis* (Cladocera, Daphniidae), *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae).

Espécie	*End point*	Valor	Autor
L. catesbeianus	CL_{50}, 96h	2,2 mg.L^{-1}	Marcantonio (2005)
D. rerio	CL_{50}, 96h	0,118 mg.L^{-1}	Oliveira-Filho (2004)
P. promelas	CL_{50}, 96h	0,14 mg.L^{-1}	Johnson; Finley (1980)
D. similis	CE_{50}, 48h	0,028 mg.L^{-1}	Oliveira-Filho (2004)
O. niloticus	CL_{50}, 96h	0,59 mg.L^{-1}	Masutti (2006)

A menor sensibilidade dos girinos de rã-touro em relação à outra espécie anfíbia (*Rana palustris*) também foi relatada por Hoffman et al. (2002) quando os autores avaliaram o efeito do *run off* contendo chumbo sobre a espécie, verificando que foi tóxica para esta última espécie e não para *L. catesbeianus*. Storrs e Kieseker (2004) também encontraram maior resistência a atrazina para as espécies da família Ranidae do que em hilídeos e bufonídeos, com a maior sobrevivência dos ranídeos, evidenciando a robustez do grupo.

Entretanto, no trabalho de Relyea (2004), onde 5 espécies de anfíbios (*Lithobates pipiens*, *Lithobates clamitans*, *Hyla versicolor*, *Lithobates catesbeianus* e *Bufo americanus*) foram expostas a quatro agrotóxicos (diazinon, malathion, carbaril e glifosato), a rã-touro foi a única espécie afetada por todos os compostos testados (exceto carbaril, que não causou efeito em nenhuma espécie), com altos níveis de mortalidade. A ação combinada desses quatro agrotóxicos não causou redução da sobrevivência para nenhuma das espécies quando comparados ao efeito causado pelo agrotóxico isolado, exceto para a rã-touro, em que a exposição a essa combinação foi responsável por baixos taxas de sobrevivência. Isso indica que a combinação de agrotóxicos no ambiente natural pode ser mais letal para *L. catesbeianus* do que resultados obtidos a partir do efeito de um único composto e evidencia a variação da sensibilidade em diferentes espécies pertencentes a um mesmo táxon.

No trabalho de Hammond et al. (2012), onde foram estudados padrões filogenéticos de sensibilidade do agrotóxico endosulfan em anfíbios das famílias Bufonidae, Ranidae e Hylidae, os mais sensíveis à substância testada foram os ranídeos (incluindo exemplares de rã-touro), seguidos por hilídeos e bufonídeos, havendo grande variação de mortalidade dentre as diferentes espécies.

É importante ressaltar que, além da diferença natural da sensibilidade entre as diferentes espécies, estes resultados podem ser fruto da influência de diversos fatores, como estágio de desenvolvimento, idade, tamanho, nível de atividade, ciclo reprodutivo, status nutricional do organismo exposto (PELGROM, 1994), condições físicas e químicas do meio aquático e fisiologia do animal (MURTY, 1988), sendo que divergências nos valores encontrados para uma mesma espécie podem ocorrer, influenciadas principalmente pelo estágio de desenvolvimento, tamanho corporal e condições físicas e químicas da água de origem (BRIDGES; SEMLISTCH, 2000). Essas condições também podem justificar as divergências encontradas nos testes de sensibilidade deste experimento quando comparados a outros estudos.

Os resultados obtidos no teste de evitamento foram condizentes com a CL_{50}, 96 horas encontrada para girinos de rã-touro no estágio 21G, e indicaram a capacidade dos girinos em

detectar concentrações subletais do Vertimec® 18CE e escolher a zona mais favorável (ARAÚJO et al., 2014). Foi possível observar que as zonas mais favoráveis a esses organismos corresponderam a concentrações superiores a CL_{50} calculada para *C. silvestrii* e *C. sancticaroli* (CASALI-PEREIRA, 2013 e RAMOS, 2013, respectivamente), comprovando a maior resistência da espécie nas condições testadas.

O evitamento é considerado como uma resposta imediata às concentrações não letais com probabilidade de causar efeitos crônicos aos organismos (ROSA et al., 2012) e um mecanismo de defesa que pode atuar diretamente na resistência e tolerância dos girinos (ROHR et al., 2010). Os organismos que reagem evitando um determinado ambiente antes mesmo que efeitos deletérios ocorram (evitamento da contaminação) são capazes de obter maior sucesso (ARAÚJO et al., 2012). Além disso, o comportamento de evitamento é ecologicamente relevante, porque pode se relacionar diretamente com crescimento e sobrevivência (WEIS et al., 2001), sendo que a ausência desse comportamento pode indicar dificuldade do indivíduo em fugir do predador e de situações adversas (STEELE et al., 1989).

Em relação aos efeitos crônicos, o único tratamento em que os girinos apresentaram baixos níveis de atividade e dificuldade na locomoção e alimentação foi na concentração 0,008 $ml.L^{-1}$ de Vertimec® 18CE (concentração mais alta, próxima a $CL_{50,}$ 96h). Esse comportamento pode ser um indicativo de efeitos gerados na postura de equilíbrio dos girinos. Segundo Fordham et al. (2001) pode-se considerar que houve perda da postura de equilíbrio se os girinos apresentarem a superfície ventral voltada para cima durante a natação, o que pôde ser observado nos indivíduos deste tratamento, tornando-se possível inferir que as altas dosagens do agrotóxico interferiram no equilíbrio corporal. Girinos que não são capazes de manter seu equilíbrio corporal apresentam dificuldade de locomoção (evitamento de predadores, por exemplo) e alteração do comportamento alimentar, o que pode interferir diretamente na sobrevivência e no crescimento (FORDHAM et al., 2001), impactando negativamente o sucesso da espécie.

Devido ao modo de ação da abamectina descrito na literatura (FISHER; MORZIK, 1989; McCAVERA et al. 2007; TIŠLER; ERŽEN, 2006; VERHAELEN et al., 2013), acredita-se que as altas concentrações do agrotóxico possam ter surtido efeitos neurológicos nos girinos deste mesmo tratamento, o que interferiu tanto no seu nível de atividade quanto na postura de equilíbrio. A presença dessa substância no ambiente promove a liberação de neurotransmissores GABA (ácido gama amino butírico) nas terminações sinápticas do sistema nervoso central nos organismos aquáticos, responsável por hiperpolarizar o potencial de repouso nas células pós-sinápticas, dificultando a neurotransmissão. Diante desse processo a

contração muscular é afetada, o que pode resultar na paralisia parcial ou total do organismo, podendo causar efeitos na sobrevivência (McCAVERA et al., 2007).

O retorno à atividade dos indivíduos que foram contaminados com a concentração de 0,008 $ml.L^{-1}$ somente ao final do experimento (20º dia) justifica-se mais pela adaptação dos organismos a essas condições do que pela degradação do produto, mesmo porque a renovação parcial da solução feita a cada 96 horas não permitindo a completa de degradação do Vertimec® 18CE, o qual, segundo Novelli (2012a) em condições ambientais normais e sem interferências, é superior a 10 dias.

Fordham et al. (2001) analisaram as alterações causadas a girinos de *L. catesbeianus* à exposição ao agrotóxico malathion por um período de 28 dias, onde ocorria renovação diária da solução, objetivando-se manter sempre a mesma concentração inicial do produto. Nas concentrações em que não houve mortalidade foram analisados peso corporal e estágio de desenvolvimento. Verificou-se que nas concentrações mais altas, em que ainda haviam indivíduos sobreviventes, o desenvolvimento foi mais lento quando comparado ao controle. Não houve diferença significativa para peso e crescimento entre os tratamentos, e a influência exercida pelo malathion no desenvolvimento dos girinos foi muito pequena, assim como foi observada nesse estudo em resposta a exposição ao Vertimec® 18CE.

Apesar de não haver diferença estatística significativa dos girinos que se mantiveram no estágio 25G entre os tratamentos durante o teste crônico, observou-se que no tratamento 0,004 $ml.L^{-1}$ ocorreu a maior proporção de indivíduos nesse estágio, demonstrando um desenvolvimento mais lento em relação aos demais. Verificou-se também que no tratamento 0,002 $ml.L^{-1}$ ocorreu um percentual maior de girinos entre os estágios 32-37G, o que indica um desenvolvimento mais rápido em relação aos tratamentos 0,004 e 0,008 $ml.L^{-1}$.

O atraso no tempo de metamorfose (desenvolvimento) dos girinos pode aumentar a vulnerabilidade a predação, além de influenciar no potencial de reprodução, pois provoca atraso para atingir a fase reprodutiva (FORDHAM et al., 2001). No trabalho desenvolvido por Smith (1987), o autor observou que girinos de *Pseudacris triseriata* que sofreram metamorfose tardiamente obtiveram chances menores de reprodução no primeiro ano após a metamorfose do que aqueles que completaram seu ciclo larval em tempo normal.

Relyea e Mills (2000) ressaltam a importância de estudos com anfíbios realizados em um espaço de tempo maior (entre 10 e 16 dias), já que a maioria dos efeitos de pesticidas sobre anfíbios que se tem conhecimento são provenientes de experimentos de curta duração (96 horas). Percebe-se, no presente estudo, que a mortalidade ocorrida nas primeiras 96 horas de experimento no tratamento 0,008 $ml.L^{-1}$ de Vertimec® 18CE (o único que apresentou

mortalidade significativa em relação ao controle) foi de 30%. Portanto, dando-se continuidade a um experimento em maior período de tempo (24 dias) foi constatada mortalidade de 79% dos indivíduos neste tratamento. A mortalidade encontrada nos tratamentos 0,002 e 0,004 $ml.L^{-1}$ foi observada somente após o 20º dia de experimento, com valores finais de 4,17 e 12,5% respectivamente, não apresentando diferença significativa em relação ao controle, que obteve 100% de sobrevivência.

Esses resultados condizem com aqueles obtidos por Relyea e Mills (2000), em que foi estudada a toxicidade de girinos de *Hyla versicolor* ao carbaril. Em um dos experimentos foi observado que nas concentrações mais altas do agrotóxico houve redução na sobrevivência a partir do 3º dia de experimento, e nas concentrações mais baixas a partir do 6º dia. Em outro experimento realizado pelos mesmos autores a mortalidade começou a ser observada somente a partir do 10º dia de experimento. Observou-se também redução da atividade dos girinos proporcional ao aumento da concentração, e nos tratamentos contaminados o crescimento foi cerca de 50% menor do que no controle. Os autores ressaltam que nos primeiros quatro dias de experimento não houve efeito significativo na sobrevivência, entretanto ao final do período (16 dias) observou-se mortalidade de 96%.

Também é esperado que seja encontrada maior diferença nos estágios de desenvolvimento entre os tratamentos contaminados e o controle em estudos com maior duração. Efeitos mais relevantes no desenvolvimento dos indivíduos podem ser observados em espécies com o ciclo larval mais curto (desenvolvimento mais rápido), em que a exposição por algumas semanas representa uma grande proporção do estágio de vida (FORDHAM et al., 2001).

Como não existem trabalhos na literatura que quantifiquem a concentração do Vertimec® 18CE encontrada no ambiente aquático natural, tomou-se como base neste estudo o trabalho realizado por Novelli (2010), em que é feita a simulação do escoamento superficial da água proveniente da chuva em uma parcela de solo contaminado com o agrotóxico na máxima dosagem recomendada para seu uso na cultura de morango (0,9L/ha). Através de análise cromatográfica realizada pela autora, presume-se que, seguindo as recomendações contidas na bula, que a máxima quantidade do agrotóxico capaz de atingir o ecossistema aquático é de 0,002 ml de Vertimec® $18CE.L^{-1}$, o que corresponde ao escoamento de 100% do *run off*. Esta concentração é considerada alta quando comparada às informações de uso na bula do produto, sendo bem improvável que atinja o ambiente aquático por meio da deriva ou escoamento superficial. No entanto, em avaliações prévias realizadas por Novelli (2010) e Nunes (2010) junto a agricultores que utilizam esse agrotóxico, verificou-se o descarte

inadequado da embalagem de produtos bem como a limpeza do material utilizado no preparo da calda para aplicação no campo diretamente nos corpos d'água, o que podem agir como fatores de risco complementar, contribuindo para que concentrações maiores do que a indicada para o uso atinjam corpos d'água.

Além disso, algumas condutas que não são indicadas pelos fabricantes também são responsáveis pelo maior aporte do agrotóxico além do que é suposto. Diversos agrotóxicos são manipulados simultaneamente (ARMAS; MONTEIRO, 2005; BROOMHALL, 2005) fazendo com que no ambiente haja uma interação muito mais dinâmica do que a situação avaliada neste estudo, o que significa que os impactos sobre os anfíbios podem ser mais amplos. Sabe-se que mesmo em áreas distantes das lavouras (não agricultáveis), consideráveis concentrações de agrotóxico são encontradas, já que estes produtos percorrerem longas distâncias devido ao transporte por *run off*, pulverização excessiva em áreas adjacentes, dispersão aérea e deposição (SPARLING et al., 2010), aumentando a probabilidade de interação entre esses compostos e os riscos para girinos de rã-touro e toda a biota.

De acordo com o trabalho desenvolvido por Relyea (2004), a interação entre dois pesticidas ou mais é capaz de gerar efeitos mais significativos em *L. catesbeianus* do que em outras quatro espécies testadas (*L. pipiens*, *L. clamitans*, *Bufo americanus* e *Hyla versicolor*) além de ser mais letal do que a ação isolada de cada agrotóxico, onde a rã-touro também foi a espécie mais sensível.

Trabalhos que avaliaram os efeitos combinados dos pesticidas com fatores biótico e/ou abióticos mostram que o efeito dos compostos sobre as espécies de anfíbios é potencializado na presença de parasitas (ROHR et al., 2010), na presença de radiação ultravioleta (BRIDGES; BOONE, 2003), em diferentes níveis de disponibilidade de alimentos (BOONE; SULLIVAN, 2102), na presença de predadores (RELYEA, 2004) e em diferentes densidades da espécie, aumentando o estresse por competitividade (MILLS; SEMLISTCH, 2004; RELYEA; DIECKS, 2008).

Entretanto, considerando a concentração de Vertimec® 18CE encontrada por Novelli (2010) isoladamente, os resultados obtidos no estudo laboratorial demonstram que a concentração capaz de atingir o ambiente natural (0,002 $ml.L^{-1}$) não é capaz de causar mortalidade dos girinos em estágio de desenvolvimento mais avançado (25G) em um período de 96 horas, mas ficam próximos aos valores responsáveis por causar mortalidade de 50% da população de girinos em estágios mais jovens (0,00305 $ml.L^{-1}$). Em períodos mais longos de exposição em laboratório (24 dias), observa-se que esta concentração do Vertimec® 18CE

não seria capaz de causar influência significativa sobre o desenvolvimento e crescimento dos girinos de rã-touro.

8.2 Análise do efeito do Vertimec® 18CE em *L. catesbeianus* por meio de testes *in situ* (mesocosmos): efeitos diretos e indiretos

A disponibilidade de recursos e a composição da cadeia alimentar são capazes de alterar a estrutura de um ambiente tanto pela formação de microhabitats e alteração de fatores abióticos (STOLER; RELYEA, 2013) quanto pela alteração de fatores bióticos. De modo geral, as causas das alterações do ambiente em estudo podem ser classificadas por dois tipos de efeitos, *bottom up* e *top down*. O efeito *bottom up* indica a limitação de um sistema por privação de recursos ou por alterações ambientais, principalmente pela interação presa-predador (HEATH et al., 2013). O equilíbrio do sistema é determinado de baixo para cima, dos níveis tróficos inferiores para os superiores, com o ciclo de matéria e energia controlado pelos consumidores. Nessa situação, os produtores e os nutrientes gerados são os responsáveis pela dinâmica populacional. Na situação inversa, encontra-se o efeito *top down*, que ocorre quando a dinâmica populacional é influenciada pelo predador de topo, ou seja, de cima para baixo. A quantidade de predadores determina o crescimento populacional de suas presas e assim por diante, controlando o ciclo de matéria e energia (CARPENTER et al., 1985).

O conceito de cascata trófica pode explicar a diferença de produtividade encontrada em lagos que possuem as mesmas concentrações dos mesmos nutrientes, porém diferem na estrutura de sua cadeia alimentar (CARPENTER et al., 1985). A cascata trófica é representada pela conectividade que existe entre os diversos táxons dentro de uma cadeia alimentar, onde alterações causadas a um destes representantes pode resultar em efeitos em todos os níveis tróficos (HEATH et al., 2013). Os efeitos em cascata são classificados como *bottom up* ou *top down*, dependendo do componente que é afetado (HEATH et al., 2013), podendo atingir todo o ecossistema ou somente alguns níveis tróficos. Por exemplo, a exposição de uma comunidade a um inseticida pode limitar os recursos necessários ao crescimento de girinos, como o zooplâncton e, através de uma cascata trófica, levar ao aumento da densidade de fitoplâncton e à redução da abundância de perifíton, alterando tanto a sobrevivência de girinos, como o tamanho e o tempo até a metamorfose (BULEN; DISTEL, 2011). Os efeitos na sobrevivência desses animais deve reduzir a competição por alimento, o que resulta em crescimento e desenvolvimento mais rápido dos competidores sobreviventes (GRONER; RELYEA, 2011).

Em geral, os ecossistemas apresentam estrutura de não equilíbrio que resultam das diferentes interações entre as principais espécies ali presentes (BULEN; DISTEL, 2011). A inserção de uma espécie de peixe, por exemplo, reduz a densidade de zooplâncton, o que influencia no aumento da biomassa fitoplanctônica, assim como mudanças estruturais na comunidade fitoplanctônica implica em mudanças substanciais nas concentrações de clorofila e produtividade devido a muitas relações alométricas, e mudanças na densidade de predadores resultam em alterações na densidade, composição de espécies e comportamento das presas (CARPENTER et al., 1985).

Geralmente as espécies que possuem papel central na cadeia alimentar são identificadas como dominantes, percussoras ou espécies chave, e são capazes de interferir na densidade de outras espécies, já que possuem uma capacidade muito maior de competir por recursos e nutrientes, além de serem mais resistentes a doenças e predação (ODUM, 2012). Para avaliar a influência dessa espécie na estrutura de um sistema é preciso retirá-la da comunidade e observar o comportamento das outras espécies.

Essa influência foi avaliada neste estudo quando nos referimos somente ao tratamento controle (C) e ao controle com girino (CG), a fim de avaliar o efeito da presença de um predador em um sistema sem a interferência de um xenobiótico. Em trabalho realizado por Schiesari et al. (2009), em que foi analisada, entre outras, a dieta de girinos de rã-touro, os autores sugeriram que esses organismos agem na cadeia alimentar como predadores. É possível verificar que alterações significativas ocorreram na concentração de clorofila *a*, oxigênio dissolvido e turbidez, com valores mais altos sempre para o controle sem a interferência desses organismos. Os menores valores dessas variáveis para o tratamento contendo girinos explicam-se principalmente pelo hábito alimentar e modo de vida de *L. catesbeianus*. A predação da comunidade fitoplanctônica, que tratava-se do recurso alimentar com maior disponibilidade (RESENDE, em preparação), fez com que a concentração de clorofila *a* atingida fosse menor, o que contribuiu para uma menor produção de oxigênio e menor produção de compostos orgânicos, reduzindo também a turbidez. Além disso, a diminuição da concentração de oxigênio dissolvido esteve relacionada com o maior consumo por parte dos girinos. Houve diferença na concentração de amônia e fosfato inorgânico durante todo experimento, e para nitrogênio total a partir das 192h, com CG apresentando valores mais altos, devido à liberação de amônia e fósforo pelos girinos (POUGH et al., 2008). Em relação às comunidades planctônicas (fitoplâncton e zooplâncton), verificou-se que no tratamento controle ocorreram sempre maiores valores do que controle girinos (CG). Para zooplâncton, esse comportamento foi observado até às 96 horas (conforme RESENDE, em

preparação), quando, provavelmente, o confinamento começou a expressar efeito nas comunidades presentes no controle. Esses dados afirmam o comportamento predatório não seletivo dos girinos de rã-touro (SCHIESARI et al., 2009) e como a presença desses organismos influenciou significativamente na estrutura trófica das comunidades e nas características limnológicas do ambiente estudado, podendo ser caracterizada como uma espécie chave.

De forma geral os tratamentos que não continham girinos apresentaram sempre concentrações mais altas de oxigênio dissolvido do que aqueles que continham. A partir das 96 horas verificou-se em CG (controle com girinos) e em DMG (dose múltipla com girinos) concentrações mínimas de oxigênio dissolvido, com diminuição da concentração de clorofila *a*, bem como da comunidade fitoplanctônica (RESENDE, em preparação). Esse comportamento, como já citado, está relacionado ao modo de vida dos girinos de rã-touro, em que o consumo de oxigênio e a predação da comunidade fitoplanctônica são intensos, fazendo com que a diminuição da densidade dessa comunidade também interfira na quantidade de oxigênio adicionado ao meio. A redução na concentração de oxigênio do tratamento DUG (dose única com girinos) explica-se pela maior disponibilidade de matéria orgânica na coluna d'água proveniente da morte dos girinos, e sua consequente degradação, o que exige grande consumo de oxigênio (ESTEVES, 2011). Lima e Agostinho (1992 – apud SANTOS, 2013) argumentam que a baixa concentração de oxigênio dissolvido torna-se mais prejudicial aos girinos pela fermentação de restos de ração e fezes, com a produção de substâncias tóxicas, do que propriamente pela necessidade respiratória dos animais. No trabalho de Castro e Pinto (2000) com girinos de *L. catesbeianus*, na densidade de 1 girino/litro, foram observadas concentrações de oxigênio dissolvido inferiores a 0,5 $mg.L^{-1}$ (atingindo até 0,05 $mg.L^{-1}$), sem prejuízos em relação ao ganho de peso e mortalidade dos organismos, mostrando considerável resistência dos girinos de rã-touro a baixos níveis de oxigênio dissolvido, mesmo em longos períodos de tempo (75 dias).

Para Esteves (2011), a difusão do oxigênio dentro de um corpo d'água ocorre principalmente pelos seus transportes em massas d'água. Portanto, a ausência de transportes de massas nos mesocosmos (sistemas lênticos) também influenciaram as baixas concentrações de oxigênio em alguns períodos. Como pôde ser visto nos gráficos, o aumento da temperatura não esteve correlacionado à diminuição de oxigênio. Outro fator que influenciou esses baixos valores é o horário de medição em campo. Todos os dados foram coletados pela manhã (entre 9 e 10h) e, segundo Esteves (2011), para ecossistemas aquáticos rasos, no período da madrugada ou manhã, quando a atividade fotossintética ainda é baixa, são atingidos valores

de oxigênio dissolvido muito baixo, o que não é suficiente para repor todo o oxigênio consumido durante a noite.

Pela análise de componentes principais (ACP) aplicada aos resultados obtidos na pesquisa, verifica-se que a presença de girinos nos mesocosmos foi um fator determinante no comportamento dos nutrientes e, consequentemente, dos tratamentos. De forma geral, vê-se a predominância do efeito *top down*, com o controle das variáveis sendo feito pelo topo de cadeia.

A ACP indicou ainda que os tratamentos que apresentaram girinos sobreviventes até o final do experimento (CG e DMG) estiveram relacionados com as formas nitrogenadas, silicato e condutividade, com concentrações de nitrito e nitrato elevadíssimas ao final do período, indicando a busca pela estabilização das variáveis nesse período, já que, para Piveli e Kato (2005), em um sistema de autodepuração, as altas concentrações desses nutrientes indicam, respectivamente, zonas de recuperação e águas limpas. Além disso, o nitrito está inversamente relacionado à concentração de oxigênio dissolvido, ocorrendo em altas concentrações em ambientes anaeróbios, e vice versa, sendo, nessas condições, extremamente tóxico à maioria dos organismos aquáticos (ESTEVES, 2011). Sendo assim, as baixas concentrações de OD justificam o intenso aumento de nitrito na última coleta (480 horas), principalmente para o controle com girinos.

Os altos níveis de condutividade fornecem informações sobre o metabolismo dos ambientes aquáticos (ESTEVES, 2011), já que esse aumento é resultado do maior número de partículas dissolvidas e de nutrientes na água, resultante tanto dos produtos de excreção desses organismos, quanto, no caso de DMG (dose múltipla com girinos), da adição do contaminante. A condutividade elétrica apresentou maiores valores para os tratamentos contendo girinos e para DUG (dose única com girinos), mostrando diferença significativa entre os tratamentos que continham girinos e os que não continham. O aumento dessa variável foi observado também em relação ao aumento da dosagem de Vertimec® 18CE (DUG>DMG>CG>C>DU>DM). Segundo Esteves (2011), o pH, a temperatura e o íon amônio, quando em altas concentrações, exercem grande influência sobre esses valores. Como durante todo o experimento pH e temperatura mantiveram-se estáveis entre os tratamentos e o íon amônio apresentou aumento progressivo (com maior intensidade nos tratamentos com girinos), é possível associar a presença deste nutriente a esse aumento. Os maiores valores de condutividade observados para o tratamento DUG podem ser justificados pelo fato do processo de decomposição também ser responsável pelo aumento dessa variável,

o qual foi indicado neste tratamento pelos baixos níveis de oxigênio dissolvido e aumento de nutrientes, principalmente formas fosfatadas.

Nos tratamentos DMG e CG verificou-se ainda aumento de nitrogênio total e amônia ao longo do experimento, apresentando valores mais altos que os demais tratamentos, provavelmente provenientes da excreção dos girinos de rã-touro e da taxa de decomposição de matéria orgânica, como resíduos de fezes (POUGH et al., 2008).

O nitrogênio é fundamental para o metabolismo dos ecossistemas aquático, sendo que, em baixas concentrações, atua como fator limitante a produtividade primária, já que nitrato e íon amônio representam as principais fontes de nitrogênios para esses produtores (ESTEVES, 2011). O íon amônio é muito importante para esses organismos, especialmente porque sua absorção é energeticamente mais viável. Geralmente, em locais em que se encontram grande abundância de fitoplâncton, a concentração desse íon é muito baixa devido ao consumo, relação que é percebida nos tratamentos contaminados pelo Vertimec® 18CE. As menores concentrações desse íon ocorreram nos tratamentos contaminados sem girinos, que foram aqueles que apresentaram também as maiores densidades de fitoplâncton (a exceção de DUG). Percebe-se que no tratamento contaminado com girinos e em CG encontram-se altas concentrações de amônia, o que pode ser consequência, além da excreção, da menor densidade fitoplanctônica (RESENDE, em preparação).

A ACP indicou ainda que DM e DU, que receberam adição de Vertimec® 18CE, mas não possuíam predadores em potencial, continuaram relacionados às mesmas variáveis do início do experimento, demonstrando que, quando comparados ao controle, a presença do agrotóxico é capaz de retardar o efeito de estabilização do sistema. Esse mesmo comportamento não pôde ser visto nos tratamentos contaminados e/ou com a presença de girinos, já que tanto a maior excreção de nutrientes como a intervenção do agrotóxico causou aumento da condutividade e alteração da cadeia trófica, trazendo consequências para estes sistemas.

No tratamento DUG, em que os girinos morreram com menos de 24 horas de experimento, verificou-se comportamento distinto. Os girinos mortos foram retirados assim que registrou-se o fato, mas vê-se que o período entre a mortalidade e a retirada desses organismos (cerca de 12 horas) foi responsável pela inserção de matéria orgânica na coluna d’água, fazendo com que as características do sistema sofressem alterações que se repercutiram em longo prazo. Através da ACP identificou-se que neste tratamento houve intensa atividade primária, com forte relação com as formas fosfatadas, turbidez e clorofila *a*. A elevada concentração de matéria orgânica demanda grande consumo de oxigênio devido à

degradação da mesma (ESTEVES, 2011), o que pôde ser visto no período inicial de experimento para esse tratamento. Este tratamento foi uma exceção às demais variáveis todas as vezes que nos referimos a grupos (com e sem girinos), já que a mortalidade dos indivíduos no início do experimento, com decomposição de parte da matéria orgânica (anteriormente a retirada dos organismos), criou uma nova situação, divergente dos demais tratamentos.

De acordo com a ACP, o controle mostrou-se fortemente relacionado com o nitrito e nitrato, o que está relacionado com a recuperação do sistema, conforme já citado, indicando a recuperação e estabilização das condições após o confinamento (PIVELI; KATO, 2005).

Em relação aos nutrientes fosfatados analisados na água, por mais que não tenham sido divididos estatisticamente em grupos, os tratamentos contendo girinos apresentaram sempre valores mais altos do que aqueles sem esses organismos, o que foi observado também em relação ao fósforo total presente no sedimento. Esse fato pode ser justificado em função da excreção dos girinos, uma vez que além da amônia, grandes quantidades de fósforo são depositadas no ambiente (POUGH et al., 2008). Além disso, a liberação do íon fosfato para a coluna d'água ocorre mais facilmente em condições de baixas concentrações de oxigênio (ESTEVES, 2011), relação que é observada nos tratamentos CG, DMG e DUG, que apresentaram as menores concentrações de oxigênio e os maiores valores para as formas fosfatadas. Outro fator que contribuiu foi a incorporação ativa do fósforo pelo fitoplâncton (ESTEVES, 2011; TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2013) para seu crescimento, o que demonstra menor concentração desse nutriente nos tratamentos com maior densidade dessa comunidade, que é o caso dos tratamentos sem girinos (C, DM e DU), conforme registrado por Resende (em preparação).

A concentração de fosfato inorgânico possui importante papel no processo de absorção da cauda dos girinos, e é necessário às transformações morfofisiológicas que ocorrem durante a metamorfose (GONÇALVES et al., 2010). Essa substância é liberada pela enzima fosfatase alcalina que age ativamente nesse processo, porém em altas concentrações de fosfato inorgânico, a atividade dessa enzima é inibida (GONÇALVES et al., 2010). A maior concentração de fosfato inorgânico ao final do experimento (480 horas) encontrada em DMG justifica o atraso no desenvolvimento dos girinos deste tratamento (menor regressão da cauda), já que esse nutriente pode ter agido como inibidor da fosfatase alcalina.

O fosfato atua ainda como um fator limitante à produtividade de corpos d'água, pois participa de processos fundamentais do metabolismo dos seres vivos, além de ser responsável pelo processo de eutrofização destes sistemas. Além disso, pode ser precipitado no sedimento reduzindo suas concentrações no meio, tornando-se não disponível (TUNDISI;

MATSUMURA-TUNDISI, 2013), tendo implicações no metabolismo de todo o ecossistema aquático, reduzindo sua produtividade.

A alta concentração de nutrientes em todos os mesocosmos, contaminados ou não, com ou sem presença de girinos, indicou índices de estado trófico elevados para todos os tratamentos, tanto pelo grau de confinamento quanto pelo enriquecimento com nutrientes da água de origem, indicando um alto índice de produtividade primária dos sistemas (BASSOLI; ROLAND, 2005). Quando calculados em relação à concentração de fósforo total, os IETs não demonstraram diferença entre os tratamentos, enquadrando-se todos como hipereutrófico. Já para o cálculo feito através da concentração de clorofila *a*, todos os tratamentos apresentaram diminuição desse índice. Os menores valores apresentados pelo IET calculado através da clorofila *a* indicam grande influência de fatores ambientais no processo de eutrofização (CETESB, 2013). O valor final do IET (média aritmética) indicou que os tratamentos que não possuíam girinos (C, DM, DU e DUG) mantiveram condições próximas ao estado inicial, enquanto aqueles que possuíam girinos tiveram esses valores diminuídos devido à redução na concentração de clorofila *a*, possivelmente devido à predação de fitoplâncton por esses organismos. Como os valores iniciais do IET de todos os mesocosmos já se encontrava incialmente altos justifica-se esses índices tanto pelo confinamento inicial dos sistemas (período de aclimatação), como pelas condições tróficas da Represa do Lobo relatadas em estudos recentes (FREITAS, 2012; SANCHEZ, 2012), que a enquadram como supereutrófica e hipereutrófica, dependendo do período e estação de coleta considerada.

A produtividade fitoplanctônica e a clorofila estão relacionadas parabolicamente, com a máxima produtividade atingida nos níveis intermediários de clorofila (CARPENTER et al., 1985). Como a clorofila se refere a um dos principais responsáveis pela fotossíntese, a concentração desse pigmento pode dar indicações da biomassa fitoplanctônica (ESTEVES, 2011). Neste experimento, observou-se que a densidade fitoplanctônica (RESENDE, em preparação), assim como as concentrações de clorofila *a*, apresentaram maiores valores nos tratamentos contaminados por Vertimec® 18CE que não continham girinos (DM e DU). Os menores valores foram registrados nos tratamentos contendo girinos (contaminado –DMG e não contaminado – CG), mostrando a capacidade efetiva dos girinos no consumo da comunidade. Dentro desses menores valores, o tratamento contaminado contendo girinos (DMG) apresentou maior densidade fitoplanctônica do que CG, demonstrando que a presença do agrotóxico causou aumento desta comunidade, o que é corroborado pelos dados obtidos para clorofila *a* e pelo trabalho de Vieira (2010), em que os tratamentos contaminados pelo Vertimec® 18CE apresentaram maior densidade do que aqueles sem o produto. A ocorrência

de *blooms* de fitoplâncton associados com aplicações de inseticidas também foi documentada por outros autores (GRONER; RELYEA, 2011; MILLS; SEMLITSCH, 2004; RELYEA; DIECKS, 2008).

O aumento da clorofila *a* e da comunidade fitoplanctônica nos tratamentos contaminados estão relacionados ao fato do Vertimec® 18CE agir negativamente nos organismos zooplanctônicas (NOVELLI et al., 2012a; RESENDE, em preparação), fazendo com que a predação de fitoplâncton seja diminuída, elevando sua abundância, com o consequente aumento da concentração de clorofila *a*. Esses aumentos também estão relacionados aos menores valores de silicato observados para estes tratamentos do que para o controle. A concentração mais alta de silicato foi registrada no controle, seguido dos tratamentos contendo girinos (CG e DMG), e as menores concentrações nos tratamentos contaminados sem girinos(DM e DU). Apesar de não atuar como fator limitante aos produtores primários, o silicato é utilizado pelas diatomáceas, que são as principais algas responsáveis pela redução deste composto na coluna d'água, na formação de suas carapaças (ESTEVES, 2011). Por isso encontra-se forte relação entre o crescimento desta população e a redução da concentração de silicato no meio (tratamentos contaminados). Além disso, a atividade de organismos bentônicos tem sido apontada como importante fator para a liberação de sílica para a coluna d'água (ESTEVES, 2011), o que pode indicar influência do Vertimec® 18CE na mobilidade desses organismos, fazendo com que a quantidade de silicato nos mesocosmos contaminados fosse menor.

Outro fator que influenciou a variação nas concentrações de clorofila *a* foi a concentração de nutrientes, sobretudo de formas fosfatadas, atuando como limitante na produtividade primária, assim como sugerido por Bassoli e Roland (2005). Neste estudo, a diminuição das formas fosfatadas às 288 horas relaciona-se com o aumento da comunidade fitoplanctônica (RESENDE, em preparação), o que indica a assimilação do nutriente por esse grupo.

A reestabilização das concentrações de nutrientes na água dos tratamentos contaminado com Vertimec® 18CE sem girinos (DM e DU), em relação ao controle (C), foi observada a partir das 192 horas de experimento para as formas fosfatadas (fósforo total, fosfato total dissolvido e fosfato inorgânico). Para as formas nitrogenadas, o nitrogênio total em DM e DU passou a ter concentrações semelhantes ao controle a partir das 288h, e o íon amônio só apresentou semelhança para DU nas duas últimas coletas, enquanto nitrito e nitrato não atingiram níveis de equiparação ao controle. Percebe-se que para nitrito e nitrato os valores de DUG ao final do experimento tendem a se aproximar dos tratamentos contaminados sem

girinos (DM e DU), enquanto para amônia e nitrogênio total esses valores foram intermediários, não sendo possível definir em qual grupo DUG se enquadrou. Os tratamentos com girinos (CG e DMG) não atingiram níveis semelhantes ao controle sem girinos tanto para as formas nitrogenadas quanto para as fosfatadas, porém apresentaram concentrações equivalentes entre si, o que demonstra que ao longo do tempo esses sistemas criaram condições singulares devido à presença de um predador, e que, possivelmente, os girinos de DMG tiveram diminuição das intervenções sofridas pelo Vertimec® 18CE pela degradação e/ou inativação do produto, já que as características físicas e químicas foram semelhantes a CG, tratamento com girinos sem a presença do agrotóxico. Percebe-se que a presença de Vertimec® 18CE e de girinos foram responsáveis por causar um efeito indireto na recuperação dos tratamentos em relação a dinâmica de nutrientes do tratamento controle, não sendo atingido o mesmo ponto de equilíbrio.

Paralelamente a este estudo, foram desenvolvidos por Casali-Pereira (2013) testes de toxicidade com espécies de alga (*Pseudokirchineriella subcapitata*) e de microcrustáceo (*Ceriodaphnia silvestrii*) a partir de amostras coletadas dos mesocosmos a cada 96 horas. Para algas foi observada redução significativa na densidade celular a partir das 192 horas de experimento, indicando toxicidade de todas as amostras de mesocosmos, inclusive não contaminadas. Esse resultado justifica-se pela competição interespecífica, já que de acordo com os dados para a densidade de fitoplâncton (RESENDE, em preparação), outras espécies foram encontradas nas amostras e não tiveram suas densidades afetadas pelo confinamento e/ou presença do Vertimec® 18CE. Para os testes de toxicidade realizados com *C. silvestrii* a toxicidade foi constatada a partir da primeira coleta para os tratamentos que contavam com a inserção do Vertimec® 18CE. Amostras do controle com girinos foram tóxicas a partir de 192 horas de experimento, e do controle a partir de 288 horas. Essa toxicidade foi resultante das alterações causadas pelas mudanças físicas e químicas dos mesocosmos e do confinamento do sistema, uma vez que o simples processo de confinamento causa alterações nas características físicas e químicas da água, pois o sistema tende a procurar um novo ponto de equilíbrio para as condições submetidas (GUSMÃO, 2004). Para CG podemos ainda acrescentar a interferência da amônia excretada pelos girinos como fator agravante da toxicidade. Por mais que ao final do experimento as amostras dos controles ainda fossem tóxicas aos microcrustáceos, observou-se redução da CE_{50}, 48h. Para os tratamentos em dose múltipla observou-se que até a recontaminação houve redução na $CE_{50,}$ 48h, porém, após esse momento, esses valores apresentaram-se levemente superiores ao valor inicial, sendo ainda maiores do que a CE_{50} encontrada para DU, que apresentou contaminação quatro vezes maior.

Observou-se também que a redução da toxicidade ocorreeu mais lentamente no segundo período, após a recontaminação, indicando um efeito adicional do Vertimec® 18CE.

Em relação à aplicação única e múltipla do Vertimec® 18CE observou-se diferença estatística significativa apenas do nitrogênio e fósforo total no sedimento. Os tratamentos que receberam as duas doses do agrotóxico apresentaram concentrações mais altas que os tratamentos com dose única e controle. Acredita-se que essa acumulação no sedimento seja resultado da precipitação dos compostos secundários liberados pelo Vertimec® 18CE e da complexação desses compostos com a matéria orgânica ali presente, pois não se observou menor concentração desses nutrientes na coluna d'água, a fim de buscar o equilíbrio. Em testes de toxicidade realizados por Casali-Pereira (2013) com amostras de sedimento dos mesocosmos foi encontrada toxicidade aguda para *C. silvestrii* nos tratamentos contaminados, enquanto C e CG permaneceram atóxicos. Esses resultados indicam que o Vertimec® 18CE pode ter se complexado com a matéria orgânica presente no sedimento. Ao longo do tempo amostras de sedimento de CG também passaram a apresentar toxicidade para *C. silvestrii*, possivelmente devido a grande excreção de amônia dos girinos ali presentes.

Os demais nutrientes e variáveis não se mostraram influenciados pelo duplo contato com o agrotóxico, comportando-se de maneira semelhante em DM e DU, durante todo o experimento. Não se percebe influência direta nos tratamentos com girinos (diferença entre DM e DMG) pela recontaminação do sistema.

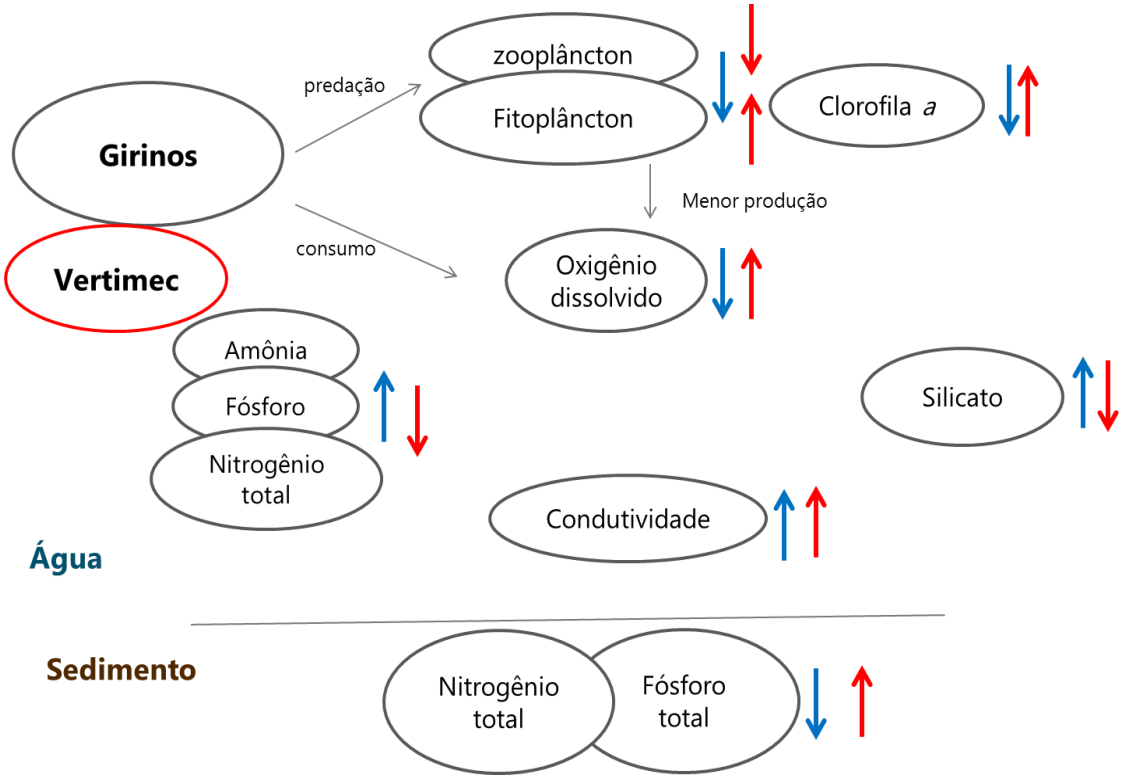


Figura 34: Desenho esquemático do comportamento das variáveis limninológicas em função da presença do agrotóxico Vertimec® 18CE (setas vermelhas) e girinos de rã touro, *L. catesbeianus* (setas azuis), no experimento realizado em mesocosmos.

Em relação aos efeitos do agrotóxico no desenvolvimento e sobrevivência dos girinos, pelos resultados obtidos verifica-se que, com a inserção de um novo lote ao tratamento DUG logo após às 24 horas de experimento, a toxicidade do Vertimec® 18CE prevaleceu por mais tempo do que a meia vida da abamectina, determinado por alguns autores (CAMPBELL, 1989; HALLEY et al. 1993; NOVELLI et al., 2012; WISLOCKI et al., 1989), já descrita anteriormente. Como não foram feitas análises do agrotóxico nas amostras de água não se pode inferir se houve aumento no tempo para a degradação da abamectina nos mesocosmos ou se a toxicidade ao segundo lote de girinos foi causado por metabólitos secundários liberados pela degradação do agrotóxico. De acordo com Campbell (1989) e Wislocki et al. (1989) a abamectina é degradada na superfície da água em um período de 12 horas, sendo que em lagos sua meia vida é de até 4 dias. Em trabalho realizado por Tišler e Eržen (2006) os autores detectaram redução de 60% dos níveis de abamectina em 48 horas em experimentos laboratoriais com *Daphnia magna*, e de 90% em 96 horas para *Danio rerio*.

No trabalho realizado em laboratório por Novelli et al. (2012b) os autores relataram elevada degradação da abamectina em testes de toxicidade realizados com *Chironomus xanthus* (96 horas) e *Danio rerio* (48 horas), com valores superiores a 95% em cada período.

Porém, quando realizado testes de toxicidade com o produto comercial Vertimec® 18CE em campo, com duração de 10 dias sem renovação da solução, constataram toxicidade durante todo o período, sugerindo que, além do princípio ativo, os componentes inertes e produtos secundários resultantes da degradação da abamectina apresentam toxicidade superior à substância em questão.

Os dados encontrados para a toxicidade do Vertimec® 18CE nos mesocosmos e o tempo de meia vida da abamectina constante na literatura indicam que o produto comercial possui maior potencial de toxicidade do que o princípio ativo, possivelmente devido aos seus componentes secundários. Outro fator que pode colaborar para essa diferença de toxicidade é que normalmente os testes que definem o tempo de meia vida dos princípios ativos dos agrotóxicos são realizados em laboratório, o que pode resultar em diferença de comportamento quando esse produto é ministrado em campo, próximos às condições naturais (HOSE; VAN DEN BRINK, 2004; ORTIZ-SANTALIESTRA et al., 2006).

Observa-se também que a concentração utilizada nos mesocosmos com contaminação única (0,008 $ml.L^{-1}$), a qual foi baseada na CL_{50}, 96h calculada em laboratório para girinos da mesma espécie em estágio de desenvolvimento semelhante, foi muito mais tóxica em experimentos em campo do que em laboratório. Para o tratamento de dosagem única, na concentração de 0,002 $ml.L^{-1}$ de Vertimec® 18CE, a sobrevivência e o comportamento observados em campo foram equivalentes aos resultados obtidos em laboratório.

No trabalho de Distel e Boone (2009) foram testadas concentrações de carbaril com toxicidade conhecida em laboratório, as quais não eram capazes de causar efeitos diretos na mortalidade de girinos de *Bufo americanus* e *Rana pipens*. Porém, as mesmas concentrações, quando testadas em campo, demonstraram ser capazes de reduzir significativamente a sobrevivência das mesmas espécies.

Por outro lado, nos testes de toxicidade realizados por Casali-Pereira (2013), com *Ceriodaphnia silvestrii* em campo e laboratório, os resultados obtidos em laboratório demonstraram toxicidade cerca de 3 vezes maior do que aquela encontrada em experimentos *in situ*. A diferença de sensibilidade entre as diferentes espécies testadas e a complexidade de cada uma pode justificar a diferença obtida entre campo e laboratório, uma vez que as condições e comportamento do Vertimec® 18CE foram os mesmos. É possível também que os metabólitos secundários gerados pela degradação desse composto atingem diferentes *end points* em cada espécie.

Por meio dos dados obtidos para desenvolvimento de girinos verifica-se que o Vertimec® 18CE, mesmo que não tenha causado mortalidade e nem efeitos comportamentais

visíveis nos girinos de rã-touro no tratamento em dose múltipla (0,002 ml.L^{-1}), foi responsável pelo aumento do período larval dos organismos expostos ao agrotóxico quando comparado ao tratamento controle (CG), assim como observado por Bulen e Distel (2011) em girinos de *Rana sphenocephala* com o agrotóxico carbaril. Observa-se que a porcentagem de indivíduos que conseguiu atingir estágios a partir daqueles classificados por Gosner (1960) como iniciais para a metamorfose (42G) até a metamorfose completa (46G) no tratamento contaminado é muito baixa (3,7%), provavelmente por estarem limitados fisiologicamente, enquanto no controle essa porcentagem atingiu 13,1%.

A exposição a um contaminante é capaz de aumentar o período larval dos girinos, fazendo com que eles permaneçam por mais tempo no ambiente aquático, tornando-os mais susceptíveis a predação e com risco de dessecação das poças para aquelas espécies que se desenvolvem em lagoas temporárias (BULEN; DISTEL, 2011), além do maior tempo de exposição a ambientes contaminados. Esses fatores acarretam consequente diminuição no recrutamento de juvenis, o que em médio prazo implica no declínio de uma população (BROOMHALL, 2005). Gahl et al. (2011), utilizando o Roundup (cujo princípio ativo é o glifosato) em espécies de *Rana sylvatica*, por exemplo, observaram influência negativa direta no desenvolvimento dos girinos, causando aumento do período larval.

O bom desenvolvimento de anfíbios está relacionado a diversos fatores, tais como competição por alimento, estresse e inibição do crescimento (MARTINEZ et al., 1996), sendo que qualquer agravamento dessas situações pode causar menor crescimento e metamorfose tardia. O atraso no desenvolvimento dos girinos expostos ao Vertimec® 18CE pode estar relacionado ao investimento energético (custo metabólico) desses organismos para reduzir os efeitos fisiológicos relacionados ao estresse e a intervenção do agrotóxico (detoxificação do organismo) (VENESKY et al., 2012, GERVASI et al., 2013), o que desvia a energia que seria utilizada para o desenvolvimento.

Observa-se também nesse trabalho que em relação ao peso médio final, os girinos do tratamento contaminado apresentaram uma perda da massa corpórea maior que os girinos do tratamento controle em relação ao peso médio inicial. Através da comparação do peso dentro de cada estágio, observa-se que os girinos do DMG apresentam os maiores valores, o que significa que esses indivíduos sofreram aumento de peso, mas não conseguiram passar para estágios de desenvolvimento mais avançados. Observa-se o mesmo comportamento dos girinos do tratamento contaminado em relação ao comprimento, onde dentro de cada estágio DMG apresenta maior comprimento em relação ao controle. Em relação ao comprimento

final, os girinos do tratamento contaminado apresentaram o maior tamanho médio, porém sem diferença significativa.

Como descrito por Pough et al. (2008), a medida que os girinos crescem, tornam-se menos eficientes na captura de alimentos devido a mudança na relação entre o tamanho das superfícies coletoras de alimentos e o tamanho do corpo do animal, já que o corpo aumenta de tamanho mais rapidamente do que as brânquias (aparelho coletor), exigindo maior demanda nutricional do que essas estruturas são capazes de coletar. Ou seja, a eficiência da coleta de alimentos diminui com o crescimento dos girinos, o que pode ter ocorrido com os organismos dos tratamentos contaminados que apresentaram maior tamanho corporal em estágios anteriores ao início da metamorfose (42G), ocasionando deficiência alimentar e dificultando o avanço para estágios superiores. Nos estágios avançados do desenvolvimento (a partir de 42G), os girinos deixam de se alimentar dos recursos disponíveis no ambiente por sua necessidade nutricional ser suprida pela absorção da cauda, mostrando uma tendência de esses animais perderem peso até atingirem o clímax da metamorfose (FERREIRA et al., 2001).

A diferença no tamanho corporal e no desenvolvimento dos girinos pode ser resultado tanto da qualidade como da disponibilidade de recursos (STOLER; RELYEA, 2013). A diferença entre a densidade de zooplâncton nos tratamentos CG e DMG (RESENDE, em preparação) pode explicar a diferença de desenvolvimento desses animais nos diferentes tratamentos. No tratamento CG representantes de copepódos estiveram presentes até o final de experimento, enquanto em DMG os valores de densidade foram próximos a zero desde o início do experimento. O tratamento CG ainda possuía cladóceros disponíveis até às 288 horas, enquanto no tratamento contaminado essa densidade reduziu às 3 horas.

As diferenças observadas na densidade fitoplanctônica (RESENDE, em preparação) não são capazes de explicar a diferença no desenvolvimento dos girinos. Percebe-se que há disponibilidade de alimentos em ambos os tratamentos, porém pode ter ocorrido baixa qualidade nutricional deste, o que pode levou a baixas taxas de crescimento tanto em CG como em DMG. No estudo desenvolvido por Santos (2013), com girinos de *Physalaemus cuvieri* e *Hypsiboas faber*, as baixas proporções entre nitrogênio e fósforo (valores médios da ordem de 1:1 até 5:1) foram utilizadas para justificar o baixo crescimento de girinos, já que favorecem o *bloom* de cianobactérias (ODUM, 2012), que são, na maioria das vezes, impalatáveis, e até mesmo tóxicas pela produção de cianotoxinas. A impalatabilidade das algas pode ter resultado em baixas taxas de alimentação gerando baixas taxas de metamorfose tanto em CG quanto em DMG, já que ambos os tratamentos apresentaram baixas proporções de N:P (valores médios de 4:1 e 5:1, respectivamente)

O desenvolvimento dos girinos tende a ser mais rápido em condições de menor densidade (RELYEA; DIECKS, 2008). Diversos trabalhos indicam que a densidade ideal para a criação de girinos de rã-touro é entre 0,5 e 2 indivíduos por litro (CASTRO; PINTO, 2000; FERREIRA et al., 2001; FLORES-NAVA; VERA-MUÑOZ, 1999;), já que nessa densidade foi observada ausência de competição e canibalismo, pois os recursos presentes no ambiente são suficientes para suprir a necessidade nutricional. Densidades que ultrapassam esses valores tendem a criar interações competitivas entre os indivíduos, influenciado negativamente no crescimento e tamanho corporal e metamorfose. A densidade de 0,4 indivíduos/litro nesse estudo respeitou esse limite em ambos os tratamentos, não havendo competição por alimento entre os girinos, o que não justifica o baixo crescimento e taxa de metamorfose.

No trabalho desenvolvido por Storrs e Kieseker (2004), os autores concluíram que quando girinos de *Pseudacris crucifer*, *Lithobates clamitans* e *Rana sylvatica* são expostos por um longo período de tempo (30 dias) a baixas concentrações de atrazina que não causam mortalidade, essas concentrações são capazes de causar efeitos mais danosos em longo prazo do que concentrações mais altas. Os autores sugerem que os animais expostos às concentrações mais baixas morreram antes dos que foram expostos as concentrações mais altas, provavelmente porque esta última favoreceu os mecanismos de defesa mais intensos nesses animais, fazendo com que a tolerância à exposição em longo prazo fosse maior. No caso das concentrações menores, as consequências iniciais são mais imperceptíveis a ponto de serem irreversíveis ao final do experimento. Esse comportamento mostra-se como característico de produtos desreguladores endócrinos (STORRS; KIESEKER, 2004).

No trabalho de Relyea e Diecks (2008), o malathion foi testado em doses subletais múltiplas em mesocosmos em um período de 79 dias em girinos de *Rana sylvatica* e *Rana pipiens*. Os resultados encontrados por esses autores foram bastante semelhantes ao encontrado neste estudo para o Vertimec® 18CE. O malathion agiu diretamente na comunidade zooplanctônica, estimulando um *bloom* de fitoplâncton, com declínio da comunidade perifítica, causando um efeito em cascata. No presente estudo perifíton não foi analisado, mas Relyea e Diecks (2008) concluíram que essa comunidade teve efeito insignificante nas larvas de anfíbios de *R. sylvatica*, com pequeno período larval (rápida metamorfose), mas em larvas de L. *pipiens*, que demoram mais tempo para metamorfosearem, a redução desta comunidade causou efeitos no desenvolvimento e crescimento de girinos, levando até a mortalidade de alguns indivíduos. Os autores encontraram resultados semelhantes aos encontrados em DMG, com o malathion não causando mortalidade dos

girinos, mas gerando efeitos na cascata trófica. No trabalho de Bulen e Distel (2011), testando o efeito do carbaril na cadeia alimentar, não foi observado efeito do contaminante na comunidade perifítica no período de 89 dias.

Em trabalho realizado por Boone et al. (2001) os autores concluíram que não houve diferença significativa nos efeitos gerados a girinos de *Lithobates clamitans* com uma aplicação única e múltipla do agrotóxico carbaril. No presente estudo, a aplicação única em dose mais alta do que a aplicação múltipla foi responsável pela morte de todos os girinos de *L. catesbeianus* expostos em um curto período. Infelizmente a aplicação de 0,002 $ml.L^{-1}$ foi feita somente em dose múltipla, não podendo ser comparado os efeitos em longo prazo da aplicação única dessa concentração.

A concentração utilizada no tratamento de dose múltipla, como já explicado anteriormente, refere-se à concentração encontrada na analise cromatográfica de uma amostra de *run off*, pertencente à água escoada de uma região com aplicação direta do Vertimec® 18CE (NOVELLI, 2010), ou seja, representa 100% da concentração do Vertimec® 18CE escoada superficialmente (0,002 $ml.L^{-1}$). Em relação à concentração utilizada na aplicação única (0,008 $ml.L^{-1}$ – CL_{50}, 96h), esta representa um valor muito superior ao esperado de ser encontrado em áreas agrícolas, podendo ser utilizada somente para efeito de comparação com organismos de diferentes classes. Entretanto, como discutido anteriormente, a interação do produto com fatores bióticos e abióticos (inclusive outros agrotóxicos) pode fazer com que sua toxicidade no ambiente natural seja agravada.

O trabalho de França-Salgueiro (2013), onde foram testados os agrotóxicos bentazon, permetrina e carbofuran, utilizados em culturas de arroz, demonstrou que em testes laboratoriais a $CL_{50,}$ 96h encontrada para girinos de *L. catesbeianus* foi muito superior às concentrações dos agrotóxicos encontradas comumente em campos agrícolas, o que demonstra a alta resistência da espécie aos efeitos agudos dessa substância.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o tempo de estudo não foi suficiente para observar plenamente o potencial de recuperação do ambiente (comparado às condições iniciais), já que para algumas variáveis a reestabilização dos valores só foi observada na última coleta, às 480 horas, e para outras esse processo não pôde ser observado.

O desenvolvimento de experimentos em mesocosmos ainda é raro em ambientes tropicais sul americanos, possivelmente devido à complexidade e infraestrutura necessária para o desenvolvimento dos mesmos (GARCIA et al., 2008). Um dos motivos que torna esses estudos em ambientes naturais ou artificiais pouco difundidos é a grande quantidade de produtos que necessitam serem analisados todos os anos por órgão de monitoramento, o que

torna muito mais fáceis, baratos e práticos os estudos laboratoriais (BOONE; JAMES, 2005). Pouco se encontra na literatura a respeito do comportamento das variáveis limnológicas em experimentos em mesocosmos quando comparados aos estudos laboratoriais. Mas vale ressaltar a importância desses dados, levando-se em conta a validação dos experimentos e o grau de relevância ecológica, já que alterações dessas variáveis podem resultar em compostos tóxicos secundários, bem como condições adversas para organismos aquáticos.

8.3 A utilização de anfíbios em testes de toxicidade laboratorial e *in situ*

Os anfíbios agem como indicadores da saúde de um ecossistema (SPARLING et al., 2010). São animais que muitas vezes se caracterizam por serem espécies chave (SCHIESARI et al., 2009), sendo que declínios nessas populações são responsáveis por causar desequilíbrio em todas as comunidades pertencentes àquele sistema.

Apesar dos estudos no campo da ecotoxicologia de anfíbios virem crescendo nos últimos anos, ainda são muito escassos quando comparados a outros táxons e frente à importância desses organismos na natureza (SPARLING et al., 2010). Devido a deficiência nos dados de toxicidade em anfíbios, como forma de extrapolar os possíveis efeitos de xenobióticos causados a este grupo, alguns autores têm se utilizado de dados obtidos para peixes, tendo como referência que os danos causados a espécies de peixes mais sensíveis refere-se às concentrações capazes de protegerem também anfíbios (EPA, 2001 apud BROOMHALL, 2005; JONES et al., 2004 apud HAMMOND et al., 2012). Porém, têm-se conhecimento de que existem grandes diferenças quanto à sensibilidade entre diferentes espécies e grupos taxonômicos, inclusive em relação aos *end points* atingidos pelos compostos para cada espécie/grupo estudado, o que pode gerar resultados bastante divergentes.

A variação inter e intraespecífica tem sido observada entre diversos táxons no que diz respeito à resistência a estressores ambientais naturais e compostos químicos. Bridges e Semlistch (2000) demonstraram que houve uma variabilidade geográfica em relação ao tempo de morte e comportamento entre diferentes populações de *Rana sphenocephala* expostas ao agrotóxico carbaril, bem como dentre nove diferentes espécies de ranídeos.

Diversos fatores são responsáveis por essa variabilidade. Como os anfíbios apresentam grande dificuldade de reprodução em laboratório, as diferenças nas características dos locais onde os animais são coletados, por exemplo, podem resultar em diferenças nos resultados encontrados. Em locais onde houve declínio de populações de determinadas populações anfíbias é esperado que as populações que ainda vivem ali sejam adaptadas a situações

adversas, mesmo depois de um longo período, sendo mais tolerantes à contaminação por compostos químicos (BRIDGES; SEMLISTCH, 2000), portanto, menos sensíveis aos testes. A exposição a agrotóxicos em diferentes fases da vida também é responsável por produzir taxas de sobrevivência e tamanho significativamente diferentes, com diferenças na sensibilidade de acordo com o estágio de desenvolvimento e as espécies utilizadas (HARRIS et al., 2000; ORTIZ-SANTALIESTRA et al., 2006; STORRS; KIESEKER, 2004), assim como descrito anteriormente.

A ausência da padronização de normas mais abrangentes dos testes ecotoxicológicos para anfíbios também contribui para que diferentes repostas sejam alcançadas. Atualmente, essa padronização limita-se basicamente às normas dos testes FETAX (ASTM, 2004) e AMPHITOX (HERKOVITS; PÉREZ-COLL, 1999) (SPARLING et al., 2010). O teste FETAX (ASTM, 2004) utiliza embriões de *Xenopus laevis* e foi originalmente desenvolvido para teste de teratogenicidade. Segundo Broohmall (2005) esse modelo não pode ser transposto para outros modos de toxicidade química, como efeitos em longo prazo de desenvolvimento, mudanças comportamentais ou desregulação endócrina. Além disso, devido à grande variabilidade interespecífica e por ser muito diferente da maioria da outras espécies de anfíbios, *X. laevis* não pode ser representativa da resposta desse grupo. O AMPHITOX é um teste laboratorial desenvolvido por Herkovits e Pérez-Coll (1999), que é similar ao FETAX (ASTM, 2004), mas permite maior flexibilidade na escolha do estágio de desenvolvimento e da espécie utilizada (SPARLING et al., 2010). Diante disso, o desenvolvimento de testes ecotoxicológicos com diferentes espécies torna-se necessário a fim de buscar um leque de espécies com padronizações satisfatórias para os diversos modos de ação dos diferentes contaminantes e *end points* atingidos.

Os contaminantes químicos não são estáticos e nem capazes de causar estresse homogêneo, já que sua presença no ambiente varia em escalas temporais e espaciais (BRIDGES; SEMLISTCH, 2000). Dessa forma, a variação na resposta dos organismos pode ser fruto dessa variabilidade por parte do contaminante. O impacto dos agrotóxicos sobre os girinos depende de como as toxinas alteram diretamente a saúde destes e como os contaminantes afetam direta ou indiretamente os recursos disponíveis (GRONER; RELYEA, 2011). Alguns autores (BOONE et al., 2007; BULEN; DISTEL, 2011; MILLS; SEMLITSCH 2004; RELYEA 2006;) demonstraram que a utilização de compostos tóxicos não afeta o sucesso de espécies anfíbias somente quando interferem nas taxas de sobrevivência destes animais, mas também, como encontrado no presente estudo, quando atingem recursos disponíveis, influenciando no comportamento, crescimento e desenvolvimento dos girinos.

Portanto, para se obter resultados satisfatórios em estudos ecotoxicológicos com anfíbios diversos *end points* precisam ser avaliados, inclusive efeitos indiretos, que são aqueles que afetam um componente do ecossistema e que acabam por atingir a espécie de interesse (SPARLING et al., 2010).

Os *end points* geralmente utilizados em testes ecotoxicológicos com anfíbios são: mortalidade, comportamento, crescimento larval, nível de atividade, tempo e tamanho na metamorfose, má formação e estágios de desenvolvimento atingidos (SPARLING et al., 2010), os quais podem ser resultantes tanto de efeitos diretos como de efeitos indiretos. Estudos mais específicos, como perfil leucocitário, análise de órgãos e tecidos, análises bioquímicas, celulares e moleculares (BROOMHALL, 2005; WEIS et al., 2001) são desejáveis e podem ajudar a entender e avaliar diversos efeitos e mecanismos dos contaminantes nas espécies estudadas, funcionando como biomarcadores (WESS et al., 2001).

Em agrotóxicos com capacidades de causar efeitos neurotóxicos, por exemplo, é importante que alterações comportamentais sejam observadas, como a ausência de respostas quando estimulados, nível de atividade e perda da postura de equilíbrio (FORDHAM et al., 2001), uma vez que são capazes de causar alterações diretas no sistema nervoso central e periférico dos girinos (WEIS et al., 2001), interferindo nas ligações sinápticas e impedindo a resposta dos organismos a estímulos (SPARLING et al., 2010).

Outros agrotóxicos que agem como desreguladores endócrinos podem interferir no sistema reprodutor e serem causadores de má formação, alterar a função hormonal através da interferência na ligação dos receptores nas células, além de interferirem no sistema imunológico, podendo ser tóxicos mesmo em concentrações muito baixas (BILA; DEZOTTI, 2007; WEIS et al., 2001). Um dos principais efeitos da atrazina, por exemplo, está relacionado a má formação gonadal, que pode levar ao hermafrodismo da espécie (HAYES et al., 2003). Desta forma, é importante que outras análises, como anomalias testiculares, morfologia e histologia gonadal, sejam incluídas no estudo utilizando esse tipo de agrotóxico (SPARLING et al., 2010). O comportamento também é um tipo de resposta que tem ligações diretas com o nível bioquímico, podendo indicar efeitos sobre toda população, inclusive na comunidade, já que comportamento reprodutivo normal, por exemplo, é essencial para a manutenção de tamanho e estrutura de uma população (WEIS et al., 2001).

Além da análise da utilização do anfíbio como organismo teste e dos *end points* avaliados, merece discussão a diferença que existe entre os testes laboratoriais e *in situ.* Os testes laboratoriais, por mais que sejam essenciais para obter dados direcionadores de testes definitivos, não fornecem informações sobre os efeitos indiretos que podem influenciar a

sobrevivência e o sucesso da espécie em estudo, tais como interações competitivas, ciclagem de nutrientes e a dinâmica de populações (BROMMHALL, 2005). A utilização desses testes nos permite identificar mecanismos de toxicidade dos agrotóxicos e de outros componentes tóxicos, porém existem numerosos resultados obtidos em laboratório que conflitam com resultados em mesocosmos (SPARLING et al., 2010). A análise das interações que ocorrem entre as espécies, direta e indiretamente (e com os fatores bióticos e abióticos), é de suma importância para avaliar quais fatores são responsáveis pelo desequilíbrio do sistema.

Por exemplo, o agrotóxico carbaril, que não é considerado tóxico a anfíbios em uma determinada concentração (BRIDGES; SEMLISTCH, 2000), quando em contato com radiação ultravioleta pode ter sua toxicidade aumentada, como foi observado em laboratório por Zaga et al. (1998 – apud SPARLING et al., 2010). Porém, essa mesma situação, quando observada em campo por Bridges e Boone (2003), não apresentou os mesmos efeitos, sendo menos tóxico do que no trabalho anterior. No trabalho de Relyea (2006), utilizando o mesmo agrotóxico, observou-se efeito menos agressivo a girinos de *L. catesbeianus* e *L. clamitans* em experimentos utilizando mesocosmos do que em condições laboratoriais.

Os ensaios de laboratório, com renovação total ou parcial da solução (essencial para manutenção de condições ideais de sobrevivência), mantêm os animais expostos a concentrações constantes dos compostos em estudo (RELYEA, 2006; REEVE et al., 2013), não sendo possível observar comportamentos semelhantes ao habitat natural, onde esses compostos sofrem redução gradativa, diminuindo o risco e a exposição, ou ocasionam a formação de compostos secundários, algumas vezes potencialmente mais tóxicos (ORTIZ-SANTALIESTRA et al., 2006). Além disso, por estarem constantemente sujeitos à ação do agrotóxico em laboratório, os organismos podem adaptar-se a situações adversas, mostrando-se mais resistentes. Bridges e Semlitsch (2000) concluíram que algumas espécies estudadas que apresentavam declínio no ambiente natural, foram menos sensíveis a compostos químicos em laboratório.

No presente estudo foi possível verificar diferença significativa de uma mesma concentração do Vertimec® 18CE em girinos de rã-touro aplicada em campo e laboratório. Observou-se que a concentração capaz de causar mortalidade a 50% dos indivíduos em 96 horas de experimento em laboratório foi responsável pela mortalidade de todos os indivíduos em um intervalo menor que 24 horas, sendo o produto mais tóxico quando estudado em campo.

Observou-se no experimento em mesocosmos uma tendência dos girinos expostos ao Vertimec® 18CE (DMG – dose múltipla com girinos) apresentarem peso menor do que o

valor inicial e também em relação ao grupo controle, fato que não foi observado em laboratório (o maior peso é apresentado em 0,002 $ml.L^{-1}$, sem diferença significativa em relação aos demais tratamentos). Relyea (2006), em comparação feita entre estudos laboratoriais e em mesocosmos, destaca que essa diferença observada no crescimento é mais visível em ambiente natural, pois esse parâmetro é mais influenciado indiretamente por fatores bióticos e abióticos que possam ser afetados pelo agrotóxico e que afetem os organismos indiretamente, do que por um composto tóxico diretamente.

Os estudos realizados em mesocosmos oferecem maior representatividade ecológica do que estudos laboratoriais, pois tratam das interações ambientais de forma mais dinâmica e realista, e ainda permitem a monitoração de múltiplos fatores (SPARLING et al., 2010), destacando assim a importância dos testes de toxicidade *in situ*. Entretanto, ao mesmo tempo em que esses estudos possibilitam condições de exposição mais realísticas do que no laboratório, estão sujeitos a um alto grau de variabilidade entre as réplicas (SPARLING et al., 2010). Essa variabilidade torna-se ainda maior com o aumento das escalas espacial e temporal (CAIRNS, 1995). Quanto maior o realismo do experimento e a complexidade de um sistema, menores se tornam as chances de replicabilidade (GRANEY et al, 1995). Entretanto, embora em alguns estudos as unidades experimentais consideradas réplicas não possam ser denominadas dessa forma, tal fato não invalida o experimento e permite que o pesquisador interprete seus dados dentro dos limites de seu desenho experimental (GRANEY et al., 1995). Gusmão (2004) salienta que o alto custo envolvido na montagem e execução de experimentos em mesocosmos, associado à facilidade de perda de estruturas experimentais causadas por interferências indesejadas, dificulta ainda mais a replicação dos sistemas.

9. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nesse estudo e em diversos outros em que foram obtidos resultados com grande contribuição para o campo da ecotoxicologia (FORDHAM et al., 2001; FERREIRA et al., 2004; FRANÇA-SALGUEIRO, 2013; LOMBARDI et al., 2002; RELYEA, 2004; 2006; RELYEA et al., 2005; OSSANA et al., 2013; ROWE et al., 1998), é possível concluir que *Lithobates catesbeianus*, a rã-touro, trata-se de uma espécie representativa dos anfíbios com grande potencial para estudos ecotoxicológicos, tanto pela disponibilidade (devido a sua criação para fins comerciais) quanto pelas características peculiares, como tamanho, fácil manutenção em laboratório e grande potencial de indicação das condições ambientais. Essas características tornam viável a utilização dessa espécie, indicando que *L. catesbeianus*, em fase de girino, tem potencial de utilização nesses estudos (aceita-se a **primeira hipótese**). No entanto, é essencial que sejam definidos os *end points* a serem analisados, a fim de se obter resultados satisfatórios, e que ocorram análises complementares aos testes ecotoxicológicos, bem como a utilização de diferentes espécies anfíbias, além de espécies pertencentes a outros táxons.

Para que sejam observados efeitos durante o processo metamórfico em *L. catesbeianus* é desejável que sejam formulados experimentos com duração superior a 20 dias, devido ao longo período larval da espécie. Segundo resultados obtidos por França-Salgueiro (2013), em ensaios com duração de 14 dias, a autora concluiu que a metamorfose não se demonstrou como uma técnica adequada para avaliar o efeito de herbicidas utilizados na cultura de arroz em girinos de rã-touro devido ao grande tempo necessário para atingir o clímax metamórfico. No presente estudo (20 e 24 dias, campo e laboratório, respectivamente) também não foi observada taxa de metamorfose significativa em nenhum dos dois tratamentos (contaminado e controle), o que dificultou e/ou inviabilizou a observação de resultados envolvendo o processo metamórfico, como cálculos da duração do período larval e tamanho dos metamorfoseados, não sendo *end points* relevantes. Conclui-se ainda que o tempo de experimento em campo não foi suficiente para que houvesse reestabilização das condições limnológicas iniciais dos mesocosmos, principalmente nos tratamentos que contavam com a intervenção dos girinos,

Os girinos de *L. catesbeianus* no estágio 25G mostraram-se mais resistentes ao Vertimec® 18CE em comparação a estágios menos desenvolvidos e a espécies pertencentes a outros grupos taxonômicos, como *D. rerio* (peixes – NOVELLI et al., 2012b), *C. silvestrii* (microcrustáceo – CASALI-PEREIRA, 2013) e *C. sancticaroli* (inseto - RAMOS, 2013), mas não a *Hydra viridissima* (cnidário – RAMOS, 2013) e *Girardia tigrina* (platelmintos - RAMOS, 2013). Para o estágio 21G houve exceção somente em relação a *D. rerio*, em que a

sensibilidade dos girinos ao agrotóxico apresentou valores próximos ao encontrado por Mendes (2011) em 48 horas de experimento. Diante desses dados, os girinos dessa espécie em estágios iniciais de desenvolvimento são sugeridos como os mais indicados para utilização em testes ecotoxicológicos, já que se presume que concentrações que não sejam prejudiciais a esses estágios serão improváveis de causar efeitos negativos em indivíduos mais desenvolvidos e em outros grupos taxonômicos.

A **segunda hipótese** não pode ser confirmada, pois as variações de respostas em dose única e múltipla não foram observadas, já que girinos expostos a uma única aplicação do Vertimec® 18CE não sobreviveram ao início do experimento em mesocosmos. A aplicação múltipla do agrotóxico foi responsável por causar um desequilíbrio nas concentrações de nutrientes nas unidades experimentais, principalmente em relação à deposição de nitrogênio e fósforo total no sedimento, tornando-os mais tóxicas para microcrustáceos quando comparado ao tratamento em dosagem única.

Nos tratamentos com manipulação do agrotóxico em mesocosmos em que não foi observada mortalidade significativa (DMG – dose múltipla com girinos), houve influência indireta do Vertimec® 18CE no desenvolvimento e crescimento dos girinos de rã-touro, fazendo com que a **terceira hipótese** fosse aceita. Pôde-se observar que houve influência direta do contaminante em variáveis capazes de gerar respostas nos girinos, sendo esta mais significante do que o efeito direto do agrotóxico. A comparação dentro de cada estágio de desenvolvimento entre os dois tratamentos do mesocosmo demonstrou girinos maiores no tratamento com Vertimec® 18CE, indicando aumento de peso sem a mudança para estágios mais desenvolvidos, possivelmente devido a limitações fisiológicas e/ou pela qualidade e disponibilidade de recursos.

A partir dos resultados obtidos nos testes laboratoriais e *in situ*, verificou-se que a interação do Vertimec® 18CE com fatores bióticos e/ou abióticos intensificou a sua toxicidade, fazendo com que fosse mais agressivo em campo, causando mortalidade total para o tratamento de dosagem única (CL_{50}, 96 h calculada em laboratório) em um período inferior a 24 horas e diminuição de peso no tratamento em dosagem múltipla quando comparado aos estudos laboratoriais, sendo aceita também a **quarta hipótese**. Com a inserção de um novo lote de girinos após esse período, seguido novamente de 100% de mortalidade, pôde-se concluir que o tempo de meia vida de Vertimec® 18CE nos experimentos em campo foi superior a 24 horas.

Além disso, através dos estudos realizados em mesocosmos foi possível avaliar toda a dinâmica populacional, bem como a influência de fatores bióticos e abióticos não

manipulados. Foi possível ainda aferir sobre o papel central do girino na cadeia alimentar e sua influência direta no equilíbrio e condições do sistema (predação e excreção de nutrientes que influenciaram as características do meio). O método de estudo utilizado nos mesocosmos (enclausuramento) também pode ter influenciado nas condições de estudo.

A concentração encontrada nesse estudo, responsável por causar mortalidade em 50% dos girinos de *L. Catesbeianus* no estágio 25G (0,00769 $ml.L^{-1}$) expostos em laboratório, é muito superior ao que pode ser encontrado no ambiente (0,002 $ml.L^{-1}$ – NOVELLI, 2010). Os resultados obtidos em laboratório demonstraram que a concentração ambiental não é capaz de causar influência direta no desenvolvimento, crescimento e sobrevivência de girinos no estágio 25G, mas está próxima a concentração capaz de causar letalidade aos recém-eclodidos (21G). Porém, quando testada em campo, produz efeito indireto no desenvolvimento desses organismos.

Entretanto, vale ressaltar que mesmo que as concentrações esperadas no ambiente não causem mortalidade a girinos de rã-touro, podem ser responsáveis por efeitos indiretos no desenvolvimento de anfíbios (e talvez, em longo prazo, na sobrevivência), além de afetarem a base da cadeia alimentar, podendo causar desequilíbrio, gerando um cenário de estresse múltiplo, como demonstra nosso estudo em mesocosmos. Além disso, a interação do agrotóxico com fatores ambientais (bióticos e abióticos) e outros estressores de anfíbios (demais compostos e espécies), pode fazer com que ocorra aumento do potencial de toxicidade do produto em questão.

A relevância do presente estudo se destaca pelo fato de que em revisão feita por Kopp et al. (2007), entre os anos de 1980 e 2007, e por Sparling et al. (2010), entre os anos de 2000 e 2009, a respeito dos estudos ecotoxicológicos envolvendo anfíbios (efeitos de pesticidas em anfíbios), não foi encontrado nenhum trabalho utilizando abamectina em qualquer espécie anfíbia. Além disso, há importância metodológica, com comparações entre as concentrações utilizadas em campo e laboratório e diferentes grupos taxonômicos.

10. REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TECNICA. NBR 15088. **Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com peixes.** 14p., 2004.

ADAMS, W. J. Aquatic Toxicology Testing Methods. In: HOFFMAN, D. J. et al. **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton, Lewis Publishers. Cap. 13, p. 25-46, 1995.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2009. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/

ALLRAN, J. W.; KARASOV, W. H. Effects of atrazine and nitrate on northern leopard frog (Rana pipiens) larvae exposed in the laboratory from posthatch through metamorphosis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 11, p. 2850-2855, 2000.

ANDERSEN, J.M. An ignition method for determination of total phosphorus in lake sediments. **Water Research**, v. 10, p. 329-331, 1976.

APHA - American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 17ª Ed.,Washington. D.C., p. 81-143, 1989.

APHA - American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 19ª Ed. Washington D. C., 1268 p., 1995.

ARAÚJO, C. V. M. et al. Preference and avoidance responses by tadpoles: the fungicide pyrimethanil as a habitat disturber. **Ecotoxicology**, 2014. No prelo.

ARAÚJO, C. V. M.; BLASCO, J.; MORENO-GARRIDO, I. Measuring the avoidance behaviour shown by the snail Hydrobia ulvae exposed to sediment with a known contamination gradient. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 750-758, 2012.

ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 975-982, 2005.

ASTM - American Society for Testing and Materials. Active standard: E1439-98. **Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX),** 16 p., 2004.

BASSOLI F.; ROLAND F. Caminhos da produção fitoplanctônica em ecosistemas aquáticoss continentais. In: Roland, F.; Cesar D.; Marinho, M. (Eds). **Lições de Limnologia.** São Carlos: RiMa, p. 173-191, 2005.

BAUDO, R. Ecotoxicological testing with Daphnia. **Instituto Italaino de Idrobiologia**, v. 45, p. 461-482, 1987.

BERTOLETTI, E. **Estimativa de efeitos tóxicos crônicos com Danio rerio (Pisces, Cyprinidae).** 2000, 118 f.. Tese (Doutorado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química Nova**, São Paulo , v. 30, n. 3, June 2007

BIRGE, W. J.; WESTERMAN, A. G.; J. A. SPROMBERG. Comparative toxicology and risk assessment of amphibians. 2000. In: SPARLING, D. W. et al. (Eds). **Ecotoxicology of amphibians and reptiles**. 2nd Edition, Pensacola, FL, 2010, 916 p.

BISHOP, C. A. et al. Anuran development, density and diversity in relation to agricultural activity in the holland river watershed, ontario, canada (1990–1992). **Environmental Monitoring and Assessment 57:**, v. 57, p. 21-43, 1999.

BOESTEN, J. J. T. I. et al. Conceptual model for improving the link between exposure and effects in the aquatic risk assessment of pesticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 291-308, 2007.

BOONE, M. D. et al. Multiple stressors in amphibian communities: effects of chemical contamination, bullfrogs, and fish. **Ecological Applications**, v. 17, n. 1, p. 229-301, 2007.

BOONE, M. D.; BRIDGES, C. M.; ROTHERMEL, B. B. Growth and development of larval green frogs (Rana clamitans) exposed to multiple doses of an insecticide. **Oecologia**, v. 129, p. 518-524, 2001.

BOONE, M. D.; JAMES, S. M. Aquatic ans terrestrial mesocosms in amphibian ecotoxicology. **Applied herpetology**, v. 2, p. 231-257, 2005.

BOONE, M. D.; SULLIVAN, N. H. Impact of an insecticide changes with amount of leaf litter input: implications for amphibian populations. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 31, n. 7, p. 1518-24, jul. 2012.

BRIDGES, C. M. et al. Comparative Contaminant Toxicity: Are Amphibian Larvae More Sensitive than Fish? **Bulletin of Environmental Contamaminant and Toxicology**, v. 69, p. 562-569, 2002.

BRIDGES, C. M.; BOONE, M. D. The interactive effects of UV-B and insecticide exposure on tadpole survival , growth and development. **Biological Conservation**, v. 113, p. 49-54, 2003.

BRIDGES, C. M.; SEMLITSCH, R. D. 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.

BROOMHALL, S. D. Measuring chemical impacts on amphibians: Ecotoxicity and behavioural data in governmental regulation. **Applied Herpetology**, v. 2, p. 259-285, 2005.

BROWN, C. D. et al. Morphological and physico-chemical properties of British aquatic habitats potentially exposed to pesticides. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 113, p. 307-319, 2006.

BUENO-GUIMARAES, H. M. et al. Tadpole Epithelium Test: Potential Use of Rana catesbeiana Histopathologic Epithelial Changes to Evaluate Aquatic Pollution. **Bulletin of Environmental Contamaminant and Toxicology**, n. 67, p. 202-209, 2001.

BULEN, B. J.; DISTEL, C. A. Carbaryl concentration gradients in realistic environments and their influence on our understanding of the tadpole food web. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 60, n. 2, p. 343-50, fev. 2011.

CAIRNS, J.J. NIEDERLEHNER, B.R. **Ecological toxicity testing**. London: Lewis Publishers, 1995, 228p.

CAMPBELL, W. C. **Ivermectin and abamectin**. New York: Springer Verlag, 1989. 363p.

CAQUET, TH. et al. Outdoor Experimental Ponds (Mesocosms) Designed for Long-Term Ecotoxicological Studies in Aquatic Environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 34, p. 125-133, 1996.

CARLSON, R. E. A Trophic State Index for Lakes. **Limnology and Oceanography**, v. 22, n. 2, p. 361-369, 1977.

CARNEIRO, F F; et al. Dossiê ABRASCO –Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. **ABRASCO**, Rio de Janeiro, 2012. 1ª Parte. 98p.

CARPENTER, S. R.; KITCHELL, J. F.; HODGSON, J. R. Cascadmg Trophic Interactions and Lake Productivity: Fish predation and herbivory can regulate lake ecosystems. **BioScience**, v. 35, n. 10, p. 634-639, 2007.

CASALI-PEREIRA, M. P. **Efeitos do agrotóxico Vertimec® 18 EC para o zooplâncton e fitoplâncton: análises laboratoriais com o produto comercial e amostras de mesocosmos artificialmente contaminados**. 2013, 195 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

CASTRO, J. C.; PINTO, A. T. Qualidade da Água em Tanques de Girinos de Rã Touro, Rana catesbeiana Shaw, 1802, Cultivados em Diferentes Densidades de Estocagem. **Revista brasileira de zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 1903-1911, 2000.

CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. (2013). Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/agua/aguas-superficiais/aguas-interiores/documentos/indices/04.pdf> Acesso em 12 de novembro de 2013.

CHAPMAN, P. M. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. **Marine pollution bulletin**, v. 44, n. 1, p. 7-15, jan. 2002.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA 357 – 17 de março de 2005. Disponível em http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=693. Acesso em janeiro de 2014

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA 454 – 01 de novembro de 2012. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em janeiro de 2014.

CREWS, T. E.; PEOPLES, M. B. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. **Agriculture Ecosystems and Environment**, v. 102, p. 279-297, 2004.

CUNHA, J. P. A. R. et al. Avaliação de estratégias para redução da deriva de agrotóxicos em pulverizações hidráulicas. **Planta Daninha**, v. 21, n. 2, p. 325-332, 2003.

DAEHLER, C. C.; STRONG, D. R. Can you bottle nature? The roles of microcosms in ecological research. **Ecology**, v. 77, n. 3, p. 663-664, 1996.

DAVIDSON, C.; SHAFFER, H. B.; JENNINGS, M. R. Spatial Tests of the Pesticide Drift, Habitat Destruction, UV-B, and Climate-Change Hypotheses for California Amphibian Declines. **Conservation Biology**, v. 16, n. 6, p. 1588-1601, 2002.

DISTEL, C. A.; BOONE, M. D. Effects of aquatic exposure to the insecticide carbaryl and density on aquatic and terrestrial growth and survival in american toads. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 8, p. 1963-1969, 2009.

DORES, E. F. G. C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E.M.. Contaminação do Ambiente Aquático por Pesticida: Vias de Contaminação e Dinâmica dos Pesticidas no Ambiente Aquático. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 9, p. 1-18., 1999.

DORNFELD, C. B. et al. Comparação de Bioensaios Laboratoriais e "in situ" Utilizando Chironomus xanthus na Avaliação da Toxicidade de Sedimentos do Rio Monjolinho (São Carlos, SP). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, n. 2, p. 161-165, 2006.

EDWARDS, C. A.. **Persistent pesticides in the environment.** 2. ed. U.S.A.: *CRC Press*, 1973, 170p.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro, Ed. Interciência/FINEP, 3 ed. 2011, 545p.

FERREIRA, C. M. **Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de rã-touro (Rana catesbeiana Shaw, 1802) como animais sentinelas.** 2002, 117 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

FERREIRA, C. M. et al. Effects of Copper Oxychloride in Rana catesbeiana Tadpoles: Toxicological and Bioaccumulative Aspects. **Bulletin of Environmental Contamaminant and Toxicology**, v. 73, p. 465–470, 2004.

FERREIRA, C.M.; PIMENTA, A.G.C; PAIVA-NETO, J.S. Introdução à Ranicultura. Boletim Técnico do Instituto de Pesca, n. 33, 14 p. 2001.

FISHER, M. H.; MROZIK, H. Chemistry. In: CAMPBELL, W. **Ivermectin and Abamectin**. Springer Verlag., cap. 1, p. 1-23, 1989.

FLORES-NAVA, A.; VERA-MUÑOZ, P. Growth, metamorphosis and feeding behaviour of Rana catesbeiana Shaw 1802 tadpoles at different rearing densities. **Aquaculture Research**, v. 30, p. 341-347, 1999.

FORDHAM, C. L. et al. EFFECTS OF MALATHION ON SURVIVAL, GROWTH, DEVELOPMENT, AND EQUILIBRIUM POSTURE OF BULLFROG TADPOLES (RANA CATESBEIANA). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 179-184, 2001.

FRANÇA-SALGUEIRO, F. M. **Avaliação da toxicidade de agrotóxicos utilizados na cultura do arroz irrigado para girinos de Lithobates catesbeianus**. 2013, 101 f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

FREITAS, L.D. **Heterogeneidade espacial e temporal do zooplâncton em sistemas lóticos e lentos da bacia hidrográfica do Lobo (Itirapina, Brotas - SP).** 2012, 144 p. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

GAHL, M. K.; PAULI, B. D.; HOULAHAN, J. E. Effects of chytrid fungus and a glyphosate-based herbicide on survival and growth of wood frogs (Lithobates sylvaticus). **Ecological Applications**, v. 21, n. 7, p. 2521-2529, 2011.

GARCIA, M. et al. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. **Environmental Pollution**, v. 153, n. 2, p. 450-456, 2008.

GERVASI, S. S. et al. Experimental evidence for American bullfrog (Lithobates catesbeianus) susceptibility to chytrid fungus (Batrachochytrium dendrobatidis). **EcoHealth**, v. 10, n. 2, p. 166-71, jun. 2013.

GIOVANELLI, J. G. R.; HADDAD, C. F. B.; ALEXANDRINO, J. Predicting the potential distribution of the alien invasive American bullfrog (Lithobates catesbeianus) in Brazil. **Biol Invasions**, v. 10, p. 585-590, 2008.

GOLTERMAN, H.L.; CLYMO, R.S.; OHNSTAD, M.A.M. Methods for physical and chemical analysis of fresh water. 2 ed. Oxford: **Blackweel Scientific Publications**, 213p., 1978.

GONÇALVES, A. M. et al. Caracterização da atividade de fosfomonohidrolases da cauda de Lithobates catesbeianus durante a metamorfose. In: XXII Congresso de Iniciação Cientifica da UNESP, 2010, Jaboticabal. **Anais do XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2010. p. 2476-2479

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

GRANEY, R. L.; GIESY, J. P.; CLARK, J. R. Field studies. In: RAND, G. M. Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment. (2nd edition) Taylor; Francis, New York. p. 257-305, 1995.

GRONER, M. L.; RELYEA, R. A. A tale of two pesticides: how common insecticides affect aquatic communities. **Freshwater Biolog**, p. 1-14, 2011.

GULLEY, D. D.; BOELTER, A. M.; BERGMAN, H. L. Toxstat 3.4 Computer Program, 1994.

GUSMÃO, L. F. M. DE. **Efeitos do cobre e cromo na comunidade zooplanctônica: um estudo experimental em mesocosmos**. 2004, 268 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

HALLEY, B. A.; JACOB, T. A.; LU, A. Y. H. The environmental impact of the use of ivermectin: environmental effects and fate. **Chemosphere**, v. 18, p. 1543-1563, 2000.

HAMILTON, M.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearm Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity biossays. **Environmental Science and Technology,** v.11, p.714-719, 1977.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** 4(1): 9pp, 2001. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm> Acesso em setembro de 2013.

HAMMOND, J. I. et al. Phylogeny meets ecotoxicology: evolutionary patterns of sensitivity to a common insecticide. **Evolutionary applications**, v. 5, n. 6, p. 593-606, set. 2012.

HARRIS, M. L. et al. Species- and Age-Related Differences in Susceptibility to Pesticide Exposure for Two Amphibians, Rana pipiens, and Bufo americanus. **Bulletin of Environmental Contamaminant and Toxicology**, v. 64, p. 263-270, 2000.

HAYES, T. et al. Atrazine-Induced Hermaphroditism at 0.1 ppb in American Leopard Frogs (Rana pipiens): Laboratory and Field Evidence. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 4, p. 568-575, 2003.

HEATH, M. R.; SPEIRS, D. C.; STEELE, J. H. Understanding patterns and processes in models of trophic cascades. **Ecology letters**, p. 101-114, 27 out. 2013.

HERKOVITS, J.; PÉREZ-COLL, C. S. Bioensayos para test de toxicidade com embriones de anfíbios (“AMPHITOX”). **Ing Sanitaria y Ambiental.** v. 42, p. 24-30, 43: 50-55, 1999.

HOFFMAN, D. J. et al. **Handbook of ecotoxicology**. 2ª. ed., 2002. 1290 p.

HOSE, G. C.; VAN DEN BRINK, P. J. Confirming the species-sensitivity distribution concept for endosulfan using laboratory, mesocosm, and field data. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 47, n. 4, p. 511-20, nov. 2004.

HOULAHAN, J. E. et al. Quantitative evidence for global amphibian population declines. **Nature**, v. 404, p. 752-755, 2000.

HOWE, G. E.; GILLIS, R.; MOWBRAY, R. C. Effect of chemical synergy and larval stage on the toxicity of atrazine and alachlor to amphibian larvae. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 519-525, 1998.

JOHNSON W. W., FINLEY M. T. Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates. Resource publication 137, United States Fish and Wildlife Service, United States Department of the Interior,Washington, DC, 1980. In: HOFFMAN, D. J. et al. **Handbook of ecotoxicology**. 2ª. ed., 2002, p. 681-684.

KOPP, K. et al. Publicações Sobre Efeitos de Pesticidas em Anfíbios no Período de 1980 a 2007. **Revista Multiciência**, v. 8, p. 173-186, 2007.

KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In: GRASSOHOF, K. (ed). Methods of seawater analysis. **Verlag. Chemie. Weinhein**. p. 117-181, 1976.

LAMPARELLI, M. C. **Grau de trofia em corpos d'agua do estado de São Paulo: avaliação de métodos de monitoramento.** 2004, 238 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

LEBBORONI, M. et al. Potential use of anurans as indicators og biological quality in upstreams of Italy. **Amphibia-Reptilia**, v. 27, p. 73-79, 2006.

LOMBARDI, J. V. et al. Acute Toxicity of the Fungicide Copper Oxychloride to Tadpoles of the Bullfrog Rana catesbeiana. **Bulletin of Environmental Contamaminant and Toxicology**, v. 69, p. 415-420, 2002.

LOMBARDI, J. V. Fundamentos de Toxicologia Aquática. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. P. **Sanidade de Organismos Aquáticos**, São Paulo, Editora Varela, p.263-272, 2004.

MACKERETH, S. J. H.; HERON, J.; TALLING, J. S. Water analysis some revised methodsfor limnology. Kendal. **Freshwater Biology Association.** Scientific Publication, 36. Wilson and Sons, 117 p., 1978.

MAKI, A. W.; BISHOP, W. E. Chemical safety evaluation. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications.** Hemisphere. 1995, p. 619-635.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013. Agrofit, Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em 14 de dezembro de 2013.

MARCANTONIO, A. S. **Toxicidade do sulfato de cobre e do sulfato de zinco para rã-touro, Rana catesbeiana shaw, 1802: toxicidade aguda e crônica e parâmetros hematológicos**. 2005, 96 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

MARTINEZ, I. P.; HERRIIEZ, M. P. Growth and metamorphosis of Rana perezi larvae in culture : effects of larval density. **Aquaculture**, v. 142, p. 163-170, 1996.

MASUTTI, M. B. et al. Sensibilidade a Cobre e Cromo por Oreochromis niloticus e Pistia stratiotes. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 37-42, 2006.

McCAVERA, S.; WALSH, T. K.; WOLSTENHOLME, A J. Nematode ligand-gated chloride channels: an appraisal of their involvement in macrocyclic lactone resistance and prospects for developing molecular markers. **Parasitology**, v. 134, n. 8, p. 1111-21, 2007.

McCONNELL, L. L. et al. Wet deposition of current-use pesticides in the Sierra Nevada mountain range , California , USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, n. 10, p. 1908-1916, 1998.

McGRATH, E. A.; ALEXANDER, M. M., Observations on the exposure of larval bullfrogs to fuel oil, Trans. N.E. Sect. Wildl. Soc. 1979. In: HOFFMAN, D. J. et al. **Handbook of ecotoxicology**. 2ª. ed., 2002, 1290p.

MENDES, L. B. **Análise dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE em Danio rerio (Cypriniformes, Cyprinidae) por meio de estudos experimentais**. 2011, 109 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

MILLS, N. E.; SEMLITSCH, R. D. Competition and Predation Mediate the Indirect Effects of an Insecticide on Southern Leopard Frogs. **Ecological Applications**, v. 14, n. 4, p. 1041-1054, 2004.

MOREIRA-SANTOS M. et al. Avoidance tests with small fish: determination of the median avoidance concentration and of the lowest-observed-effect gradient. **Environmental Toxicology and Chemistry.** v. 27, p. 1575–1582, 2008.

MOUTINHO, M. F. **Ecotoxicidade comparativa dos herbicidas da cana-de-açúcar para larvas de anfíbios**. 2013, 120 f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

MURTY, A. S., 1988. *Toxicity of pesticide to fish*. Department of Zoology, University Nagarjunanasgar, Nagarjuna, India 1 (3): 178. In: HOFFMAN, D. J. et al. **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton, Lewis Publishers. 1995, Cap. 13, p. 25-46.

NASCIMENTO, M. R. L.; MOZETO, A. A. Soil and Sediment Contamination : An Reference Values for Metals and Metalloids Concentrations in Bottom Sediments of Tietê River Basin, Southeast of Brazil. **Soil & Sediment Contamination**, p. 269-278, 2008.

NIMMO, D.R. Pesticides. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications.** Hemisphere. 1995, p. 335-373

NOVELLI, A. **Efeito do Vertimec® 18CE e de seu princípio ativo, a abamectina, em ambiente aquático: uma análise laboratorial e in situ**. 2010. 168 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

NOVELLI, A. et al. Field and laboratory studies to assess the effects of Vertimecs 18EC on Daphnia similis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 75, p. 87-93, 2012(a).

NOVELLI, A. et al. Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms Daphnia similis, Chironomus xanthus and Danio rerio. **Chemosphere**, v. 86, p. 36-40, 2012(b).

NUNES, M. E. T. **Avaliação dos efeitos de agrotóxicos sobre a fauna edáfica por meio de ensaios ecotoxicológicos com Eisenia andrei (Annelida, Oligochaeta) e com comunidade natural de solo**. 2010, 151 f. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

NUNES, M. E. T.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Sensitivity of Eisenia andrei (Annelida , Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 1063-1071, 2012.

NUSH, E. Comparison of differents methods for chlorophyll and phaeropigments determination. **Archiv fuer Hydrobiologie**, v. 4, p. 14-36, 1980.

ODUM, E. P. **Ecologia.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2012

ODUM, E. P. The mesocosm. **BioScience**, vol. 34, n. 9, p. 558-562, 1984.

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development. Guidance document on simulated freshwater lentic field tests (outdoor microcosms and mesocosms). Paris: Organization for Economic Co-operation and Development, 37p. (ENV/JM/MONO(2006)17) 2006.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; MATOS, R.; JOS, F. Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. **Chemosphere**, v. 56, p. 369-374, 2004.

ORTIZ-SANTALIESTRA, M. E.; ADOLFO MARCO, M. J. F.; LIZANA, M. Influence of developmental stage on sensitivity to ammonium nitrate of aquatic stages of amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 105-111, 2006.

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

OSSANA, N. A. et al. Toxicity of Waterborne Copper in Premetamorphic Tadpoles of Lithobates catesbeianus (Shaw, 1802). **Bulletin of Environmental Contamaminant and Toxicology**, v. 84, p. 712-715, 2010.

OSSANA, N. A; CASTAÑÉ, P. M.; SALIBIÁN, A. Use of Lithobates catesbeianus Tadpoles in a Multiple Biomarker Approach for the Assessment of Water Quality of the Reconquista River (Argentina). **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 65, n. 3, p. 486-497, out. 2013.

PAETOW, L. J. et al. Mortality of American bullfrog tadpoles Lithobates catesbeianus infected by Gyrodactylus jennyae and experimentally exposed to Batrachochytrium dendrobatidis. **Journal of aquatic animal health**, v. 25, n. 1, p. 15-26, mar. 2013.

PECHMANN, J. H. K.; WILBUR, H. M. Putting Declining Amphibian Populations in Perspective: Natural Fluctuations and Human Impacts. **Herpetologica**, v. 50, n. 1, p. 65-84, 1994.

PELGROM, S. M. G. J. et al. Interactions between copper and cadmium during single and combined exposure in juvenile tilapia Oreochromis mossambicus: Influence of feeding condition on whole body metal accumulation and the effect of the metals on tissue water and ion content. **Aquatic Toxicology**, v. 30, p. 117-135, 1994.

PEREIRA, J. L. et al. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 4, p. 455-463, 2009.

PESTANA, J. L. T. et al. Structural and functional responses of benthic invertebrates to imidacloprid in outdoor stream mesocosms. **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 157, n. 8-9, p. 2328-34, 2009.

PIVELI R. P.; KATO, M. T. **Qualidade da água e poluição: aspectos físcico-químicos.** São Paulo: Editora ABES, 2005, 285p.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A Vida dos Vertebrados**. 4ª Ed. Atheneu Editora, São Paulo, 2008, 750 p.

RAMOS, R. C. **Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18 CE em ecossistemas de água doce por meio de estudos experimentais em laboratório e in situ**. 2013. 167 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications.** Hemisphere, 1995, 666 p.

REEVE, B. C. et al. Natural Stressors and Ranavirus Susceptibility in Larval Wood Frogs (Rana sylvatica). **EcoHealth**, 2013.

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 effects of pesticides, pH, and predatory stress on amphibians under mesocosm conditions. **Ecotoxicology**, v. 15, p. 503-511, 2006.

RELYEA, R. A. The lethal impact of roundup on aquatic and terrestrial amphibians. **Ecological Applications**, v. 15, n. 4, p. 1118-1124, 2005.

RELYEA, R. A.; DIECKS, N. An unforeseen chain of events: lethal effects of pesticides on frogs at sublethal concentrations. **Ecological Applications**, v. 18, n. 7, p. 1728-1742, 2008.

RELYEA, R. A.; MILLS, N. Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (Hyla versicolor). **PNAS**, v. 98, n. 5, p. 2491-2496, 2001.

RESENDE, J. C. **Efeitos do agrotóxico Vertimec® 18 CE nas interações tróficas de ecossistemas aquáticos: análise dos fatores de estresse em preparação**. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlo, em preparação.

RIEDER, A. **Aspectos da interação do homem com pesticidas no ambiente: focando a cotonicultura e com ênfase às bordas do Alto Pantanal, Mato Grosso, Brasil.** 2005, 204 f. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

ROHR, J. R.; RAFFEL, T. R.; HALL, C. A. Developmental variation in resistance and tolerance in a multi-host-parasite system. **Functional Ecology**, v. 24, n. 5, p. 1110-1121, 29 out. 2010.

ROSA, R. et al. A scaled-up system to evaluate zooplankton spatial avoidance and the population immediate decline concentration. **Environmental toxicology and chemistry /**, v. 31, n. 6, p. 1301-5, jun. 2012.

ROWE, C. L. et al. Elevated Maintenance Costs in an Anuran (Rana catesbeiana) Exposed to a Mixture of Trace Elements during the Embryonic and Early Larval Periods. **Physiological Zoology**, v. 71, n. 1, p. 27-35, 1998.

ROWE, C. L.; DUNSON, W. A. The value of simulated pond communities in mesocosms for studies of amphibians ecology and ecotoxicology. **Journal of Herpetology**, v. 28, n. 3, p. 346-356, 1994.

SANCHEZ, A. L. **Análise de risco ecológico para o diagnóstico de impactos ambientais em ecossistemas aquáticos continentais tropicais**. 2012, 200 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

SANDERS, H. O. Pesticide Toxicities to Tadpoles of the Western Chorus Frog Pseudacris triseriata and Fowler's Toad Bufo woodhousii fowleri. **Copeia**, n. 2, p. 246-251, 1970.

SANTOS, B. G. **Efeitos diretos e indiretos de fertilizantes sobre comunidades aquáticas experimentais**. 2013, 124 p. Dissertação (Mestrado), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SCHIESARI, L.; WERNER, E. E.; KLING, G. W. Carnivory and resource-based niche differentiation in anuran larvae: implications for food web and experimental ecology. **Freshwater Biology**, v. 54, p. 572-586, 2009.

SCHMUCK, R.; GEISE, W.; LINSENMAIR, K. E. Life Cycle Strategies and Physiological Adjustments of Reedfrog Tadpoles (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) in Relation to Environmental Conditions. **Copeia**, v. 4, p. 996-1007, 1994.

SEMLITSCH, R. D.; BRIDGES, C. M.; WELCH, A. M. Genetic variation and a fitness tradeoff in the tolerance of gray treefrog (Hyla versicolor) tadpoles to the insecticide carbaryl. **Oecologia**, v. 125, p. 179-185, 2000.

SILVA, J. M.; SANTOS, J. R. DOS. TOXICOLOGIA DE AGROTÓXICOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 4, p. 565-5, 2007.

SILVÉRIO, P.F. **Partição, biodisponibilidade e toxicidade de metais pesados a organismos bentônicos em sedimentos.** 1999. 78 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1999.

SINDAG - SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA. Disponível em: <http://www.sindag.com.br> Acesso em 15 de agosto de 2009.

SMITH, D. C. Adult Recruitment in Chorus Frogs : Effects of Size and Date at Metamorphosis. **Ecology**, v. 68, n. 2, p. 344-350, 1987.

SPACIE, A.; HAMELINK, J. L. Bioacumulation. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R.. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Hemisphere. 1995, p. 495-525.

SPARLING D. W. et al. (Eds). **Ecotoxicology of amphibians and reptiles.** 2nd Edition, Pensacola, FL, 2010, 916 p.

SPARLING, D. W.; FELLERS, G. M. Toxicity of two insecticides to california, usa, anurans and its relevance to declining amphibian populations. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 8, p. 1696-1703, 2009.

SPARLING, D. W.; FELLERS, G. M.; MCCONNELL, L. L. Pesticides and amphibian population declines in CALIFORNIA , USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 1591-1595, 2001.

STOLER, A. B.; RELYEA, R. A. Bottom-up meets top-down: leaf litter inputs influence predator-prey interactions in wetlands. **Oecologia**, v. 173, n. 1, p. 249-57, set. 2013.

STORRS, S. I.; KIESECKER, J. M. Survivorship Patterns of Larval Amphibians Exposed to Low Concentrations of Atrazine. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 10, p. 1054-1057, 2004.

SYNGENTA. 2013. Disponível em: <http://www.syngenta.com/country/pt/pt/produtos/Insecticidas/Documents/Vertimec/Vertimec_Ficha_de_Seguranca.pdf> Acesso em 21 de outubro de 2013.

TIŠLER, T.; KOZUH ERŽEN, N. Abamectin in the aquatic environment. **Ecotoxicology**, v. 15, n. 6, p. 495-502, ago. 2006.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 135-142, 2002.

TRINDADE, M. **Nutrientes em sedimentos da represa do Lobo (Brotas -Itirapina).** 1980. 219 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1980.

TUNDISI, J.G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. **Limnologia**. Oficina de Textos. 2008, 631 p.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Methods for Evaluating wetland and condition: Using Amphibians in Bioassessments of Wetlands**.. EPA-822-R-02-022. Environmental Protection Agency, 2002, 41p.

VAN DEN BRINK, P. J. et al. The use of terrestrial and aquatic microcosms and mesocosms for the ecological risk assessment of veterinary medicinal products. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 820-829, 2005.

VEIGA, M. M. et al. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudete do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2391-2399, 2006.

VENESKY, M. D. et al. Dietary protein restriction impairs growth, immunity, and disease resistance in southern leopard frog tadpoles. **Oecologia**, v. 169, n. 1, p. 23-31, maio 2012.

VERHAELEN, K. et al. International Journal of Food Microbiology Persistence of human norovirus in reconstituted pesticides — Pesticide application as a possible source of viruses in fresh produce chains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, p. 323-328, 2013.

VIEIRA, B. H. **Efeitos do agrotóxico Vertimec® na estrutura da comunidade fitoplanctônica: um estudo laboratorial e "in situ"**. 2010, 175 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

WEIS, J. S. et al. Effects of Contaminants on Behavior: Biochemical Mechanisms and Ecological Consequences. **BioScience**, v. 51, n. 3, p. 209-217, 2001.

WISLOCKI, P.G.; GROSSO, L.S.; DYBAS, R.A. Environmental aspects of abamectin use in crop protection. In: Campbell, W.C., **Ivermectin and Abamectin**. New York: Springer Verlag, p. 182–200, 1989.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática**: princípios e aplicações. São Carlos: Rima Editora, p.1-12, 2006.

APÊNDICE A

Resultados laboratoriais

Tabela 1. Resultados do teste de toxicidade aguda realizado com girinos de *L. catesbeianus* no estágio 21G. (Teste 1)

	Parâmetros iniciais						Parâmetros finais			
Concentração ($ml.L^{-1}$)	**pH**	**OD ($\mu g.L^{-1}$)**	**Cond ($\mu S.cm^{-1}$)**	**Temp (ºC)**	**Organismos expostos**	**Mortos**	**pH**	**OD**	**cond**	**temp**
Controle	7,20	6,30	26,5	24,1	24	0	7,5	6,77	44,9	24
0,002	6,92	6,71	26,78	23,9	24	0	7,21	6,83	41,54	24,1
0,003	6,82	6,3	26,31	24,1	24	24	7,21	6,65	41,8	24,2
0,004	6,93	6,5	26,53	24,0	24	24	7,31	7,22	33,43	23,8

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: LC50: 0,00283

Tabela 2. Resultados do teste de toxicidade aguda realizado com girinos de *L. catesbeianus* no estágio 21G. (Teste 2)

	Parâmetros iniciais						Parâmetros finais			
Concentração ($ml.L^{-1}$)	**pH**	**OD ($\mu g.L^{-1}$)**	**Cond ($\mu S.cm^{-1}$)**	**Temp (ºC)**	**Organismos expostos**	**Mortos**	**pH**	**OD**	**cond**	**temp**
Controle	6,96	6,24	26,3	23,7	24	0	7,5	6,87	32,8	24,1
0,002	7,04	6,56	26,2	23,6	24	0	7,54	6,92	38,7	24,2
0,003	6,91	6,15	25,7	23,7	24	7	7,34	6,57	36,7	24,4
0,004	7,17	6,41	26,4	23,5	24	24	7,57	7,7	32,3	24,1

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: LC50: 0,00313

Tabela 3. Resultados do teste de toxicidade aguda realizado com girinos de *L. catesbeianus* no estágio 21G. (Teste 3)

	Parâmetros iniciais						Parâmetros finais			
Concentração ($ml.L^{-1}$)	**pH**	**OD ($\mu g.L^{-1}$)**	**Cond ($\mu S.cm^{-1}$)**	**Temp (ºC)**	**Organismos expostos**	**Mortos**	**pH**	**OD**	**cond**	**temp**
Controle	7,39	6,4	27,2	24,3	24	0	7,51	6,71	58,8	23,7
0,002	6,83	6,42	27,5	24,3	24	0	7,02	6,85	46,6	23,6
0,003	6,8	6,42	26,8	24,3	24	10	6,97	6,77	48,7	23,6
0,004	6,81	6,4	26,7	24,3	24	24	7,12	6,63	34,7	23,8

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: LC50: 0,00321

Tabela 4. Resultado do teste de toxicidade aguda com girinos de *L. catesbeianus* no estágio 25G. (Teste 1)

	Parâmetros iniciais						Parâmetros finais			
Concentração ($ml.L^{-1}$)	**pH**	**OD ($\mu g.L^{-1}$)**	**Cond ($\mu S.cm^{-1}$)**	**Temp (ºC)**	**Organismos expostos**	**Mortos**	**pH**	**OD**	**cond**	**temp**
Controle	6,91	7,04	27,8	23,6	24	0	7,42	6,18	82,3	23,1
0,002	6,71	7,12	27,5	23,5	24	0	7,29	5,23	89,3	22,4
0,004	6,72	6,97	27,6	23,8	24	0	7,22	6,12	71,65	22,8
0,008	6,94	7,11	28,4	23,8	24	7	7,36	6,17	66,3	22,6
0,012	7,0	7,69	28,2	23,7	24	24	7,37	7,29	55,8	22,1
0,016	7,03	7,72	27,7	23,8	24	24	7,35	7,03	55,2	22,3

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: LC50: 0,00835

Tabela 5. Resultado do teste de toxicidade aguda com girinos de *L. catesbeianus* no estágio 25G. (Teste 2)

	Parâmetros iniciais						Parâmetros finais			
Concentração ($ml.L^{-1}$)	**pH**	**OD ($\mu g.L^{-1}$)**	**Cond ($\mu S.cm^{-1}$)**	**Temp (ºC)**	**Organismos expostos**	**Mortos**	**pH**	**OD**	**cond**	**temp**
Controle	6,88	6,78	29,6	23,5	24	0	7,56	7,28	81,8	23,2
0,002	6,66	6,75	27,8	23,5	24	0	7,33	4,95	116,7	22
0,004	6,63	6,62	28,9	23,4	24	0	7,26	6,29	82,8	22,3
0,008	6,57	6,7	28,2	23,3	24	10	7,27	6,49	79,6	22,7
0,012	6,82	7,64	27,3	23,1	24	24	7,39	6,35	72,4	22,8

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: LC50: 0,00779

Tabela 6. Resultado do teste de toxicidade aguda com girinos de *L. catesbeianus* no estágio 25G. (Teste 3)

	Parâmetros iniciais						Parâmetros finais			
Concentração ($ml.L^{-1}$)	**pH**	**OD ($\mu g.L^{-1}$)**	**Cond ($\mu S.cm^{-1}$)**	**Temp (ºC)**	**Organismos expostos**	**Mortos**	**pH**	**OD**	**cond**	**temp**
Controle	6,88	7,12	26,3	24,2	24	0	7,19	5,35	80,1	23,4
0,002	6,88	7,14	26,4	24,1	24	0	7,21	5,03	72	23,5
0,004	6,99	7,15	27,4	24	24	0	7,17	5,32	66,7	23,6
0,008	7,01	7,16	26,3	23,7	24	20	7,12	5,32	59,6	23,8
0,012	7,18	7,70	28,7	23,6	24	24	7,49	5,45	50,6	23,6

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: LC50: 0,00620

Tabela 7. Resultado do teste de toxicidade aguda com girinos de *L. catesbeianus* no estágio 25G. (Teste 4)

	Parâmetros iniciais						Parâmetros finais			
Concentração ($ml.L^{-1}$)	**pH**	**OD ($\mu g.L^{-1}$)**	**Cond ($\mu S.cm^{-1}$)**	**Temp (ºC)**	**Organismos expostos**	**Mortos**	**pH**	**OD**	**cond**	**temp**
Controle	6,86	6,92	27,9	24,1	24	0	7,37	6,44	81,6	23,5
0,002	6,79	6,84	26,9	24	24	0	7,21	4,98	95,8	23,4
0,004	6,85	6,83	28,3	23,9	24	0	7,24	5,42	78,9	23,1
0,008	6,69	6,86	27,9	23,5	24	7	7,17	5,81	76,2	23,7
0,012	6,55	6,96	27,3	23,5	24	24	7,42	5,82	72,8	23,6

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: LC50: 0,00835

Tabela 8. Percentual de organismos em cada estágio de desenvolvimento (para cada réplica e valor médio) ao final do teste de toxicidade crônica para girinos de *L. catesbeianus* 25G.

	Estágio 25	Estágio 26-30	Estágio 31	Estágio 32-37	Estágio 38-40	Estágio 40-41	Estágio 42-45	Estágio 46	Mortos
					Controle				
C1	57,14	0	0	14,29	14,29	14,29	0	0	0
C2	33,33	0	16,67	16,67	33,33	0	0	0	0
C3	83,33	0	16,67	0	0	0	0	0	0
C4	50	0	0	33,33	16,67	0	0	0	0
Média	55,95%	0,00%	8,34%	16,07%	16,07%	3,57%	0,00%	0,00%	0,00%
					0,002 ml.L^{-1}				
0,002 (1)	50	0	0	33,33	0	0	0	16,67	0
0,002 (2)	66,67	0	0	16,67	16,67	0	0	0	0
0,002 (3)	33,33	0	0	33,33	16,67	16,67	0	0	0
0,002 (4)	33,33	0	0	33,33	16,67	0	0	0	16,67
Média	45,83%	0,00%	0,00%	29,17%	12,50%	4,17%	0,00%	4,17%	4,17%
					0,004 ml.L^{-1}				
0,004 (1)	66,67	0	0	16,67	0	0	0	0	16,67
0,004 (2)	66,67	0	16,67	0	16,67	0	0	0	0
0,004 (3)	100	0	0	0	0	0	0	0	0
0,004 (4)	50	0	0	0	16,67	0	0	0	33,33
Média	70,84%	0,00%	4,17%	4,17%	8,34%	0,00%	0,00%	0,00%	12,50%
					0,008 ml.L^{-1}				
0,008 (1)	0	0	8,33	0	8,33	0	0	0	83,33
0,008 (2)	25	0	0	8,33	0	0	0	0	66,67
0,008 (3)	8,33	0	0	0	0	0	0	0	91,67
0,008 (4)	25	0	0	0	0	0	0	0	75
Média	**14,58%**	**0,00%**	**2,08%**	**2,08%**	**2,08%**	**0,00%**	**0,00%**	**0,00%**	**79,17%**

Tabela 9. Peso dos organismos em cada estágio de desenvolvimento (para cada réplica e valor médio) ao final do teste de toxicidade crônica laboratorial com girinos de *L. catesbeianus* 25G.

	Estágios (Gosner, 1960)								
	25	**26-30**	**31**	**32-37**	**38-40**	**40-41**	**42-45**	**46**	**Média**
					Peso (g)				
C1	3,44	-	-	4,21	5,64	5,09	-	-	
C2	3,86	-	5,11	3,94	5,42	-	-	-	
C3	3,91	-	4,04	-	-	-	-	-	
C4	3,35	-	-	4,77	-	-	-	-	
Média	**3,64**	**-**	**4,58**	**4,31**	**5,53**	**5,09**	**-**	**-**	**4,63**
0,002 (1)	3,26	-	-	5,86	-	-	-	-	
0,002 (2)	4,61	-	-	5,38	5,28	-	-	-	
0,002 (3)	3,75	-	-	4,94	6,90	5,52	-	-	
0,002 (4)	2,91	-	-	3,92	4,65	-	-	-	
Média	**3,63**			**5,02**	**5,61**	**5,52**	**-**	**-**	**4,95**
0,004 (1)	3,58	-	-	4,05	-	-	-	-	
0,004 (2)	3,57	-	4,13	-	5,81	-	-	-	
0,004 (3)	3,64	-	-	-	-	-	-	-	
0,004 (4)	3,46	-	-	-	5,31	-	-	-	
Média	**3,56**		**4,13**	**4,05**	**5,56**	**-**	**-**	**-**	**4,33**
0,008 (1)	-	-	4,69	-	4,41	-	-	-	
0,008 (2)	3,48	-	-	4,09	-	-	-	-	
0,008 (3)	3,27	-	-	-	-	-	-	-	
0,008 (4)	4,55	-	-	-		-	-	-	
Média	**3,76**		**4,69**	**4,09**	**4,41**	**-**	**-**	**-**	**4,24**

Tabela 10. Valores das variáveis limnológicas durante o teste de toxicidade crônica laboratorial com girinos de *L. catesbeianus* 25G.

Período (horas)	pH	OD (mg.L^{-1})	Condutividade (µS.cm^{-1})	Temperatura
		Controle		
Inicial	6,88	7,12	26,3	24,2
96	7,19	5,35	80,1	23,4
192	7,26	3,44	143,4	24,6
288	7,53	5,59	145,1	22,3
384	7,63	5,78	137	23,8
480	7,6	6,23	136,4	22,5
576	7,74	6,45	114,5	24
		0,002 ml.L^{-1}		
Inicial	6,88	7,14	26,4	24,1
96	7,21	5,03	72	23,5
192	7,25	3,65	131,8	24,5
288	7,47	5,16	134,5	22,3
384	7,54	5,51	116,8	23,8
480	7,57	6,13	116,6	22,6
576	7,7	6,61	98,7	23,9
		0,004 ml.L^{-1}		
Inicial	6,99	7,15	27,4	24
96	7,17	5,32	66,7	23,6
192	7,24	3,9	118,3	24,4
288	7,34	4,65	129,1	22,2
384	7,5	5,52	109,1	23,6
480	7,54	6,21	102,7	22,5
576	7,65	6,54	85,2	23,8
		0,008 ml.L^{-1}		
Inicial	7,01	7,16	26,3	23,7
96	7,12	5,32	59,6	23,8
192	7,27	4,26	97,5	24,4
288	7,34	5,38	95,4	22,1
384	7,53	6,12	87,4	23,7
480	7,52	6,57	70,6	22,5
576	7,67	6,97	60,1	23,8

Tabela 11. Medidas iniciais do lote de girinos de L. catesbeianus 25G adquirido para o teste crônico em laboratório

Organismo	Peso (g)
1	4,19
2	6,1
3	5,36
4	3,96
5	2,86
6	2,51
7	4,09
8	4,54
9	3,49
10	3,45
11	4,28
12	4,64
Média	4,12

APÊNDICE B

Experimento em campo

Tabela 1. Valores médios das variáveis físicas e químicas da água do mesocosmo ao longo do periodo experimental (480 horas).

Período (horas)	0	3	96	192	288	384	480
			pH				
C	6,82	7,46	7,03	6,58	6,74	7,24	7,45
CG	6,67	7,16	6,97	6,49	6,44	7,08	7,34
DM	6,96	7,27	6,99	7,08	6,48	7,02	7,28
DMG	6,78	7,06	6,95	7,02	6,51	6,89	7,24
DU	6,91	7,29	6,89	6,98	6,41	7,18	7,27
DUG	6,97	7,40	6,98	7,25	6,52	7,19	7,36
			Oxigênio dissolvido ($mg.L^{-1}$)				
C	4,63	6,46	3,79	1,26	4,21	4,55	4,49
CG	5,10	5,09	1,89	1,79	2,08	2,50	2,53
DM	5,19	6,40	5,07	4,15	4,75	3,50	4,42
DMG	3,72	3,66	1,98	2,13	2,41	1,50	1,61
DU	5,24	7,59	4,31	2,71	3,86	4,65	4,83
DUG	6,62	5,82	0,33	4,23	4,07	3,26	2,31
			Condutividade ($mS.cm^{-1}$)				
C	0,0351	0,0347	0,0431	0,0585	0,0678	0,0728	0,0755
CG	0,0318	0,0337	0,0480	0,0658	0,0635	0,0727	0,0824
DM	0,0366	0,0342	0,0380	0,0428	0,0471	0,0512	0,0523
DMG	0,0350	0,0366	0,0515	0,0671	0,0769	0,0880	0,0953
DU	0,0352	0,0347	0,0402	0,0538	0,0612	0,0640	0,0635
DUG	0,0330	0,0345	0,0658	0,0772	0,0912	0,0918	0,0968
			Temperatura (°C)				
C	27,38	30,05	26,40	25,10	25,52	25,59	25,22
CG	27,30	29,43	26,40	24,99	25,43	25,59	25,28
DM	27,50	30,15	26,40	24,98	25,48	25,58	25,28
DMG	27,49	29,57	26,47	24,98	25,42	25,60	25,30
DU	27,47	30,12	26,50	24,97	25,40	25,59	25,23
DUG	27,62	29,82	26,50	24,87	25,38	25,60	25,23
			Turbidez (UNT)				
C		6,5	6,5	10,0	11,0	11,0	9,0
CG		6	5,5	6,5	5,0	5,0	4,0
DM	6	6	6,0	8,0	8,0	7,0	7,5
DMG		6	5,0	7,0	6,5	6,0	4,5
DU		5	5,0	8,0	10,0	9,0	6,0
DUG		8,5	17,50	15,0	24,0	16,0	9,33
			Clorofila ($\mu g.L^{-1}$)				
C		21,62	13,95	5,12	8,37	10,23	11,63
CG		11,16	5,58	2,79	3,72	3,26	4,65
DM	22.79	20,93	24,18	19,07	25,58	20,46	13,95
DMG		10,81	11,63	5,12	4,65	4,19	3,26
DU		20,69	13,33	25,58	17,21	32,56	21,39
DUG		17,09	24,18	352,01	209,72	49,29	43,71

Tabela 2. Valores médios das concentrações dos nutrientes obtidos a partir de amostras de água do mesocosmo.

Período (horas)	0	3	96	192	288	384	480
			Nitrogênio total ($mg.L^{-1}$)				

C		0,420	0,607	0,443	0,373	0,467	0,303
CG		0,373	0,677	0,817	1,143	1,423	1,353
DM	0,957	0,793	0,163	0,420	0,420	0,607	0,373
DMG		0,397	0,397	1,633	1,983	2,022	1,633
DU		0,327	0,257	0,700	0,187	0,700	0,420
DUG		0,163	0,980	0,420	0,793	1,167	0,957
Nitrito (µg.L^{-1})							
C		2,51	2,31	3,235	3,145	8,790	121,760
CG		2,567	2,430	3,015	3,415	25,760	309,855
DM	5,83	2,375	2,533	1,825	1,390	3,380	30,430
DMG		2,285	2,300	2,705	2,265	16,205	116,163
DU		2,445	2,005	2,215	1,755	1,270	2,660
DUG		3,430	3,175	1,815	1,130	1,870	15,820
Nitrato (µg.L^{-1})							
C		33,940	27,265	31,540	14,285	15,185	146,450
CG		25,155	28,535	30,390	17,190	46,760	354,370
DM	28,51	23,543	30,405	29,935	13,215	10,995	38,660
DMG		23,325	29,130	27,005	14,900	8,420	201,175
DU		22,610	29,897	11,405	11,860	6,635	4,725
DUG		17,895	14,735	12,905	12,930	6,555	0,220
Íon amônio (µg.L^{-1})							
C		2,960	41,005	153,083	256,020	254,935	265,335
CG		36,025	307,650	351,375	551,307	565,915	420,435
DM	47,21	10,020	20,255	64,995	160,400	144,780	154,290
DMG		14,055	221,195	339,290	559,335	538,380	483,387
DU		4,545	8,845	83,463	267,770	237,790	207,125
DUG		8,080	201,190	315,375	457,580	309,155	342,870
Fósforo total (µg.L^{-1})							
C		214,835	310,900	236,150	105,350	235,585	253,970
CG		340,700	356,180	267,250	117,610	239,860	272,020
DM	231,05	256,505	303,305	246,255	79,640	222,680	263,310
DMG		235,300	315,620	282,200	150,930	278,470	305,523
DU		280,180	294,705	238,230	140,335	241,105	254,590
DUG		234,815	817,470	846,900	704,095	616,773	488,565
Fosfato total dissolvido (µg.L^{-1})							
C		62,300	70,220	57,815	9,710	29,655	49,195
CG		98,500	129,640	103,830	31,025	69,690	73,213
DM	35,23	62,340	63,280	38,595	9,570	30,140	49,873
DMG		69,915	89,907	75,375	22,650	69,395	85,190
DU		52,127	62,255	38,910	8,175	30,140	46,660
DUG		54,185	458,585	331,320	59,480	169,495	189,790
Fósfato inorgânico (µg.L^{-1})							
C		21,825	31,010	20,710	6,215	20,483	3,500
CG		67,190	98,555	94,335	25,015	57,133	27,290
DM	20,67	36,095	37,400	20,633	6,307	20,343	20,883
DMG		34,280	56,260	57,270	25,605	57,510	56,810
DU		21,363	25,995	20,393	6,420	20,383	20,980
DUG		23,170	425,050	268,970	52,167	130,770	129,210
Silicato (mg.L^{-1})							
C		2,120	3,620	3,915	3,150	3,437	4,197
CG		2,055	3,650	3,000	2,680	2,855	3,405
DM		2,040	2,675	2,375	2,297	2,190	2,990
DMG		1,090	2,365	3,080	2,955	3,020	3,235
DU		1,820	2,100	2,223	2,485	2,495	2,870
DUG	4,36	1,410	1,825	2,900	2,237	3,350	3,200

Tabela 3. Valores dos components principais e valores de explicação dos parâmetros avaliados nos mesocosmos ao longo do experiment através da ACP.

Variáveis	Componente 1	Componente 2
NT	**0,1897**	-0,313
NO2	**0,08782**	-0,3482
NO3	**0,05986**	-0,3467
NH4	**0,3222**	-0,3019
PTD	**0,3461**	0,2563
POI	**0,3553**	0,2507
PT	**0,3637**	0,291
SiO2	**0,000931**	-0,2328
OD	-0,3157	**0,2201**
Cond	**0,3823**	-0,2098
Temp	-0,2775	**0,2446**
pH	-0,01665	**0,08682**
Turb	**0,2978**	0,259
Clorofila	0,2425	**0,2742**

Tabela 4. Valores dos índice de estado trófico calculados a partir da concentração de fósforo total, clorofila *a* e valor médio. C: controle; CG: controle com girinos; DM: dose múltipla; DMG: dose múltipla girinos; DU: dose única; DUG: dose única girinos.

Perído (horas)	0	3	96	192	288	384	480
			Fósforo				
C		74,84	77,08	75,41	70,52	75,40	75,85
CG		77,63	77,90	76,16	71,19	75,51	76,27
DM	75,28	75,91	76,93	75,66	68,82	75,06	76,07
DMG		75,39	77,17	76,49	72,70	76,41	76,97
DU		76,45	76,75	75,46	72,26	75,54	75,87
DUG		75,38	82,94	83,15	82,03	81,23	79,82
			Clorofila				
C		61,80	59,65	54,73	57,15	58,13	57,83
CG		58,56	55,16	51,76	53,16	52,52	54,27
DM		61,64	62,35	61,19	62,63	61,53	59,65
DMG	62,06	58,40	58,76	54,73	54,27	53,75	52,52
DU		61,59	59,43	63,37	60,68	63,81	61,75
DUG		60,65	62,80	75,49	72,95	65,85	65,26
			Média				
C		68,32	68,37	65,07	63,83	66,76	66,84
CG		68,10	66,53	63,96	62,18	64,01	65,27
DM	68,67	68,78	69,64	68,43	65,73	68,29	67,86
DMG		66,90	67,96	65,61	63,48	65,08	64,74
DU		69,02	68,09	69,42	66,47	69,67	68,81
DUG		68,01	72,87	79,32	77,49	73,54	72,54

mesotrófico	eutrófico	supereutrófico	hipereutrófico
52<IET<59	59<IET<63	63<IET<67	IET>67

Tabela 5. Concentração de nutrientes em amostras de sedimentos dos mesocosmos. N total: nitrogênio total; P total: fósforo total; CG: controle com girinos; DM: dose múltipla; DMG: dose múltipla girinos; DU: dose única; DUG: dose única girinos.

Horas	N total (%)	P total (µg/g)	Matéria orgânica (%)
Controle			
0	0,04	1,3678	6,79
480	0,03	0,9153	6,31
CG			
0	0,04	1,3678	6,79
480	0,05	1,0140	7,19
DM			
0	0,04	1,3678	6,79
480	0,11	1,5335	8,26
DMG			
0	0,04	1,3678	6,79
480	0,13	1,7295	6,75
DU			
0	0,04	1,3678	6,79
480	0,08	1,3460	9,18
DUG			
0	0,04	1,3678	6,79
480	0,07	1,6703	7,25

Tabela 6. Medidas iniciais do lote de girinos adquirido para os experimentos em mesocosmos

Organismo	Peso (g)	Comprimento (mm)
1	2,59	55,37
2	3,83	72,65
3	4,54	68,72
4	4,7	73,8
5	3,31	66,16
6	2,19	58,45
7	3,08	62,7
8	3,01	60,5
9	2,92	59,57
10	1,72	51,9
Média	3,19	62,98

Tabela 7. Desenvolvimento dos girinos de *L. catesbeianus* ao final do experimento

	Estágios								
	25	26-30	31	32-37	38-40	40-41	42-45	46	Mortos
CG 1	44,68	8,51	10,64	19,15	0,00	8,51	2,13	4,26	2,13
CG 2	16,98	0,00	24,53	32,08	3,77	7,55	13,21	1,89	0
CG 3	30,77	2,56	7,69	30,77	5,13	5,13	10,26	7,69	0
Média	30,81%	3,69%	14,29%	27,33%	2,97%	7,06%	8,53%	4,61%	0,71%
DMG 1	47,17	5,66	22,64	15,09	1,89	3,77	3,77	0	0
DMG 2	61,11	0	18,52	5,56	9,26	1,85	3,70	0	0
DMG 3	52,73	7,27	18,18	9,09	5,45	3,64	3,64	0	0
Média	53,67%	4,31%	19,78%	9,91%	5,53%	3,09%	3,70%	0,00%	0,00%

Tabela 8. Peso dos girinos de *L. catesbeianus* (em g) dentro de cada estágio para cada réplica

	Estágios								
	Inicial	**25**	**26-30**	**31**	**32-37**	**38-40**	**40-41**	**42-45**	**46**
CG 1		1,57	2,42	2,62	2,85	-	4,11	3,61	2,31
CG 2		1,93	-	2,9	3,35	2,44	3,65	3,41	2,9
CG 3		1,81	2,52	3	3,56	3,27	3,62	3,83	2,58
Média	3,31	1,77	2,47	2,84	3,25	2,85	3,79	3,61	2,59
DMG 1		1,91	2,59	2,78	3,45	4,02	2,86	3,26	-
DMG 2		1,69	-	2,7	3,24	3,59	3,85	3,52	-
DMG 3		1,98	2,68	2,95	3,55	3,83	5,69	4,51	-
Média	3,31	1,86	2,59	2,81	3,45	3,81	2,86	3,76	-

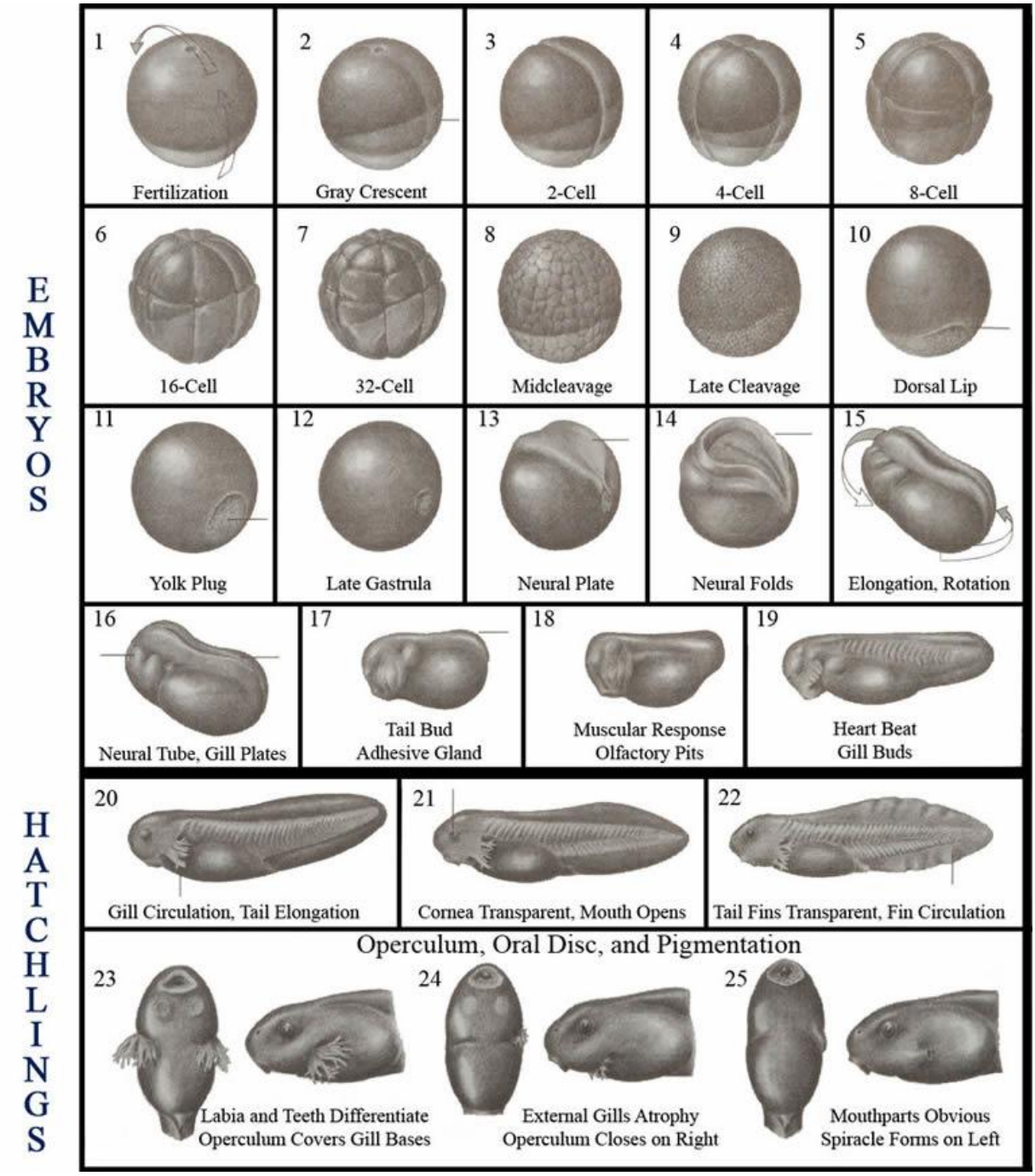
Tabela 9. Comprimento dos girinos de *L. catesbeianus* (em mm) dentro de cada estágio ao final do experimento em mesocosmos para cada replica e valor médio.

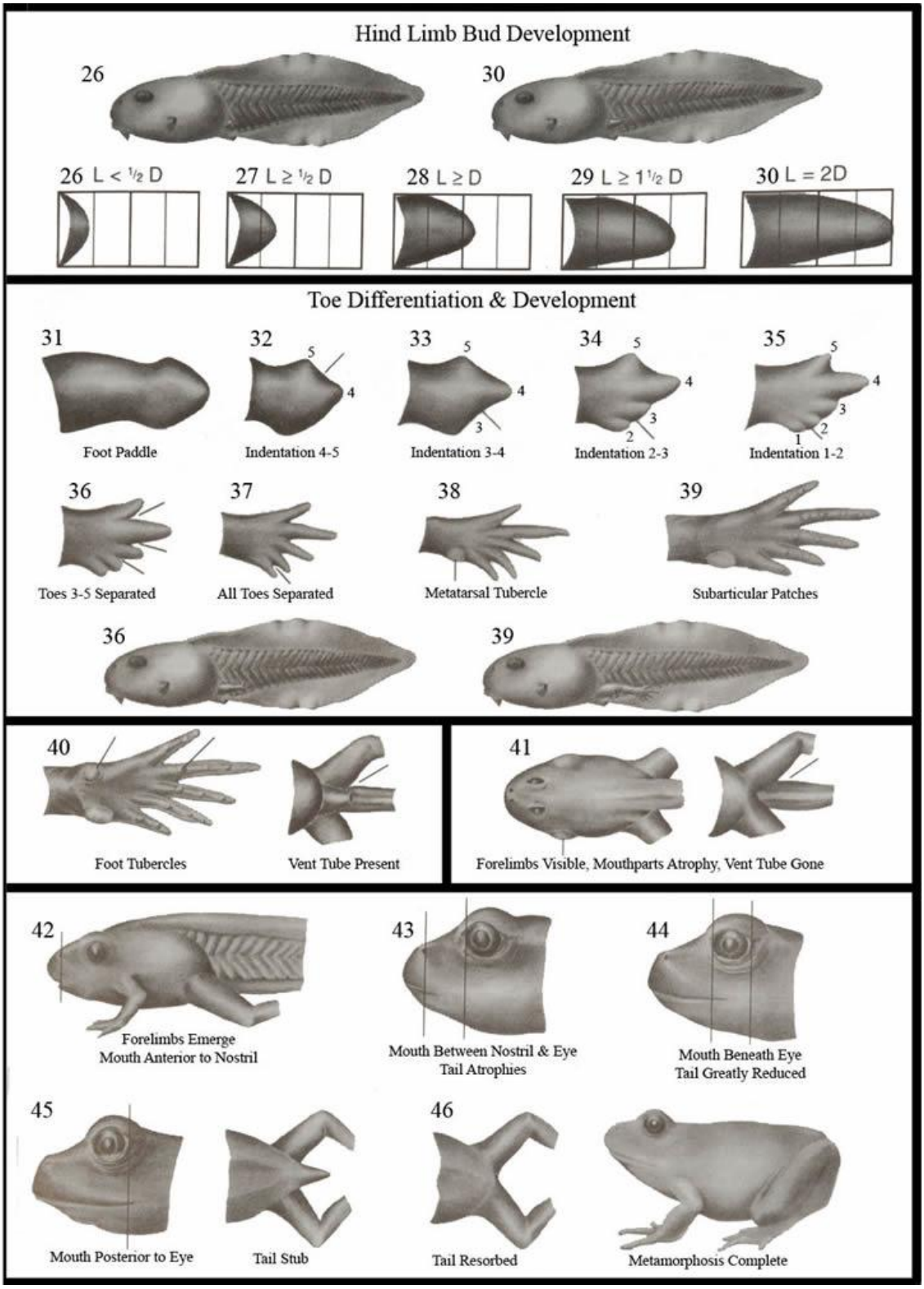
	Estágios							
	25	**26-30**	**31**	**32-37**	**38-40**	**40-41**	**42-45**	**46**
CG 1	52,12	62,15	62,87	65,49	-	75,37	-	-
CG 2	54,3	-	64,32	68,6	64,45	74,15	-	-
CG 3	54,73	60	64,6	66,68	69,85	72,66	-	-
Média CG	53,72	61,08	63,93	66,92	67,15	74,06	-	-
DMG 1	57,21	62,39	66,025	69,52	77,13	67,94	-	-
DMG 2	56,23	-	64,44	72,46	77,32	48	-	-
DMG 3	57,82	66,58	66,94	70,46	75,12	87,8	-	-
Média DMG	57,09	64,49	65,80	70,81	76,52	67,91	-	-

ANEXO

Figura 1. Tabela de Gosner.

Fonte: <http://www.virginiaherpetologicalsociety.com/amphibians/amphibian-development/amphibian-development.htm> Acesso em 12 de janeiro de 2014.




Hind Limb Bud Development
26
30
26 L < ½ D
27 L ≥ ½ D
28 L ≥ D
29 L ≥ 1½ D
30 L = 2D
Toe Differentiation & Development
LARVAE
31
Foot Paddle
32
Indentation 4-5
33
Indentation 3-4
34
Indentation 2-3
35
Indentation 1-2
36
Toes 3-5 Separated
37
All Toes Separated
38
Metatarsal Tubercle
39
Subarticular Patches
36
39
40
Foot Tubercles
Vent Tube Present
41
Forelimbs Visible, Mouthparts Atrophy, Vent Tube Gone
METAMORPHS
42
Forelimbs Emerge
Mouth Anterior to Nostril
43
Mouth Between Nostril & Eye
Tail Atrophies
44
Mouth Beneath Eye
Tail Greatly Reduced
45
Mouth Posterior to Eye
Tail Stub
46
Tail Resorbed
Metamorphosis Complete