



**UFAM**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA  
– PPG-MDB

---

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE OVOS E LARVAS DE *Osteocephalus taurinus* STEINDACHNER, 1862 – (ANURA, HYLIDAE) À ÁGUA CONTAMINADA DE DOIS IGARAPÉS DE MANAUS – AM: TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA**

**JORGE HARISON PEREIRA DO NASCIMENTO**

Manaus – Amazonas

Março/2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA  
– PPG-MDB

---

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE OVOS E LARVAS DE *Osteocephalus taurinus* STEINDACHNER, 1862 – (ANURA, HYLIDAE) À ÁGUA CONTAMINADA DE DOIS IGARAPÉS DE MANAUS – AM: TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA**

JORGE HARISON PEREIRA DO NASCIMENTO

Orientador (a): Prof. Dra. Claudia Keller

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Menin

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Diversidade Biológica.**

**Fontes Financiadoras:** INPA, CT-Hidro (CNPq – processo 555268/2006-3) e CAPES (bolsa de estudos).

Manaus – Amazonas

Março/2011

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Nascimento, Jorge Harison Pereira do

N244e Efeito da exposição de ovos e larvas de *Osteocephalus taurinus* Steindachner, 1862 – (Anura, Hylidae) à água contaminada de dois igarapés de Manaus – AM: toxicidade aguda e crônica/ Jorge Harison Pereira do Nascimento. - Manaus: UFAM, 2011

45 f.: il.; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica, área de concentração em Biodiversidade Amazônica) — Universidade Federal do Amazonas, 2011

Orientador: Prof. Dr. Claudia Keller

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Menin

1. Anuro - Contaminação 2. Água – Poluição – Igarapé do Quarenta – Manaus (AM) 3. água – Poluição – Igarapé do Mindu – Manaus (AM) I. Keller, Claudia (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU(1997): 504.4.054(811.3)(043.3)

**Sinopse:**

Foram determinados, para larvas de *Osteocephalus taurinus* os efeitos agudos e crônicos de exposições a água contaminada por efluentes urbanos e industriais de dois igarapés de Manaus-AM. Experimentos em laboratório foram realizados com indivíduos em diferentes estágios de desenvolvimento. Foi determinada a letalidade de diferentes concentrações da água dos Igarapés do Mindu e do Quarenta em exposições de até 96 hs. Também foram determinados os efeitos crônicos produzidos por exposições às águas de ambos igarapés nas concentrações de 0% e de 100%.

**Palavras chave:** Anfíbios, Igarapé do Mindu, Igarapé do Quarenta, Toxicidade, Compostos nitrogenados

**Keywords:** Amphibians, Stream Mindu, Stream Quarenta, Toxicity, Nitrogen compounds

*Aos meus pais, Jorge A. do Nascimento e Maria E. P. do Nascimento*

## AGRADECIMENTOS

Aos Profs. Dra. Claudia Keller e Dr. Marcelo Menin pela orientação deste trabalho.

Aos Drs. Genilson Santana, Andrea Waichman e Fabíola Valdez, Sérgio Rodrigues, Nívia Lopes pelas críticas e sugestões dadas ao projeto durante a avaliação e durante a aula de qualificação e defesa desta dissertação.

Ao Dr. Jansen Zuanon pelo apoio e empréstimo de equipamentos.

Aos parceiros de laboratório D. Regina e Marcelo Lima, pelo companheirismo e auxílio nas atividades de campo, troca de informações, apoio e discussões.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

Ao projeto CT-Hidro pelo apoio financeiro (CNPq – processo 555268/2006-3 concedidos ao Dr. Marcelo Menin).

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) pela licença de coleta concedida (1909-1).

Aos funcionários da CPRH – INPA, em nome da Dra. Hilândia Brandão pelas análises Químicas das águas dos igarapés.

Aos motoristas João Sá e Lourival pelas várias indas e vindas à reserva Ducke.

Aos Guardas da Reserva Ducke: “Pacó” (Alexandre), “Bololô” (Mário), “Traíra” (Hudson) e ao “Capitão do mato” (Manoel) pelo companheirismo durante as semanas de confinamento na Reserva.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia do INPA, LBA/INPA, UFAM e ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica pelo apoio logístico, oportunidade de realizar este estudo e pelo apoio financeiro.

Aos companheiros do Programa de Pós-Graduação Bruno Minoru, Larissa, Francisco, Grace, Alexandre, Ana Paula, Mário, Jefferson, Márcio, Samuel, Luiz, Diana, Rachel, Dóris, Wellington, Bruno Marchena, Washington e ao Leandro (Chispiador), pelo companheirismo, apoio e discussões.

Aos meus pais Jorge e Elza e meus irmãos Karine e Jefferson, pelo incentivo, confiança e dedicação desde o início da minha formação, e o apoio para não desistir nos momentos mais difíceis. E a toda minha família pelo apoio em minha vida.

À minha namorada Alessandra e sua família, pelo apoio, carinho, paciência e compreensão durante a minha ausência.

Aos meus amigos de Fortaleza-CE, e a todas as outras pessoas que de uma ou outra forma contribuíram na minha formação e na execução desse projeto.

## Sumário

Lista de figuras.....	v
Lista de tabelas.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Objetivos.....	01
Capítulo 1: Efeito da água contaminada de dois igarapés de Manaus (Amazonas) sobre ovos e larvas de <i>Osteocephalus taurinus</i> (Anura, Hylidae).....	02
Introdução.....	03
Material e métodos.....	08
Espécie estudada, coleta de amostras e manutenção de desovas.....	08
Experimentos.....	11
Estágios de desenvolvimento.....	12
Efeito agudo da contaminação sobre ovos e larvas de <i>O. taurinus</i> .....	13
Efeito crônico da contaminação sobre larvas de <i>O. taurinus</i> .....	14
Medidas de parâmetros químicos e físico-químicos da água.....	16
Análise dos dados.....	17
Resultados.....	17
Medidas de parâmetros físico-químicos e químicos da água.....	17
Efeito agudo da contaminação sobre os ovos e larvas de <i>O. taurinus</i> .....	23
Efeito Crônico da contaminação sobre larvas de <i>O. taurinus</i> .....	23
Discussão.....	27
Efeitos agudos da contaminação – teste de CL50.....	27
Avaliação de efeitos crônicos da contaminação.....	29
Conclusão.....	37
Literatura citada.....	38

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Hidrografia da cidade de Manaus, indicando a localização da Reserva Ducke (quadrado demarcado) e os dois igarapés onde foram coletadas as amostras de água contaminada: (1) Igarapé do Mindu (IMI) e (2) Igarapé do Quarenta (IQU).....	10
<b>Figura 2:</b> Escala completa de Gosner (1960); <b>1</b> = ovos, <b>2</b> = larvas imóveis, <b>3</b> = larvas com brânquias externas, <b>4</b> = de larva livre natante até a metamorfose, <b>5</b> = absorção da cauda.....	12
<b>Figura 3:</b> Detalhe da distribuição de réplicas dos experimentos de efeitos agudos: (A) = com ovos, (B) = com larvas e (C) = detalhe da vista geral de distribuição.....	14
<b>Figura 4:</b> Detalhe da distribuição de réplicas no experimento de efeitos crônicos: (A) = larva sendo alimentada, (B) = destaque das unidades experimentais e (C) = vista geral da distribuição.....	15
<b>Figura 5:</b> Evolução do oxigênio dissolvido (OD) em mg/L durante o período do experimento agudo com as larvas.....	18
<b>Figura 6:</b> Evolução do oxigênio dissolvido (OD) em mg/L durante o período do experimentos crônico com as larvas.....	18
<b>Figura 7:</b> Evolução do pH durante o período do experimento agudo com as larvas.....	19
<b>Figura 8:</b> Evolução do pH durante o período do experimento crônico com as larvas.....	19
<b>Figura 9:</b> Evolução da concentração de amônio [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] em mg/L N durante o período dos experimentos agudo com larvas.....	20
<b>Figura 10:</b> Evolução da concentração de amônio [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] em mg/L N durante o período do experimento crônico com larvas.....	20
<b>Figura 11:</b> Evolução da concentração de nitrito [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] em mg/L N durante o período do experimento agudo com larvas.....	21
<b>Figura 12:</b> Evolução da concentração de nitrito [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] em mg/L N durante o período dos experimentos crônico com larvas.....	21

<b>Figura 13:</b> Evolução da concentração de nitrato [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] em mg/L N durante o período dos experimentos agudo com larvas.....	22
<b>Figura 14:</b> Evolução da concentração de nitrato [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] em mg/L N durante o período dos experimentos crônico com larvas.....	22
<b>Figura 15.</b> Tamanho inicial das larvas de <i>O. taurinus</i> no experimento de efeitos crônicos da água contaminada de dois igarapés de Manaus: (A) = por desova e (B) = médias de todas as desovas por tratamento; (C) = Controle; (IMI) = Igarapé do Mindu; (IQU) = Igarapé do Quarenta; (I) = desvio padrão e (●) = média.....	24
<b>Figura 16.</b> Duração do período larvário de <i>O. taurinus</i> no experimento de efeitos crônicos da água contaminada de dois igarapés de Manaus: (A) = por desova e (B) = média de todas as desovas por tratamento; (C) = Controle; (IMI) = Igarapé do Mindu; (IQU) = Igarapé do Quarenta; (I) = Desvio padrão e (●) = Média.....	25
<b>Figura 17.</b> Tamanho na metamorfose de <i>O. taurinus</i> no experimento de efeitos crônicos da água contaminada de dois igarapés de Manaus: (A) = por desova e (B) = média de todas as desovas por tratamento; (C) = Controle; (IMI) = Igarapé do Mindu; (IQU) = Igarapé do Quarenta; (I) = Desvio padrão e (●) = Média.....	26
<b>Figura 18.</b> Taxa de crescimento das larvas de <i>O. taurinus</i> no experimento de efeitos crônicos da água contaminada de dois igarapés de Manaus: (A) = por desova e (B) = média de todas as desovas por tratamento; (C) = Controle; (IMI) = Igarapé do Mindu; (IQU) = Igarapé do Quarenta; (I) = Desvio padrão e (●) = Média.....	27

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Parâmetros físico-químicos obtidos <i>in loco</i> dos Igarapés do Mindu (IMI) e do Quarenta (IQU), nos locais de coleta de desovas na RFAD (Igarapé Barro Branco - IBB), poças 1, 2 e 3) e da água de poço do laboratório (APL).....	18
---	----

## Resumo

Este trabalho teve como objetivo verificar através de exposições a curto e longo prazo, os efeitos diretos e indiretos das águas contaminadas dos Igarapés do Mindu e do Quarenta sobre larvas do anuro, hilídeo *Osteocephalus taurinus*. Para tanto, foram realizados dois experimentos através de exposições de 96hs a um gradiente crescente de concentrações, se avaliou os efeitos agudos da contaminação, sobre ovos e larvas em estágio 25 – larva livre, natante e sem a presença de brânquias externas. Não foi verificada mortalidade e nem anomalias aparentes em curto prazo para ambos os igarapés tanto para os estágios de ovo, como para o de larva. Para avaliação dos efeitos crônicos da exposição, foram utilizadas larvas em estágio 25 de Gosner, onde estas foram expostas às águas contaminadas até alcançarem a metamorfose em um experimento unifatorial utilizando um tratamento Controle e dois outros utilizando 100% da concentração da água dos respectivos igarapés. Os compostos nitrogenados [Amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ )] verificados ao longo dos experimentos mostraram-se sempre em maior concentração para o Igarapé do Mindu em relação ao do Quarenta e, apesar de as concentrações de pH, oxigênio dissolvido e temperatura terem se mantido sempre próximas entre os tratamentos e tendo ainda todos os indivíduos recebido a mesma alimentação, nos dois tratamentos com água dos igarapés, houve diferença significativa na duração do período larvário, no tamanho da metamorfose bem como na taxa de crescimento em relação ao Controle. O período larvário no Igarapé do Mindu foi menor, com o tamanho e a taxa de crescimento maiores em relação ao Controle. Já no Igarapé do Quarenta, a situação se inverteu, foi observado um período larvário maior, com o tamanho na metamorfose e a taxa de crescimento menores que no Controle. Os efeitos crônicos produzidos por exposição à água de igarapés contaminados são indícios de que a contaminação contínua dos igarapés e/ou córregos urbanos pode desequilibrar a dinâmica populacional de anfíbios, trazendo consigo, outras alterações ecológicas. Estes resultados demonstram possíveis conseqüências da contaminação por efluentes urbanos sobre comunidades larvárias de anfíbios de igarapés e poças de floresta de terra firme.

## **Abstract**

This study aimed to verify through exposure to short-and long-term, direct and indirect effects of contaminated water from streams Mindu and Quarenta on anuran larvae, hylid *Osteocephalus taurinus*. Two experiments were conducted over 96 hours of exposure to a gradient of increasing concentrations, we assessed the acute effects of contamination on eggs and larvae in stage 25 – larvae free natantia and without the presence of external gills. There was no mortality and no apparent anomalies in the short term for both streams for both stages of egg, as for the larvae. To assess the effects of chronic exposure, larvae were used in stage 25 of Gosner, where they were exposed to contaminated water until they reach metamorphosis in an experiment using a one-factor control and two treatment using 100% of the concentration of water in their streams. The nitrogen compounds [ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ )] produced in the course of the experiments were always in a higher concentration for the affluent of Mindu in relation to the Quarenta, while the concentrations of pH, dissolved oxygen and temperature have remained always close between treatments and also taking all individuals received the same feed in two streams of water treatments, a significant difference in the length of larvae, size of metamorphosis and growth rate compared to control. The period of the larvae in Stream Mindu was lower, with the size and growth rate higher than in the control. In the Stream Quarenta, the situation is reversed, there was a period of larvae increased with the size at metamorphosis and growth rate lower than in control. The effects produced by chronic exposure to contaminated water streams are indications that the continuous contamination of streams and / or urban streams can upset the population dynamics of amphibians, carrying, other ecological changes. These results demonstrate possible consequences of contamination by urban sewage on larval amphibian communities of streams and pools of forest land.

"Hoje é o petróleo. Amanhã poderá ser a água.  
Hoje é o deserto do Oriente Médio. Amanhã poderá ser a bacia Amazônica."

(Antônio Ermírio de Morais)

**Formatação:**

A dissertação apresentada segue as normas do periódico *South American Journal of Herpetology*.

## Objetivos

### *Objetivo Geral*

Avaliar, em condições experimentais, os efeitos da contaminação por efluentes urbanos das águas de dois igarapés de Manaus - Amazonas, sobre o desenvolvimento de ovos e larvas de *Osteocephalus taurinus*.

### *Objetivos Específicos*

- Estimar a concentração letal média CL50(96) das águas contaminadas de dois igarapés da área urbana de Manaus (Igarapés do Quarenta e do Mindu) para ovos e larvas de *Osteocephalus taurinus*, por testes de toxicidade aguda;
- Estimar os efeitos crônicos das águas contaminadas dos Igarapés do Quarenta e do Mindu sobre larvas de *O. taurinus*, medindo as seguintes variáveis:
  - (1) Mortalidade;
  - (2) Duração do período larvário;
  - (3) Tamanho na metamorfose (no estágio 41 de Gosner);
  - (4) Taxa de crescimento larvário (do início do experimento até a metamorfose);
- Verificar os parâmetros físico-químicos (pH, oxigênio dissolvido, temperatura), e analisar os parâmetros químicos (amônio, nitrito e nitrato) *in loco* da água dos locais de coleta e dos experimentos.

# EFEITO DA ÁGUA CONTAMINADA DE DOIS IGARAPÉS DE MANAUS –AM SOBRE OVOS E LARVAS DE *Osteocephalus taurinus* (ANURA, HYLIDAE)

Jorge Harison Pereira do Nascimento<sup>1\*</sup>; Claudia keller<sup>2</sup>; Marcelo Menin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Manaus/AM, \*jorgeh.doc@hotmail.com

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus/AM

## Resumo

Este trabalho teve como objetivo verificar através de exposições a curto e longo prazo, os efeitos diretos e indiretos das águas contaminadas dos Igarapés do Mindu e do Quarenta sobre larvas do anuro, hílideo *Osteocephalus taurinus*. Para tanto, foram realizados dois experimentos através de exposições de 96 horas a um gradiente crescente de concentrações, onde se avaliou os efeitos agudos da contaminação, sobre ovos e larvas em estágio 25 – larva livre, natante e sem a presença de brânquias externas. Não foram verificadas mortalidade nem anomalias aparentes em curto prazo para ambos os igarapés tanto para os estágios de ovo, como para o de larva. Para avaliação dos efeitos crônicos da exposição, foram utilizadas larvas a partir do estágio 25 de Gosner, onde estas foram expostas às águas contaminadas até alcançarem a metamorfose em um experimento unifatorial utilizando um tratamento controle e dois outros utilizando 100% da concentração da água dos respectivos igarapés. Os compostos nitrogenados [Amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ )] verificados ao longo dos experimentos mostraram-se sempre em maior concentração para o Igarapé do Mindu em relação ao do Quarenta e apesar de as concentrações de pH, oxigênio dissolvido e temperatura terem se mantido sempre próximas entre os tratamentos e tendo ainda todos os indivíduos recebido a mesma alimentação, nos dois tratamentos com água dos igarapés, houve diferença significativa na duração do período larvário, no tamanho da metamorfose bem como na taxa de crescimento em relação ao controle. Sendo o período larvário no Igarapé do Mindu menor, com o tamanho e a taxa de crescimento maiores em relação ao controle. Já no Igarapé do Quarenta, a situação se inverteu, foi observado um período larvário maior, com o tamanho na metamorfose e a taxa de crescimento menores que no controle. Os efeitos crônicos produzidos por exposição à água de igarapés contaminados são indícios de que a contaminação contínua dos igarapés e/ou córregos urbanos pode desequilibrar a dinâmica populacional de anfíbios, trazendo consigo, outras alterações ecológicas. Estes resultados demonstram possíveis conseqüências da

contaminação por efluentes urbanos sobre comunidades larvárias de anfíbios de igarapés e poças de floresta de terra firme.

**Palavras chave:** Anfíbios, Igarapé do Mindu, Igarapé do Quarenta, Toxicidade, Compostos nitrogenados

## **Introdução**

A expansão urbana no município de Manaus (Amazonas, Brasil) em associação com processos de desmatamento, uso não planejado do solo, emissões de efluentes líquidos industriais e domiciliares, além do aporte de poluentes transportados do meio urbano por meio dos sistemas de drenagem e escoamento superficial, são alguns dos múltiplos fatores responsáveis pelas modificações das características originais dos igarapés (ou riachos de pequeno e médio porte na região) (Santos *et al.* 2006; Santana & Barroncas, 2007; Rodrigues *et al.*, 2009). Além disso, o aporte de fertilizantes (Waichman, 2008) tem causado grandes impactos nestes ambientes aquáticos, gerando alterações ecológicas decorrentes de um processo de eutrofização (Melo *et al.* 2005) e da alteração de outras condições físico-químicas (Silva, 1996; Elias & Silva, 2001).

Já na década de 80 se relatou um elevado grau de degradação da água dos igarapés urbanos de Manaus, devido à elevada carga de matéria orgânica neles despejada (Fonseca *et al.*, 1982 e Bringel, 1986), e vem sendo sistematicamente registrado desde então, com a adição de efluentes industriais que aumentaram a carga de metais nestes igarapés (Silva, 1996; Cleto Filho, 1998; Melo *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2006; Santana & Barroncas, 2007; Franco-de-Sá, 2009; Rodrigues *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2009). As microbacias dos Igarapés Educandos e São Raimundo tem como principais tributários os Igarapés do Quarenta e Mindu, respectivamente, e drenam áreas densamente povoadas desde suas nascentes até a foz. Transformam-se, em vista da ocupação residencial de suas margens e das atividades industriais em seu entorno, em receptores de resíduos domésticos e industriais (Pinto *et al.*, 2009).

Tais atividades vêm ajudando a aumentar consideravelmente a quantidade de nitrogênio reativo, que é definido como N ligado a carbono, oxigênio ou hidrogênio

(Wetzel, 2001), e dessa forma alterando significativamente o ciclo biogeoquímico de um dos elementos mais importantes para o metabolismo dos ecossistemas (Esteves, 1998). A importância deste está relacionada ao fato de ele constituir moléculas biológicas envolvidas na estrutura, atividade, metabolismo, armazenamento e regulação dos seres vivos (Sterner & Elser, 2002; Pereira & Mercante, 2005). Conseqüentemente, alterações na especiação molecular, disponibilidade, distribuição e abundância relativa deste elemento têm conseqüências importantes para o desempenho dos indivíduos, para a dinâmica das populações e para a estrutura e composição das comunidades biológicas.

As alterações ocorrem em diversas escalas espaciais: apesar de descargas maiores de nitrogênio concentrarem-se em áreas de agricultura intensiva e em regiões industrializadas (Matthews, 1994; Townsend *et al.*, 1996), mecanismos de transporte regionais como rios e córregos, e globais como correntes oceânicas e massas de ar, têm o potencial de redistribuir o nitrogênio de modo que atinjam áreas remotas e aparentemente não perturbadas, onde mesmo em baixas concentrações possam trazer conseqüências biológicas importantes (Blaustein *et al.*, 2003).

Em ecossistemas aquáticos o nitrogênio pode ocorrer de diversas formas (Suipaúba-Tavares, 1998), embora as predominantes sejam o nitrogênio molecular ( $N_2$ ), a amônia não-ionizada ( $NH_3$ ), o íon amônio ( $NH_4^+$ ), onde estas duas formas juntas constituem a amônia total, ou nitrogênio amoniacal total (Pereira & Mercante, 2005), nitrito ( $NO_2^-$ ) e nitrato ( $NO_3^-$ ), além de um grande número de compostos orgânicos dissolvidos (aminas, peptídeos, purinas, aminoácidos, etc.) e particulados (detritos fitoplâncton, zooplâncton, bactérias, etc.) (Wetzel, 2001). A forma predominante de nitrogênio em um ambiente depende de vários fatores, incluindo pH, temperatura e disponibilidade de oxigênio (Environment Canada, 2003).

Diversos estudos demonstram que, em igarapés que cruzam a cidade de Manaus, há uma intensa contaminação por ação antrópica, resultando em redução no teor de oxigênio dissolvido e aumento do pH da água (Melo *et al.* 2005; Santos *et al.* 2006; Mendonça & Santana, 2006; Santana & Barroncas, 2007), que são naturalmente ácidas (Mendonça *et al.*, 2005). Coliformes fecais e totais estão presentes em quantidade acima das taxas permissíveis para recreação e consumo humano (Melo *et al.* 2005; Santana & Barroncas 2007).

Organismos que dependem de ambientes aquáticos em alguma fase de sua vida são os mais diretamente afetados pela contaminação dos corpos d'água, especialmente organismos que habitam sistemas hídricos de floresta de terra firme (McCauley, 1966), que normalmente são igarapés de baixa vazão (até quarta ou quinta ordem) ou ambientes lênticos, como poças d'água e baixios, que acumulam contaminantes mais rapidamente e por mais tempo do que os ambientes de água corrente (Harrel, 1985; McCauley, 1966). Sendo que já há registros de modificações ocasionadas por compostos nitrogenados, afetando muitos grupos de organismos (Camargo & Alonso, 2006). Estudos comprovam que amônia, nitrito e nitrato são tóxicos para insetos (Kelso *et al.*, 1999), peixes (Tomasso & Carmichel, 1986), moluscos (Alonso & Camargo, 2003), crustáceos (Alonso & Camargo, 2004) e anfíbios (Vieira, 1986; Hecnar, 1995. Marco *et al.*, 1999, 2001; Johansson *et al.*, 2001; De Oliveira, 2003; Camargo *et al.*, 2005; Krishnamurthy *et al.*, 2006).

Dentre estes, merece atenção especial o grupo dos anfíbios, pois são reconhecidos como excelentes bioindicadores de estresse ambiental (Blaustein & Wake, 1995) por possuírem diversos atributos morfo-fisiológicos e de história de vida que os tornam particularmente vulneráveis a alterações ambientais. Além disso, atualmente há um crescente interesse no estudo de anfíbios, devido a recentes declínios e extinções populacionais registradas em todo o mundo (Blaustein & Kiesecker, 2002; Blaustein *et al.*, 2003; La Marca *et al.*, 2005). Entre as principais causas desses declínios estão a destruição dos habitats, poluição de corpos d'água, radiação UV e doenças (Young *et al.*, 2001; Dodd & Smith, 2003). Existem crescentes evidências de que contaminantes químicos são de alguma forma, responsáveis por declínios de populações de anfíbios (Young *et al.*, 2001; Blaustein *et al.*, 2003; Camargo *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005). Os estressores químicos, como pesticidas, metais, acidificação e fertilizantes, podem afetá-los direta ou indiretamente, ou seja, mesmo que não causem mortalidade em curto prazo, podem trazer outras conseqüências futuras (Rouse *et al.*, 1999; Boone & Bridges, 2003; La Marca *et al.*, 2005; Agostini *et al.*, 2010).

Características das larvas de anfíbios como a pele fina (Sparling *et al.*, 2000), rica em vasos sanguíneos, respiração por brânquias externas nos seus primeiros dias de vida, possivelmente as tornam mais vulneráveis à contaminação dos corpos de água. A suscetibilidade de anfíbios a contaminantes depende do estágio em que eles se

encontram, do tempo de exposição e da concentração do contaminante (Howe *et al.*, 1998; Boone *et al.*, 2001).

No Brasil, o problema da contaminação por nitrogênio é muito importante, pois de acordo com a SBH, 2010, esse é o país onde se encontra a maior riqueza de anfíbios do planeta sendo reconhecidas 875 espécies de anfíbios, dentre estes, 847 são anuros, e ao mesmo tempo, ocorre à utilização em massa de fertilizantes e a expansão da fronteira agrícola bem como a urbanização em áreas anteriormente preservadas vem ocorrendo de forma acelerada (IBGE, 2010).

Larvas de anfíbios expostas a níveis subletais de poluentes podem apresentar malformações (Burkhart *et al.*, 1998, Monteiro, 2004; Agostini *et al.*, 2010), menor tamanho corporal (Mahaney, 1994; Johansson *et al.*, 2001; Monteiro, 2004; Agostini *et al.*, 2010), maior tempo de desenvolvimento até a metamorfose (Johansson *et al.*, 2001; Bridges, 2000; Pahkala *et al.*, 2001; Greulich & Pflugmacher, 2003; Monteiro, 2004; Franco-de-Sá, 2009), diminuição da performance natatória (Berrill *et al.*, 1994; Hopkins *et al.*, 2000) e maior susceptibilidade à predação (Broomhall, 2002; Monteiro, 2004), a infecções (Lefcort *et al.*, 1997; Gedron *et al.*, 2003) e à radiação UV (Blaustein *et al.*, 2003).

Na Amazônia Central, grande parte das espécies de anuros possui fase larval aquática, sendo que muitas se reproduzem em poças marginais aos igarapés (Hödl, 1990; Lima *et al.*, 2006). No entanto, nessa região o uso de espécies de anuros para monitoramento da qualidade da água não é comum, apesar de alguns estudos confirmarem sua efetividade como indicadores biológicos da qualidade da água (Monteiro, 2004; Franco-de-Sá, 2009).

Em experimentos de efeito agudo da água contaminada do Igarapé do Educandos em Manaus – Amazonas sobre ovos e larvas de *Osteocephalus taurinus*, a mortalidade em curto prazo resultante da exposição à concentração de 3,6% da água poluída do igarapé foi de 100% para ovos e 6% para larvas (Franco-de-Sá, 2009). Em experimentos de efeito crônico, este autor não observou diferenças nos parâmetros de desenvolvimento de larvas até a metamorfose entre água limpa e concentrações até 1,8% da água do respectivo igarapé, porém, observou que a duração do período larvário,

o tamanho na metamorfose e a taxa de crescimento das larvas foram significativamente mais altos em concentrações de 3,6% ou superiores da água contaminada em relação a larvas cultivadas em água limpa. Além disso, Franco-de-Sá (2009) constatou uma alta variabilidade entre larvas de diferentes desovas na resposta à contaminação. Contudo, não foi possível avaliar quais componentes presentes na água dos experimentos podem ter levado a esse efeito.

A diminuição da concentração de oxigênio dissolvido e o aumento da alcalinidade na água são fortes indicadores da condição do ambiente (INPA, 2001; Pereira & Mercante, 2005). Além de poder causar algum efeito maléfico às larvas de *O. taurinus* (Monteiro, 2004). A decomposição da matéria orgânica proveniente de esgotos sem tratamento forma compostos nitrogenados, que são extremamente tóxicos (Boyd & Queiroz, 2004; Pereira & Mercante, 2005).

Para melhor avaliar a suscetibilidade aguda e crônica dos ovos e larvas de uma espécie de anuro amazônico em relação à água contaminada por efluentes urbanos e industriais de dois igarapés de Manaus – Amazonas, e a fim de possibilitar a comparação com os dados de outros autores, o presente estudo foi realizado com a mesma espécie, *Osteocephalus taurinus*, e nas mesmas condições experimentais de laboratório de estudos anteriores para óleo lubrificante queimado (Monteiro, 2004) e água do Igarapé do Educandos (Franco-de-Sá, 2009).

## Material e Métodos

### *Espécie estudada, coleta de amostras e manutenção de desovas*

Foram utilizados ovos e larvas de *Osteocephalus taurinus* (Hylidae), uma espécie nativa e de ampla distribuição na Amazônia central, que ocorre em florestas primárias e secundárias de terra firme (Lima *et al.*, 2006), cujo pico de reprodução ocorre no início da estação chuvosa. As desovas com, em média, 2500 ovos (Hero, 1991; Gascon, 1995; Lima *et al.*, 2006) são depositadas em uma película de gelatina sobre a água (Bokermann, 1964; Lima *et al.*, 2006), preferencialmente em poças temporárias rasas de beira de caminhos ou em poças isoladas na floresta (Hero, 1991). Suas larvas são raspadoras e detritívoras, além de vorazes predadores de ovos coespecíficos ou de outras espécies (Lima *et al.*, 2006). Suas desovas são facilmente encontradas e contém suficiente número de ovos para atender ao tamanho amostral requerido para os experimentos. Suas larvas são facilmente mantidas em laboratório e seus locais preferenciais de desova (poças temporárias originadas a partir do transbordamento de igarapés após as chuvas) são mais suscetíveis à contaminação do que corpos de água corrente.

Cinco desovas (A, B, C, D, E, em estágio de ovo ou larvas recém-eclodidas), foram coletadas entre janeiro e maio de 2010 na Reserva Florestal Adolpho Ducke – RFAD (02° 55' e 03° 01'S, 59° 53' e 59° 59'W) (Figura 1), localizada ao norte de Manaus-AM. As desovas foram coletadas em poças nas margens de um igarapé (Barro Branco), em poças temporárias de beira de caminho ou em bacias plásticas de 70 x 50 x 20 cm contendo água do igarapé mais próximo (Barro Branco) e liteira, simulando poças naturais.

As desovas foram acondicionadas individualmente em baldes plásticos, contendo água da própria poça e, em seguida, transportadas ao laboratório onde foram mantidas individualmente em caixas plásticas de 70 x 50 x 20 cm contendo água de poço e dotadas de sistema de aeração artificial (denominadas daqui em diante de estoque), à temperatura ambiente de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas de claridade. As larvas foram alimentadas a partir do estágio 25 de Gosner (1960) com ração triturada

para roedores (Pasto Verdi - Zootecna<sup>®</sup>). Esta foi oferecida diariamente *ad libitum* aos animais, evitando-se o acúmulo no fundo.

Outras três desovas (F, G e H) em estágio de ovos foram coletadas entre 14 – 16 de maio de 2010, nos mesmos locais, da mesma maneira supracitada e transportadas ao laboratório de apoio à pesquisa da própria RFAD, onde foram realizados os estudos de efeito agudo com ovos de *O. taurinus*.

A área urbana de Manaus abrange quatro bacias hidrográficas, sendo três contribuintes da grande bacia do rio Negro e uma contribuinte da bacia do rio Amazonas. Duas encontram-se integralmente dentro da cidade – a bacia do Igarapé de São Raimundo e do Igarapé do Educandos – e duas parcialmente inseridas na malha urbana – bacia do Igarapé do Tarumã-Açu e do rio Puraquequara (GeoManaus, 2002; Mendonça & Santana, 2006) (Figura 1).

O Igarapé do Quarenta (IQU) é o principal afluente da bacia de Educandos e sua nascente está localizada na zona leste da cidade, apresenta margens desmatadas e, em alguns trechos, vegetação secundária. Em seu curso superior drena parte da área do Distrito Industrial de Manaus, onde recebe efluentes provenientes das atividades de diversas indústrias do setor químico, termoplástico, metalúrgico, mecânico e eletroeletrônico, cujos principais agentes poluidores são metais (Lopes *et al.*, 2008).

O Igarapé do Mindu (IMI) é o principal afluente da bacia do São Raimundo e tem uma de suas nascentes na zona leste da cidade, próximo à Reserva Florestal Adolpho Ducke. Suas margens apresentam-se em parte com cobertura vegetal e outras desmatadas e totalmente habitadas, recebe em seu percurso esgotos domésticos e resíduos orgânicos despejados pela comunidade. Cruza a cidade no sentido nordeste-sudoeste, percorrendo e delimitando inúmeros bairros (Lopes *et al.*, 2008).

As microbacias do Igarapés do Educandos e São Raimundo, que possuem os igarapés supracitados respectivamente, drenam áreas densamente povoadas desde sua nascente até a foz. Transformam-se, em vista de ocupação de sua ocupação residencial

de suas margens e das atividades industriais em seu entorno, em receptores de resíduos domésticos e industriais (Pinto *et al.*, 2009).

A crescente ocupação urbana provocou a retirada da mata ciliar (excetuando alguns pequenos trechos de preservação), assoreamento do leito e, conseqüentemente, transbordamento dos mesmos, quando ocorrem eventos pluviométricos de grande escala. Outro fenômeno de igual, ou até maior amplitude, é a descaracterização física, química e biológica de suas águas (Pinto *et al.*, 2009), além da contaminação por metais, como comprovado em diversos estudos: Silva (1996), Cleto Filho (1998), Melo *et al.*, (2005), Santos *et al.*, (2006), Santana & Barroncas, 2007, Franco-de-Sá, 2009, Rodrigues *et al.*, 2009.

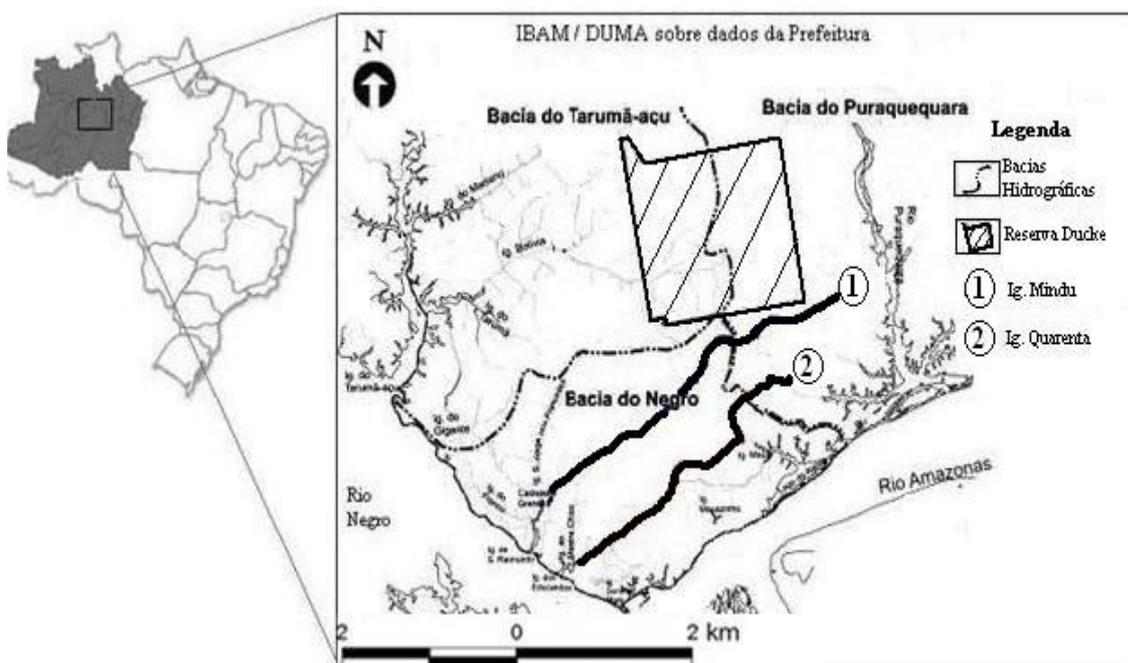


Figura 1: Hidrografia da cidade de Manaus, indicando a localização da Reserva Ducke (quadrado demarcado) e os dois igarapés onde foram coletadas as amostras de água contaminada: (1) Igarapé do Mindu (IMI) e (2) Igarapé do Quarenta (IQU).

A água para os experimentos foi coletada no dia 01/04/2010 em pontos de máxima contaminação do Igarapé do Mindu ( $03^{\circ}09'S$ ,  $60^{\circ}01'W$ ), que apresentava uma tonalidade esverdeada e odor característico de matéria orgânica em decomposição, e do Igarapé do Quarenta ( $03^{\circ}12'S$ ,  $59^{\circ}98'W$ ), que apresentava uma coloração enegrecida e odor moderado de matéria orgânica em decomposição. Foram coletados 500 litros de

água de superfície (aproximadamente 15 cm de profundidade) às margens de cada igarapé.

A água coletada foi armazenada separadamente em quatro tonéis previamente lavados e esterilizados de polietileno com capacidade de 300 litros, preenchidos com 250 litros, sendo dois tonéis para o Igarapé do Mindu e outros dois para o Igarapé do Quarenta (totalizando 500 litros de cada igarapé), estes, foram transportados ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA onde permaneceram em repouso fora do laboratório, parcialmente vedados, em temperatura ambiente e local sombreado, até a estabilização natural do pH. Para que todos os experimentos fossem realizados com o mesmo nível de contaminantes, a água só foi utilizada nos experimentos após a estabilização desta, que indica que os principais componentes presentes nela, como os compostos nitrogenados, também se estabilizaram (Santana, G. P. comunicação pessoal).

Três dias antes do início de cada experimento, a quantidade de água contaminada necessária era retirada diretamente dos tonéis localizados fora do laboratório (água da superfície dos tonéis) e transferida para outros galões distintos de 50 litros – referentes aos respectivos igarapés – que encontravam-se no interior do laboratório, permitindo que a temperatura da água contaminada se nivelasse com a da água dos tratamentos controle e de cultivo dos ovos e larvas, evitando choque térmico.

### *Experimentos*

Os testes de toxicidade aguda e crônica da água dos Igarapés do Mindu e do Quarenta sobre larvas de *O. taurinus*, foram conduzidos no Laboratório de Ecologia de Populações do Departamento de Ecologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Os testes de toxicidade aguda para os ovos foram conduzidos no laboratório de apoio à pesquisa da RFAD, visando realizar tal experimento com os ovos no estágio menos desenvolvido possível.

## Estágios de desenvolvimento

Os estágios das larvas de *O. taurinus* nas diversas fases dos experimentos, foram determinados de acordo com a classificação de Gosner (1960): **ovo** [até o estágio 17, quando surge o botão da cauda]; **larva imóvel** [estágios 18 a 20, quando começam a apresentar respostas musculares e movimentos mais visíveis]; **larva com brânquias externas** [estágios 21 a 24]; **larva livre natante** [estágios 25 ao 42, quando já não possuem brânquias externas e passam a nadar livremente e comer]; **início da absorção da cauda** [final do estágio 41]; **metamorfose** [estágio 42]; período de absorção da cauda [42 ao 48, larva sai da água e não se alimenta] e indivíduo **pós-metamórfico** [estágio 48, indivíduo com cauda completamente absorvida] (Figura 2).

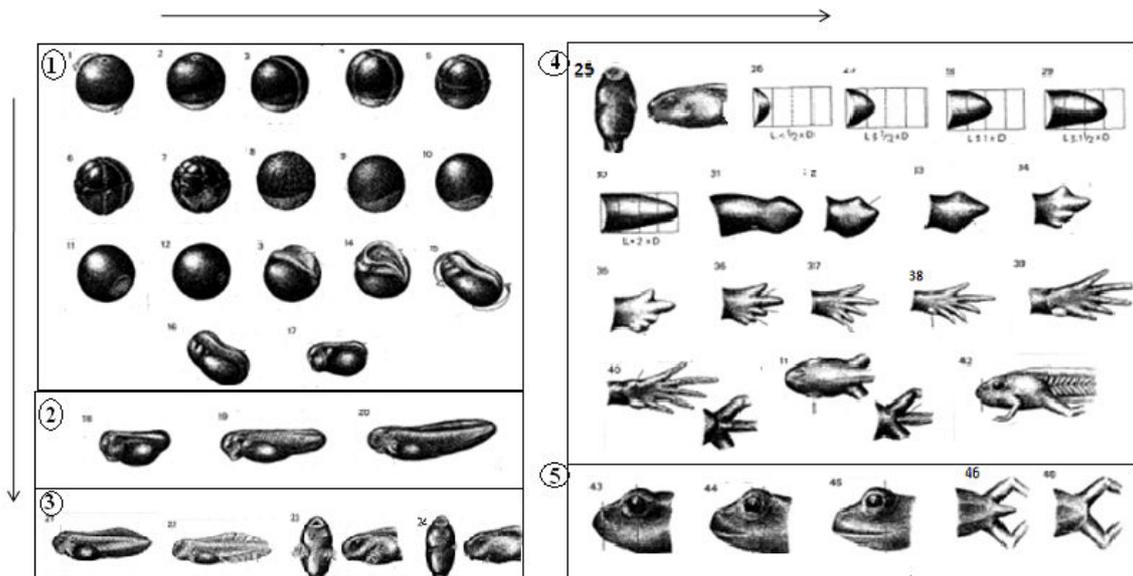


Figura 2: Escala completa de Gosner (1960); 1 = ovos, 2 = larvas imóveis, 3 = larvas com brânquias externas, 4 = de larva livre natante até a metamorfose, 5 = absorção da cauda.

## *Efeito agudo da contaminação sobre ovos e larvas de *O. taurinus**

Este experimento teve por objetivo determinar a concentração letal média CL50 para ovos e larvas de *O. taurinus* e estabelecer a susceptibilidade relativa destes dois estágios de desenvolvimento à exposição, em concentrações agudas, à água dos dois igarapés. A CL50 é um parâmetro padrão em ecotoxicologia, que equivale à concentração de uma substância que causa 50% de mortalidade em um grupo de organismos sob condições específicas em um intervalo de tempo pré-determinado (Larini, 1970; Lombardi, 1999). Neste caso foi utilizado o intervalo de 96 horas, correspondendo ao mesmo período utilizado em outros estudos com esta mesma espécie (Monteiro, 2004; Franco-de-Sá, 2009).

Os intervalos entre os níveis de concentração do contaminante e para as revisões foram definidos de acordo com o modelo de Sprague (1990), em seqüência geométrica crescente. Foram usadas 10 concentrações da água contaminada de cada igarapé na razão de 1,71, sendo [0, 14, 24, 41, 70, 119, 202, 344, 589 e 1000 mL/L] - para cada fase de vida (ovo e larva), onde a concentração [0 mL/L] correspondeu ao controle de cada experimento. Para o tratamento controle e para as diluições dos demais tratamentos foi utilizada água de poço. Para cada concentração, foram estabelecidas as seguintes réplicas: (para os experimentos com as larvas, as desovas A, B, C, D e E, e para os experimentos com os ovos, outras desovas, F, G e H), a fim de controlar o efeito parental sobre a variabilidade da resposta ao teste. Cada réplica consistiu em um pote de polietileno com capacidade de 1000 mL contendo 800 mL de solução-teste (tratamentos) ou água pura de poço (controle) e 10 indivíduos, em sistema semi-estático – sem circulação de água e sem aeração (Figura 3). Ao todo, foram utilizados 300 ovos (das desovas F, G e H) e 500 larvas (das desovas A, B, C, D e E) para cada experimento. As revisões foram definidas na razão de 1,50, tanto para ovos quanto para larvas e foram realizadas às 4, 6, 9, 13, 19, 29, 43, 64 e 96 horas após o início do experimento.

Os experimentos com larvas foram realizados entre 09/05 e 13/06/2010, e com os ovos entre 14 e 22/05/2010. Os ovos utilizados apresentavam em torno de oito horas

de vida (aproximadamente estágio três), e as larvas encontravam-se no estágio 25 no início dos experimentos.

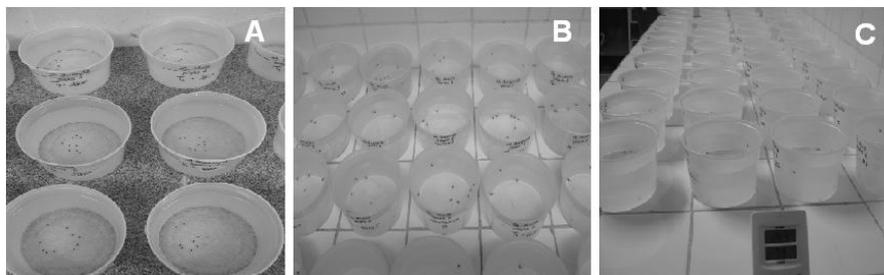


Figura 3. Detalhe da distribuição de réplicas dos experimentos de efeitos agudos: (A) = com ovos, (B) = com larvas e (C) = detalhe da vista geral de distribuição.

#### *Efeito crônico da contaminação sobre larvas de *O. taurinus**

Este experimento teve por objetivo avaliar a resposta dos principais parâmetros de desenvolvimento larvário à exposição à água contaminada dos Igarapés do Quarenta e Mindu, desde a fase inicial de larva livre natante até a metamorfose.

Não houve registros de mortalidades no experimento de CL50(96) com larvas para nenhum dos dois igarapés. Por isso, para a análise do efeito crônico da contaminação sobre os parâmetros de desenvolvimento das larvas de *O. taurinus*, foi utilizada a concentração máxima [100%] do contaminante de cada um dos igarapés em teste, além do controle - concentração [0%], consistindo de água pura de poço.

Para cada tratamento (IMI [100%] e IQU [100%]) e o controle, foram utilizadas 50 réplicas (sendo 10 réplicas por desova – A, B, C, D e E, a fim de controlar o efeito parental sobre os parâmetros medidos). Cada réplica consistiu de um indivíduo, inicialmente no estágio 25, mantido em um pote de polietileno com capacidade de 1000 mL, contendo 800 mL de água, em sistema semi-estático - sem circulação de água e sem aeração. Ao todo, foram utilizadas 150 larvas (Figura 4).



Figura 4. Detalhe da distribuição de réplicas no experimento de efeitos crônicos: (A) = larva sendo alimentada, (B) = destaque das unidades experimentais e (C) = vista geral da distribuição.

As larvas foram alimentadas diariamente com ração triturada para coelhos (Pasto Verdi - Zootecna<sup>®</sup>) *ad libitum*, procurando evitar o acúmulo de ração não consumida na unidade experimental. A água das unidades era trocada a cada quatro dias.

Foram medidos os seguintes parâmetros de desenvolvimento:

**(a) Mortalidade:** número de indivíduos que morreram entre o início dos experimentos e o dia da metamorfose (final do estágio 41; quando ocorre a extrusão do primeiro membro anterior);

**(b) Duração do período larvário:** tempo decorrido (em dias) entre a data observada ou estimada de desova (estabelecida baseando-se no estágio de desenvolvimento que se encontravam, e seguindo a escala de Gosner, 1960) e a data de metamorfose;

**(c) Tamanho na metamorfose:** comprimento do rostro até o final da cauda (em mm com precisão de 1 mm) dos indivíduos no final do estágio 41, quando atingem seu comprimento total máximo. Os indivíduos foram medidos colocando-os em uma caixa de vidro de 10 x 10 x 3 cm contendo água e papel milimetrado no fundo;

**(d) Taxa de crescimento:** razão entre [a data de início do experimento e a data de metamorfose pelo tempo decorrido (em dias) x 100].

Todas as larvas se encontravam no estágio 25 de Gosner, 1960 na data inicial do experimento. Os indivíduos de cada desova usados no experimento foram selecionados

no sentido de evitar indivíduos fracos e/ou com aspecto doente e de padronizar a distribuição de tamanho das larvas entre tratamentos e o controle. O tamanho inicial e final das larvas (comprimento rostro-ponta da cauda) foram medidos do mesmo modo descritos acima para tamanho de metamorfose.

#### *Medidas de parâmetros químicos e físico-químicos da água*

Foram aferidos pH, temperatura e oxigênio dissolvido *in loco*, além de coletadas amostras de água para análise de amônio, nitrito e nitrato de três poças de onde foram coletadas desovas de *O. taurinus*, do igarapé próximo à estas (Barro Branco – IBB – na RFAD), da água de poço usada no laboratório (APL) e dos Igarapés do Mindu e do Quarenta momentos antes da troca de água dos experimentos.

Em todos os casos medidos *in loco* foram aferidos os seguintes parâmetros físico-químicos: pH e temperatura utilizando um pHmetro (YSI 63/ mod. 63-10 FT) e oxigênio dissolvido (OD) utilizando um oxímetro (YSI 55/ mod. 55-25 FT) portáteis. Durante todo o experimento, foram escolhidas diariamente duas réplicas diferentes de cada tratamento para aferir o pH, teor de oxigênio dissolvido e a temperatura afim de acompanhar a evolução destes parâmetros ao longo do experimento.

A cada sete dias, foram coletadas amostras de água do estoque (que se encontrava dentro do laboratório) de cada Igarapé (IMI e IQU), antes de colocá-las nas unidades experimentais, a fim de controlar o efeito das excretas do animal ou da ração não consumida sobre as medições nas réplicas, e assim, determinar a quantidade mínima de amônio, nitrito e nitrato a que as larvas estavam sendo submetidas em cada troca de água.

Todas as análises relativas aos compostos nitrogenados foram determinados por espectrofotometria adaptada de APHA (1985), Golterman *et al.* (1978) e Mackereth *et al.* (1978) para o sistema FIA (Análise por Injeção de Fluxo). Parte das amostras de água destinada à análise dos compostos nitrogenados foi transferida para frascos de polietileno de 250 ml e aclimatadas a temperatura entre 4 e 6 °C em caixas térmicas durante o transporte até o laboratório. As amostras foram analisadas em parceria com o

laboratório de Química Ambiental da Coordenação de Pesquisas em Clima e Recursos Hídricos – CPCRH do INPA.

### *Análise de dados*

Após a verificação das premissas para testes paramétricos, os resultados dos experimentos crônicos para as larvas foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) bifatorial, utilizando como fatores TRATAMENTO (controle, IMI e IQU) e DESOVA (A, B, C, D e E). As análises foram realizadas utilizando programa MYSTAT<sup>®</sup> 12 Statistics - I.

## **Resultados**

### *Medidas de parâmetros físico-químicos e químicos da água*

Durante todo o experimento, a temperatura da água variou entre 24 e 26°C. A água do controle manteve os valores sempre em torno das seguintes médias para os compostos nitrogenados:  $[\text{NH}_4^+]$  ( $< 0,10 \text{ mg/L N}$ ),  $[\text{NO}_2^-]$  ( $< 0,030 \text{ mg/L N}$ ) e  $[\text{NO}_3^-]$  ( $1,60 \text{ mg/L N}$ ). Os parâmetros físico-químicos diferiram bastante entre os locais de coleta tanto *in loco* (Tabela 1) quanto entre os experimentos (Figuras 5 a 14). No período de 22/5 a 2/6, o pH não foi medido devido a problemas técnicos com a aparelhagem.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos obtidos *in loco* dos Igarapés do Mindu (IMI) e do Quarenta (IQU), nos locais de coleta de desovas na RFAD (Igarapé Barro Branco - IBB), poças 1, 2 e 3) e da água de poço do laboratório (APL).

Locais	pH	OD (mg/L)	Temperatura (°C)	Amônio (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) (mg/L N)	Nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) (mg/L N)	Nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) (mg/L N)
APL	7,36	5,12	23,8	< 0,10	< 0,03	1,60
IMI	6,94	1,02	30,1	10,08	< 0,03	< 0,01
IQU	6,90	1,95	28,2	3,75	1,08	1,00
IBB	3,30	5,26	25,1	0,129	< 0,03	0,041
Poça 1	6,07	4,64	24,7	0,232	< 0,03	0,021
Poça 2	6,51	4,54	24,5	2,598	0,034	< 0,01
Poça 3	5,68	4,80	24,5	4,295	< 0,03	< 0,01

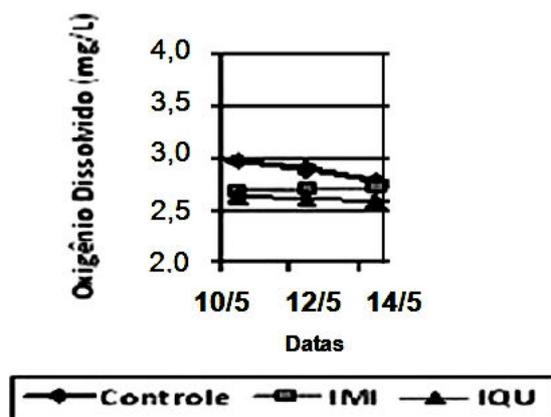


Figura 5: Evolução do oxigênio dissolvido (OD) em mg/L durante o período do experimento agudo com as larvas.

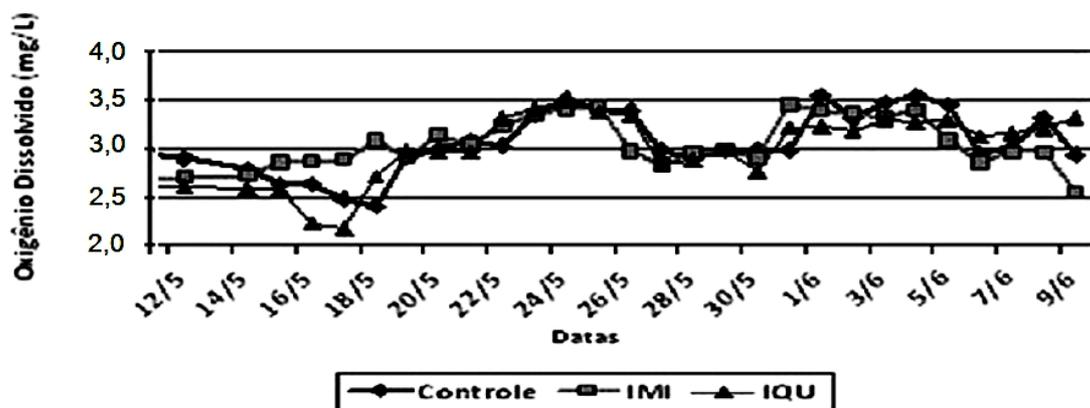


Figura 6: Evolução do oxigênio dissolvido (OD) em mg/L durante o período dos experimentos crônicos com as larvas.

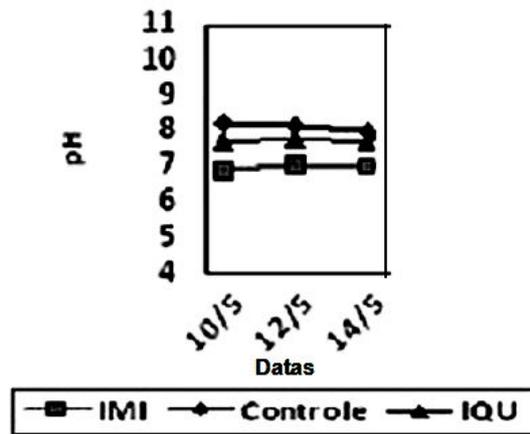


Figura 7: Evolução do pH durante o período do experimento agudo com as larvas.

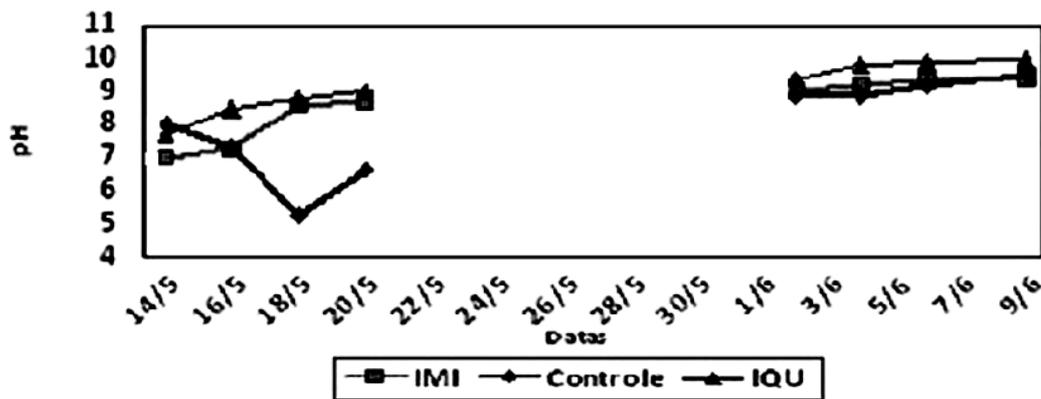


Figura 8: Evolução do pH durante o período do experimento crônico com as larvas.

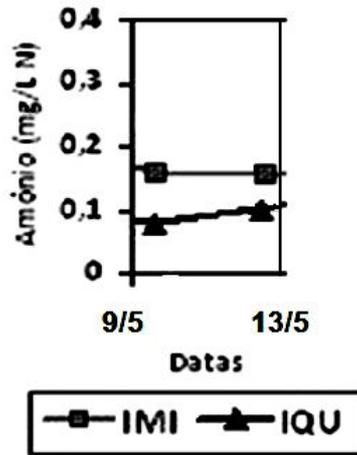


Figura 9: Evolução da concentração de amônio  $[NH_4^+]$  em mg/L N durante o período dos experimentos agudo com larvas.

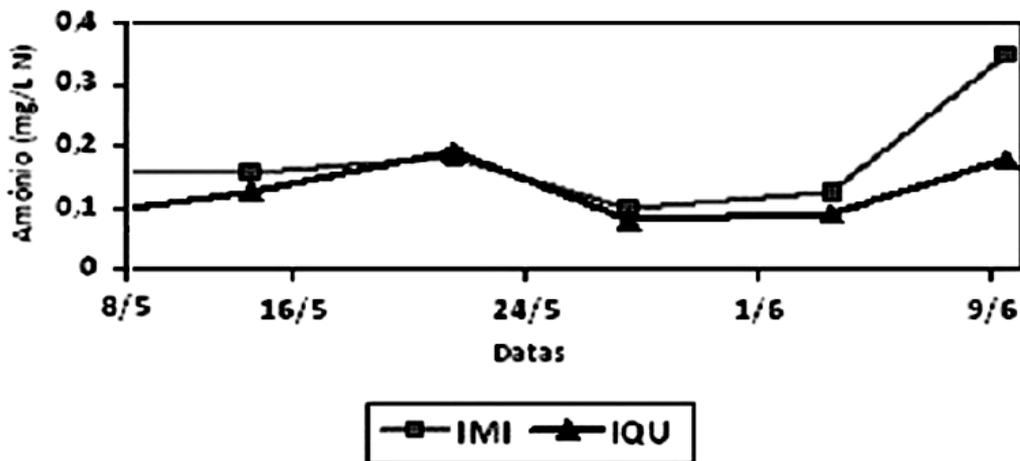


Figura 10: Evolução da concentração de amônio  $[NH_4^+]$  em mg/L N durante o período do experimento crônico com larvas.

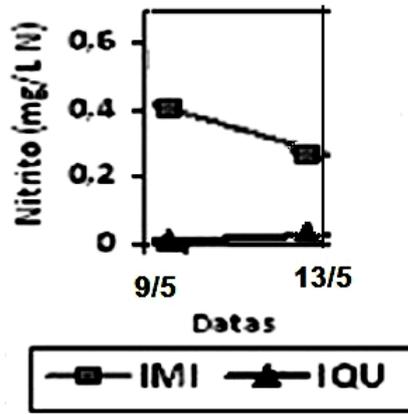


Figura 11: Evolução da concentração de nitrito [NO<sub>2</sub><sup>-</sup>] em mg/L N durante o período do experimento agudo com larvas.

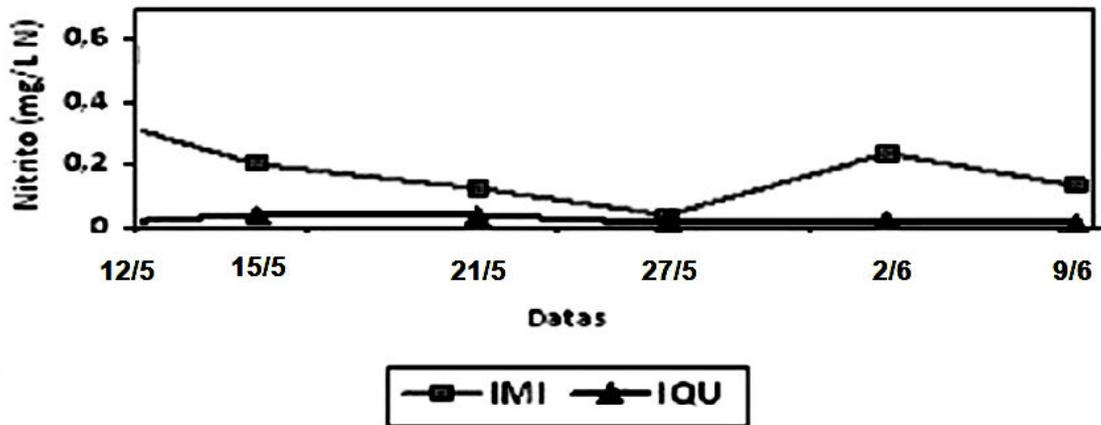


Figura 12: Evolução da concentração de nitrito [NO<sub>2</sub><sup>-</sup>] em mg/L N durante o período dos experimentos crônico com larvas.

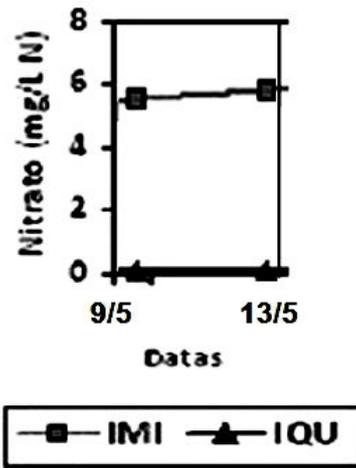


Figura 13: Evolução da concentração de nitrato [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] em mg/L N durante o período dos experimentos agudo com larvas.

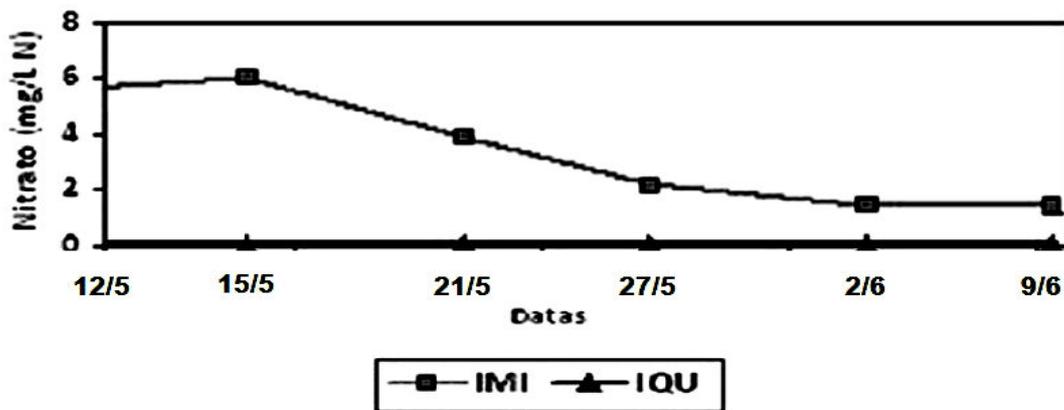


Figura 14: Evolução da concentração de nitrato [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] em mg/L N durante o período dos experimentos crônico com larvas.

### *Efeito agudo da contaminação sobre os ovos e larvas de O. taurinus*

Durante os experimentos de exposição aguda à água contaminada dos Igarapés do Mindu (IMI) e Quarenta (IQU), não foi registrada mortalidade de embriões nem de larvas, conseqüentemente não foi possível calcular a CL50<sub>96</sub>. Também não foram observadas alterações físicas aparentes nos ovos/embriões, e todas as larvas encontravam-se no estágio 25 ao final dos experimentos.

### *Efeito Crônico da contaminação sobre larvas de O. taurinus*

O tamanho inicial das larvas usadas no experimento de efeitos crônicos variou significativamente entre desovas  $F(4, 146) = 54,02$ ;  $p < 0, 0001$  (Figura 15A). No entanto, como houve seleção das larvas usadas no experimento, a fim de padronizar o comprimento inicial, não houve diferença significativa no tamanho inicial de girinos entre tratamentos e controle  $F(2, 146) = 0,03$ ;  $p = 0, 9666$  (Figura 15B). Sendo assim, o tamanho inicial não foi utilizado como co-variável nas análises dos demais parâmetros de desenvolvimento.

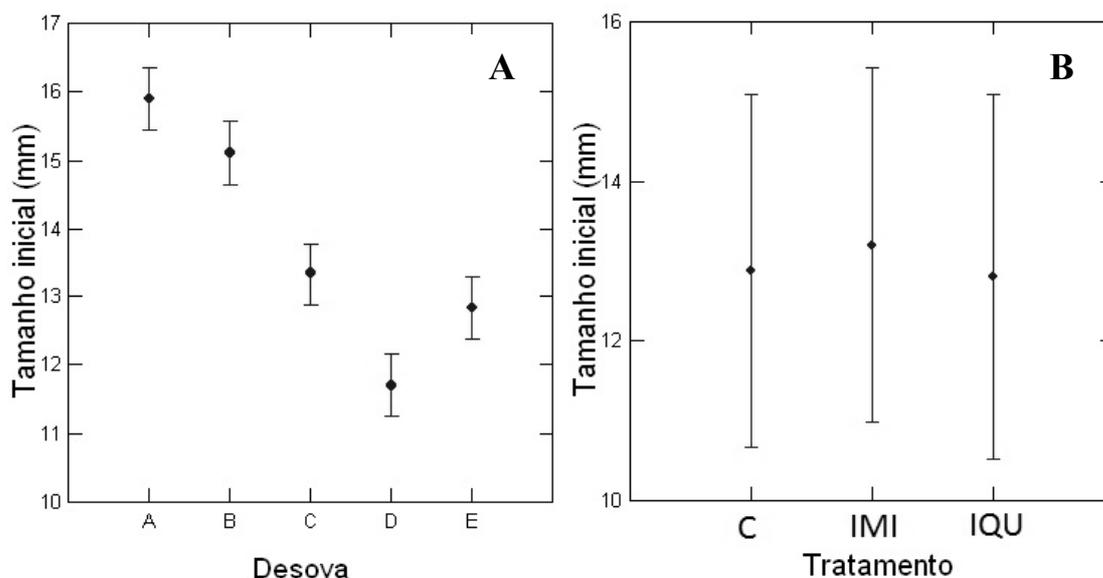


Figura 15. Tamanho inicial das larvas de *O. taurinus* no experimento de efeitos crônicos da água contaminada de dois igarapés de Manaus: (A) = por desova e (B) = médias de todas as desovas por tratamento; (C) = Controle; (IMI) = Igarapé do Mindu; (IQU) = Igarapé do Quarenta; (I) = Desvio padrão e (●) = Média.

#### a) Mortalidade

Para as larvas do controle e da água do Igarapé do Mindu (IMI) não foi observada mortalidade. Entre as larvas na água do Igarapé do Quarenta (IQU) foram contabilizados três indivíduos mortos.

#### b) Duração do período larvário

Houve diferença significativa na duração do período larvário entre as desovas [ $F(4, 146) = 57,64$ ;  $p < 0,0001$ ] (Figura 16A) e entre os tratamentos [ $F(2, 146) = 74,47$ ;  $p < 0,0001$ ] (Figura 16B). Observa-se que no tratamento IMI as larvas se desenvolveram mais rápido e as do IQU que por sua vez desenvolveu-se mais lentamente que no controle (Figura 16B).

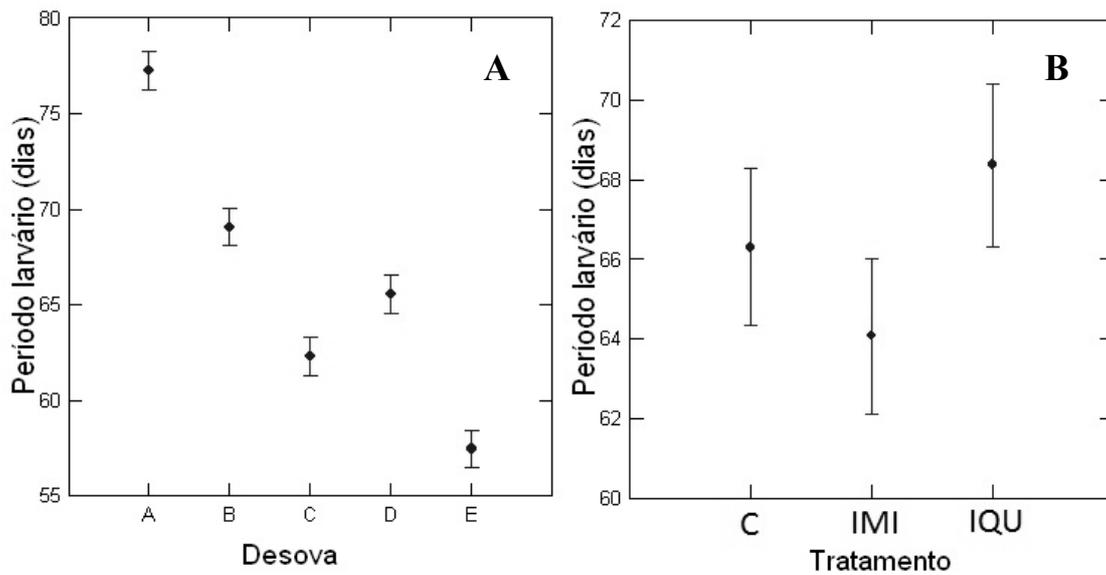


Figura 16. Duração do período larvário de *O. taurinus* no experimento de efeitos crônicos da água contaminada de dois igarapés de Manaus: (A) = por desova e (B) = média de todas as desovas por tratamento; (C) = Controle; (IMI) = Igarapé do Mindu; (IQU) = Igarapé do Quarenta; (I) = Desvio padrão e (●) = Média.

### c) Tamanho na metamorfose

Houve diferença significativa no tamanho na metamorfose entre as desovas [ $F(4, 146) = 2,53$ ;  $p = 0, 0430$ ] (Figura 17A) e entre os tratamentos [ $F(2, 146) = 9,55$ ;  $p = 0, 0001$ ] (Figura 17B). Observa-se que as larvas do tratamento IQU tenderam a ser menores que as do IMI e do controle (Figura 17B).

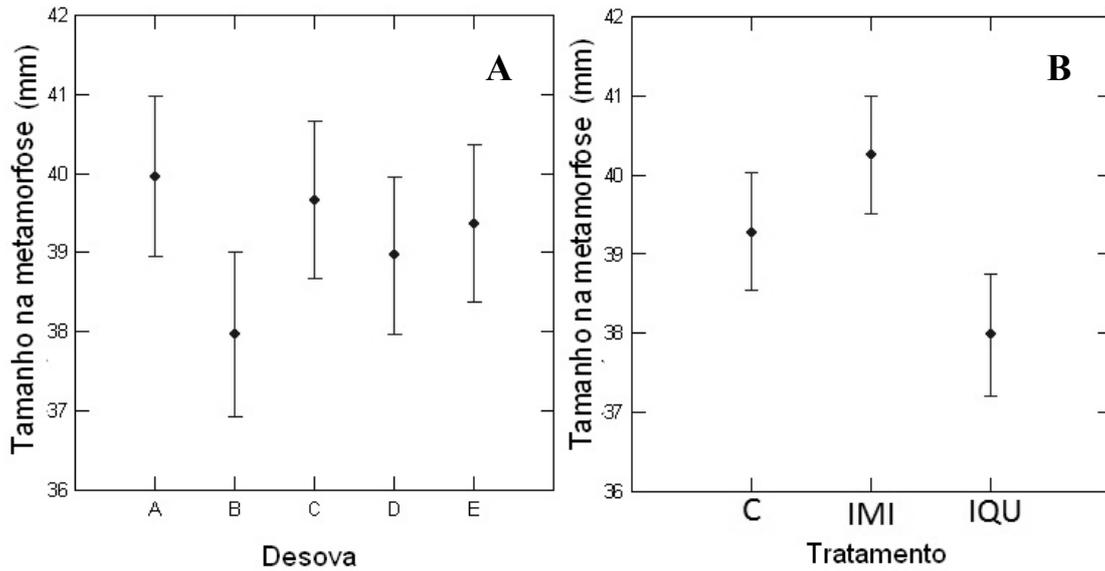


Figura 17. Tamanho na metamorfose de *O. taurinus* no experimento de efeitos crônicos da água contaminada de dois igarapés de Manaus: (A) = por desova e (B) = média de todas as desovas por tratamento; (C) = Controle; (IMI) = Igarapé do Mindu; (IQU) = Igarapé do Quarenta; (I) = Desvio padrão e (●) = Média.

d) *Taxa de crescimento*

Houve diferença significativa na taxa de crescimento entre as desovas [ $F(4, 146) = 28,73$ ;  $p < 0, 0001$ ] (Figura 18A) e entre tratamentos [ $F(2, 146) = 62,98$ ;  $p < 0, 0001$ ] (Figura 18B). A taxa de crescimento no tratamento IMI tendeu a ser maior em relação ao IQU e controle, enquanto que a taxa de crescimento do IQU foi claramente menor que a dos demais (Figura 18B).

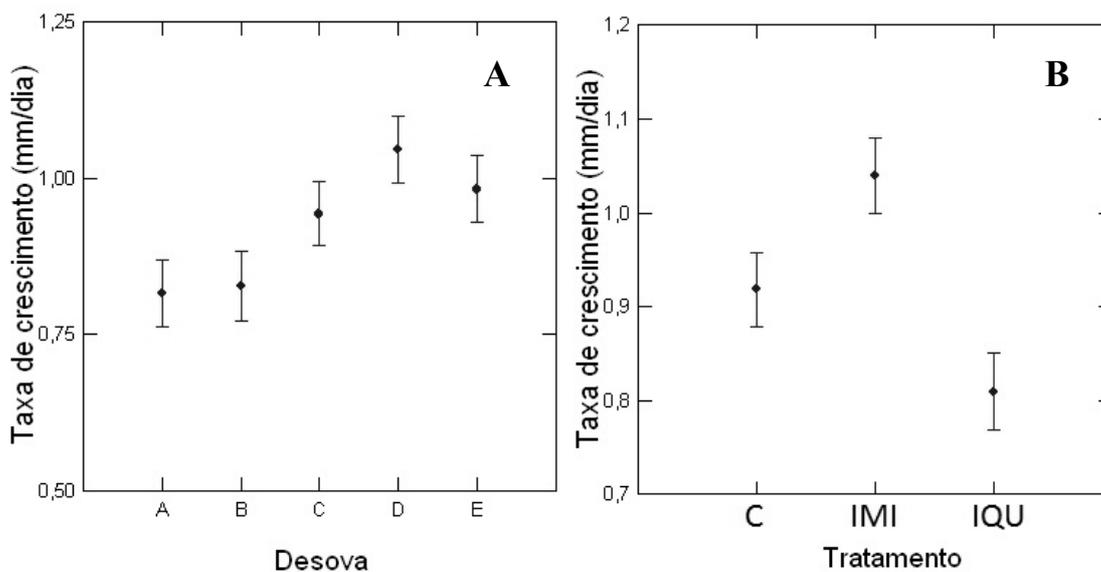


Figura 18. Taxa de crescimento das larvas de *O. taurinus* no experimento de efeitos crônicos da água contaminada de dois igarapés de Manaus: (A) = por desova e (B) = média de todas as desovas por tratamento; (C) = Controle; (IMI) = Igarapé do Mindu; (IQU) = Igarapé do Quarenta; (I) = Desvio padrão e (●) = Média.

## Discussão

### *Efeitos agudos da contaminação – teste de CL50*

A água contaminada utilizada nos experimentos foi posta em repouso até a estabilização de seu pH, favorecendo a decomposição de grande parte da matéria orgânica presente. Esta em condições aeróbicas forma aminas que poderiam ser oxidadas e produzir nitrito este, por sua vez, poderia ser oxidado produzindo nitrato (Vieira, 1986; Geomanus, 2002). Porém, provavelmente a decomposição da matéria orgânica na água ocorreu de forma anaeróbica, pois em águas paradas a quantidade de oxigênio é muito pequena (Vieira, 1986), fato que também poderia ser observado em poças temporárias utilizadas por *Osteocephalus taurinus*.

Com o oxigênio em quantidades baixas, ocorre a decomposição das proteínas, formando aminoácidos, que, por sua vez, são parcialmente desdobrados em amônia, ácidos graxos e ácido carbônico, tornando a água imprópria para larvas de anuros (Vieira, 1986).

Em um período de curto prazo, as águas de ambos igarapés não causaram mortalidade de ovos de *Osteocephalus taurinus*. Isto possivelmente se deveu à proteção oferecida pela gelatina que os envolvia (do estágio 0 ao 17) e à possível tolerância aos níveis de contaminação da água a que foram expostos do estágio 18 ao 25 (Berrill et al., 1994; Mahaney, 1994; Bridges, 2000; Greulich & Pflugmacher, 2003; Monteiro, 2004). Além disso, segundo Monteiro (2004), as larvas desta espécie são mais suscetíveis à contaminação aguda por derivados de petróleo que os ovos. O que também pode ter ocorrido em relação aos compostos nitrogenados medidos neste estudo.

De acordo com De Oliveira (2003), os sinais característicos de intoxicação em larvas de anuros incluem morte súbita, boca aberta, vermelhidão na pele, excesso de muco, brânquias vermelhas e brilhantes, desorientação, ataques convulsivos, dificuldade em ganhar peso e opacificação das cores. Contudo, neste estudo não foram constatados estes sinais, nem malformações, ao contrário do observado por Franco-de-Sá (2009), que registrou morte súbita, para larvas desta mesma espécie, em baixas diluições de água contaminada de outro igarapé de Manaus - AM (Igarapé do Educandos). O baixo nível de concentração de oxigênio dissolvido na água, poderia ter causado redução na sobrevivência das larvas, e, mesmo com valores baixos, em média 3,0 mg/L, não foi um fator determinante para causar mortalidade das larvas, tanto para o Igarapé do Mindu, quanto para o do Quarenta.

A acidificação de rios em zonas temperadas tem impactos negativos sobre populações de anfíbios (Rowe *et al.*, 1998), porém, o pH de águas pretas amazônicas, como as dos igarapés de onde provêm as desovas usadas no presente estudo, variam naturalmente entre 3 e 5 (Geomanus, 2002; Mendonça *et al.*, 2005). Podendo, então, a situação oposta ser observada para esta espécie. Portanto, a alcalinidade encontrada na

água contaminada dos experimentos, provavelmente não afetou negativamente as larvas. Durante os experimentos o pH dos Igarapés do Mindu e do Quarenta estiveram em média sempre acima de 6,5 e o pH do controle também seguiu esta tendência, estando fora da amplitude de variação de pH encontrado em corpos d'água não contaminados da região, e, dentro dos níveis encontrados em águas antropizadas. Valores de pH acima de 5,0, em Manaus, só são encontrados no igarapé contaminados (Geomanaus, 2002). Nas poças temporárias onde as desovas foram coletadas o pH foi, em média, de 6,0. O que levanta a possibilidade de os ovos e larvas desta espécie tolerar ambientes alcalinos com oxigenação baixa, visto que, suas desovas são depositadas em poças temporárias, sem circulação da água e, portanto, sem adição de oxigênio.

Mesmo o Igarapé do Quarenta pertencendo à mesma microbacia hidrográfica do Educandos - igarapé avaliado por Franco-de-Sá (2009), onde o autor encontrou um ambiente com forte odor de matéria orgânica em decomposição, além de quantidades de metais bem acima dos permitidos pela resolução corrente, indicando uma alta taxa de contaminação (Franco-de-Sá, 2009). O Igarapé do Educandos recebe diretamente água de esgotos domésticos sem tratamento, além da água já contaminada de outros importantes Igarapés - Mestre Chico, Manaus, além do próprio Quarenta - (GeoManaus, 2002), aumentando consideravelmente sua taxa de contaminação. Podemos considerar, portanto, que a carga de poluentes do Igarapé do Educandos é bem superior à dos Igarapés do Quarenta e do Mindu, o que pode explicar, em parte, a ausência de mortalidade aguda tanto para ovos quanto para larvas de *O. taurinus* neste trabalho, em contraste com os resultados obtidos por Franco-de-Sá (2009).

#### *Avaliação de efeitos crônicos da contaminação*

Nos experimentos de exposição crônica, mesmo usando concentração de [100%] da água contaminada de ambos Igarapés (Mindu e Quarenta), houve mortalidade mínima em apenas em um dos experimentos, apenas três indivíduos do Igarapé do Quarenta - IQU. As larvas expostas à água do Igarapé do Mindu - IMI chegaram à metamorfose em menos tempo ( $\pm 2$  dias) e com maior tamanho ( $\pm 1,0$  mm) em relação ao controle. Já as larvas expostas à água do Igarapé do Quarenta - IQU demoraram mais

tempo para chegar à metamorfose ( $\pm 2$  dias) e tiveram o tamanho corporal menor ( $\pm 1,5$  mm) em relação ao controle. Em geral, estudos com exposição de larvas de anuros a um estressor que não afeta a eclosão dos ovos, registraram diminuição na duração do período larvário e conseqüentemente diminuição do tamanho de metamorfose, provavelmente para minimizar o tempo de contato com o estressor (Wilbur & Collins, 1973; Bridges, 2000; Pahkala *et al.*, 2001; Agostini *et al.*, 2010). Meus resultados indicaram que as larvas de *O. taurinus* detectaram e responderam aos diferentes estressores, presentes na água em teste, de maneiras diferentes; ora aumentando a duração do período larvário e tendo seu tamanho na metamorfose diminuído; ora reduzindo a duração do período larvário e aumentando o tamanho corporal na metamorfose, fato este, que já foi registrado em outros estudos e para outras espécies como: *Rana sphenoccephala* (Bridges, 2000), *Rana clamitans* (Boone *et al.*, 2001), *Rana arvalis* (Greulich & Pflugmacher, 2003), (Rose, 2005), *Rana catesbeiana* e *R. clamitans* (Smith *et al.*, 2005), *Bufo terrestris* (Edwards *et al.*, 2006), *Bufo fowleri* (Barret *et al.*, 2010) e mesmo para *O. taurinus* que também teve um crescimento maior que o controle (Franco-de-Sá, 2009).

Os teores de oxigênio dissolvido (OD) na água dos locais de coleta na RFAD (Igarapé do Barro Branco e poças temporárias) e da água de poço do laboratório estavam maiores que os encontrados *in loco* nos Igarapés do Mindu (IMI) e do Quarenta (IQU) e durante todos os experimentos. Esta variável é um forte indicador da condição do ambiente com respeito à poluição, pois, a matéria orgânica biodegradável em grandes quantidades, torna o consumo de oxigênio pelos microrganismos no processo de degradação maior que a reposição deste elemento pela atmosfera ou por fotossíntese (INPA, 2001). Os principais responsáveis pela depleção do teor de oxigênio nos Igarapés do Mindu e Quarenta são os esgotos domésticos, que contêm muita matéria orgânica biodegradável (GeoManaus, 2002). Grande parte dos microorganismos degradaram-se no processo de estabilização do pH, antes do início dos experimentos, e, além de não haver reposição destes nutrientes por fontes poluidoras, justifica o aumento no teor de OD nos experimentos.

O fato de que as larvas expostas à água do Igarapé do Mindu terem crescido mais que as do Igarapé do Quarenta pode estar relacionado ao maior teor de nutrientes disponível na água do Mindu, visto que, a partir do estágio 25, as larvas começam a se

alimentar de fontes externas, pois já se esgotaram os recursos do saco vitelino que as mantinham na fase de ovo (Hero, 1990; Lima *et al.*, 2006). O Igarapé do Mindu muito provavelmente possui uma carga poluidora com matéria orgânica bem superior à do Quarenta, já que aquele apresentou uma maior concentração de amônio [ $\text{NH}_4^+$ ]. A amonificação do nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) para formar amônio é favorecida, dentre outros fatores, pela disponibilidade de matéria orgânica (Esteves, 1998; INPA, 2001). A água do Igarapé do Mindu apresentou, também, concentrações mais altas de nitritos e nitratos que a do Quarenta, o que pode ter contribuído com a diferença no desenvolvimento das larvas entre os dois igarapés.

A razão [amônia/amônio] depende do pH, e quando este é inferior a 8,5, ou seja, quando o meio passa de alcalino a neutro ou ácido, verifica-se que o amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) predomina, enquanto a amônia ( $\text{NH}_3$ ) prevalece quando o pH está acima de 8,5, ou seja, quando o meio é alcalino. Por essa razão, quanto mais elevado for o pH, maior será a porcentagem da amônia total presente como  $\text{NH}_3$ , forma não ionizada e, portanto, mais tóxica (Carmouze, 1994; Pereira & Mercante, 2005; Lima *et al.*, 2009).

O pH médio da água durante os experimentos ( $\pm 8,0$ ) foi mais alcalino que o medido nas poças temporárias de onde foram coletadas desovas na RFAD ( $\pm 6,0$ ) e o medido *in loco* nos Igarapés do Mindu (6,94) e do Quarenta (6,90). Contudo, durante os bioensaios, o pH do Mindu manteve-se mais baixo que o do Quarenta, por isso o IMI apresentou maiores concentrações de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), e conseqüentemente menor disponibilidade de amônia ( $\text{NH}_3$ ), ao contrário do Igarapé do Quarenta, o que contribuiu para os períodos larvários maiores e tamanho na metamorfose menores em relação ao controle para este. A ação tóxica do amônio pode envolver a redução da concentração de sódio no sangue para níveis letais, embora na realidade os efeitos negativos mais graves estejam relacionados à sua porção não-ionizada, a amônia (Russo, 1985). A ação tóxica desta sobre os organismos aquáticos envolve diversas alterações bioquímicas do metabolismo, mas o principal efeito negativo causado é a destruição dos tecidos, especialmente do epitélio branquial, o que prejudica a respiração e osmorregulação (Camargo & Alonso, 2006). Estudos revelam que larvas de anuros expostas à ambientes contaminados desviam energia do crescimento e desenvolvimento para suprir os custos metabólicos da desintoxicação, resultando em larvas menores em relação ao controle (Rowe *et al.*, 1998; Pahkala *et al.*, 2001; Agostini *et al.*, 2010).

A diminuição na duração do período larvário de *O. taurinus*, associado à diminuição na taxa de crescimento e do comprimento final das larvas expostas à água contaminada, possibilitaria um maior risco acumulado de morte por predação (Monteiro, 2004), desde que a população de predadores não fosse afetada diretamente em função da contaminação. Por outro lado, o aumento na duração do período larvário também aumenta o risco de morte por dessecação (Blaustein & Kiesecker, 2002; Blaustein *et al.*, 2003; La Marca *et al.*, 2005), exposição a predadores (Monteiro, 2004) e à radiação UV (Blaustein *et al.*, 2003), visto que, estes se desenvolvem em poças temporárias (Hero, 1991; Lima *et al.*, 2006).

O nitrogênio amoniacal resulta da degradação de matéria orgânica e também da excreção direta dos animais, constituindo juntamente com o oxigênio dissolvido um bom indicador de poluição, por isso, em ambientes com concentrações de oxigênio baixa, é comum ser esta a forma de nitrogênio inorgânico mais abundante (INPA 2001). Nos igarapés, onde não há influência de dejetos humanos, os teores de amônia são sempre baixos, estando muitas vezes abaixo do limite de detecção do método (0,1mg/L) (INPA, 2001). No caso dos Igarapés do Mindu e Quarenta, que estão constantemente recebendo cargas de esgotos domésticos e/ou industriais, os valores tendem a ser elevados (GeoManaus, 2002). Os nitritos são uma condição intermediária, tanto na oxidação da amônia a nitrato, como no processo inverso, mas são frequentemente encontrados em ambientes quimicamente reduzidos e, em geral, ausentes em ambientes naturais aerados (Esteves, 1998; INPA, 2001).

Neste experimento os fatores: excreta do animal e ração não consumida, não interferiu no aumento significativo do nitrogênio amoniacal nas unidades experimentais, provavelmente pelo fato de haver água suficiente para diluir as excretas de apenas um indivíduo, e do controle em evitar o acúmulo de alimento no pote, no período de quatro dias.

O papel da identidade das desovas e dos igarapés e, portanto, a magnitude da variação intraespecífica, poderia ser confundida por vários fatores na resposta aos contaminantes, como por exemplo, as condições experimentais, a qualidade da água, tipo de composto químico utilizado e estágio de desenvolvimento dos animais testados

(Marco & Ortiz-Santaliestra, no prelo). Nos experimentos que realizei pode-se descartar o efeito da qualidade da água e dos compostos químicos utilizados, pois estes foram iguais para todas as desovas – para cada igarapé testado. Também pode-se descartar o estágio de desenvolvimento, uma vez que todas as diferentes desovas foram testadas ao redor do estágio 25 (Gosner, 1960), e das condições laboratoriais (temperatura, e fotoperíodo), que foram iguais para todos.

Um fator de grande influência para a ecotoxicidade é a temperatura. Em geral, a solubilidade dos compostos na água e as taxas metabólicas dos organismos (inclusive taxas de absorção e circulação sanguínea) são maiores em temperaturas elevadas, o que pode acentuar os efeitos tóxicos (Cairnis *et al.*, 1975). Por outro lado, conforme as taxas metabólicas aumentam com a temperatura, a desintoxicação bioquímica também pode aumentar, reduzindo eventualmente a toxicidade dos compostos (Howe *et al.*, 1994). Portanto, a temperatura tem grande potencial de influenciar a toxicidade de contaminantes, especialmente para organismos ectotérmicos (Sprague, 1985). Por este motivo, protocolos internacionais determinam  $24 \pm 2$  °C como temperatura padrão para os testes ecotoxicológicos (ASTM, 2004). Sendo assim, a temperatura foi controlada durante todo o experimento mantendo-se em  $25$  °C  $\pm 1$ .

Muitas espécies de anfíbios são suscetíveis aos efeitos tóxicos de compostos nitrogenados como o nitrito e nitrato de amônia: *Bufo bufo* (Rouse *et al.*, 1999), (Marco *et al.*, 1999, 2001), *Rana temporária* (Johansson *et al.*, 2001) e (Camargo *et al.*, 2005). Entre os efeitos tóxicos de nitrato e outros compostos nitrogenados sobre larvas de anfíbios foram registrados natação e movimentos irregulares, agitação e/ou paralisia, alterações morfológicas, escurecimento do corpo (Krishnamurthy *et al.* 2006). Todos os parâmetros de desenvolvimento larvário avaliados variaram significativamente entre as desovas, como observado por Johansson *et al.* (2001) para *Rana temporária*, indicando que existe uma forte variação intraespecífica na susceptibilidade aos contaminantes para esta espécie.

Os efeitos de águas contaminadas de igarapés de Manaus-AM sobre o desenvolvimento de larvas de *Osteocephalus taurinus* podem ser variáveis e contraditórios, produzindo em alguns casos, a esperada redução na duração do período

larvário e aumento no tamanho da metamorfose como no IMI, ou o aumento do período larvário e a diminuição no tamanho de metamorfose como no IQU. Esses resultados corroboram os descritos em outros estudos anteriores, onde, esses efeitos podem ser variáveis tanto entre espécies (Marco *et al.* 1999; Smith *et al.*, 2005) como entre populações da mesma espécie (Johansson *et al.*, 2001; Barret *et al.*, 2010). Por outro lado, em alguns casos, não foi registrado nenhum efeito aparente de nitrato sobre larvas de anuros (Marco *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2005). O presente estudo indica que em condições laboratoriais e após a estabilização da água contaminada dos Igarapés do Mindu e do Quarenta, tivemos apenas alteração no período larvário e no crescimento das larvas de *Osteocephalus taurinus*, não ocasionando mortalidade em massa dos ovos e larvas desta espécie. Contudo, em condições naturais esses resultados podem ser diferentes, ocasionando diversos efeitos maléficis às larvas de *Osteocephalus taurinus*.

A exposição ao nitrogênio inorgânico também pode alterar o comportamento das larvas de anuros causando redução dos níveis de atividade (Marco & Ortiz-Santaliestra, no prelo) indicando que há uma ação tóxica sobre o sistema nervoso central das larvas, o qual controla a atividade e a percepção das condições ambientais (Hecnar, 1995). Alterações na atividade motora podem trazer grandes consequências, visto que esta atividade media o conflito que há entre o forrageamento e evitação aos predadores (Werner & Anholt, 1993). Contudo, infelizmente por questões de logística não foi realizado um estudo mais detalhado a esse respeito neste trabalho.

Quanto à comparação da sensibilidade de *Osteocephalus taurinus* com a de outras espécies reportadas na literatura, é importante salientar que mesmo com o esforço da comunidade científica no sentido de padronizar testes ecotoxicológicos, há algumas diferenças no delineamento experimental das pesquisas publicadas, principalmente com relação aos períodos de exposição, compostos manipulados e estágios de desenvolvimento dos animais testados, que prejudicam qualquer comparação. Por exemplo, em estudos realizados anteriormente com *Osteocephalus taurinus*, um dos autores trabalhou a influência de óleo lubrificante automotivo queimado sobre ovos e larvas (Monteiro, 2004) e o outro, apesar de ter verificado a influência da água de outro Igarapé de Manaus – AM estudou apenas a influência de metais, a presença/ausência de

oxigênio e de alimentação sobre os ovos e larvas (Franco-de-Sá, 2009) e não estudou os compostos nitrogenados, como neste trabalho.

Em regiões tropicais, no entanto, a carência de dados para espécies nativas faz com que os critérios aplicados no controle de qualidade da água sejam derivados de dados obtidos com espécies de zonas temperadas (Kwok *et al.*, 2007). O problema dessa estratégia é que ela assume que a sensibilidade das espécies tropicais é similar à das espécies de zonas temperadas. Em um estudo de revisão feito por Kwok *et al.* (2007) demonstra que não há um padrão único para a sensibilidade relativa de espécies tropicais e temperadas. Este trabalho comparou a sensibilidade de peixes, anfíbios e diversos grupos de invertebrados a 18 substâncias tóxicas, e observou que, por exemplo, para a maioria dos metais as espécies temperadas tendem a ser mais sensíveis que as tropicais, enquanto que para pesticidas e amônia não-ionizada as espécies tropicais são provavelmente mais sensíveis.

De acordo com Birge *et al.* (2000) esta sensibilidade não segue um padrão consistente, e no presente estudo, isto também foi observado: para experimentos de longo prazo com distintas desovas de uma mesma espécie, os resultados foram contraditórios para os diferentes igarapés testados, tanto em relação ao tempo de desenvolvimento, tamanho final e taxa de crescimento. Atrelado a isto, o efeito combinado de vários poluentes é a causa mais provável de anomalias no desenvolvimento e declínio de populações de anfíbios (Blaustein & Kiesecker, 2002; Pakhala *et al.*, 2002; Franco-de-Sá, 2009; Barret *et al.*, 2010).

Este estudo, juntamente com anteriores utilizando óleo lubrificante queimado (Monteiro, 2004) e água contaminada do Igarapé do Educandos em Manaus, AM, Brasil (Franco-de-sá, 2009), vem demonstrando que *Osteocephalus taurinus* pode não ser considerado um bom indicador de qualidade ambiental, frente às diversas respostas encontradas. Contudo, é cedo para definir padrões gerais, uma vez que há limitada capacidade de extrapolação de resultados obtidos para diferentes espécies, compostos ou ecossistemas (Schiesari *et al.*, 2007).

Pequenos lagos ou poças podem apresentar concentrações de nitrogênio elevadas suficientemente para afetar os anfíbios que dependem destes ambientes, por possuírem

menor volume de água, e conseqüentemente menor capacidade de diluir grandes concentrações de nitrogênio (Hecnar, 1995; Marco *et al.*, 1999). No Brasil, as informações a respeito de concentrações de N inorgânico em ecossistemas aquáticos, restringem-se basicamente a rios e reservatórios, nesses ambientes, essas concentrações se mantêm quase sempre na faixa de microgramas por litro (CETESB, 2009), e, portanto muito abaixo de níveis tóxicos para a maioria dos organismos aquáticos (Marco & Ortiz-Santaliestra, no prelo).

Contudo, de acordo com Smith *et al.*, 2005, elevadas concentrações de compostos nitrogenados na natureza podem ser benéficas para consumidores primários, como larvas de anuros, devido ao aumento da produtividade primária, porém, concentrações consideradas inofensivas em testes de laboratório podem tornar-se prejudiciais nos ambientes naturais devido a sinergismos com outros fatores físicos, biológicos ou químicos (Marco & Ortiz-Santaliestra, no prelo). Segundo Hatch & Blaustein, (2000), a radiação UV-B pode aumentar os efeitos tóxicos do nitrito e do nitrato. Baixas concentrações de oxigênio dissolvido podem aumentar os efeitos negativos causados pelo nitrito, nitrato e amônia total (Hatch & Blaustein, 2000), e a temperatura e o pH podem influenciar na toxicidade da amônia total devido a alterações na proporção entre as formas ionizada e não-ionizada (Carmouze, 1994; Hatch & Blaustein, 2000; Pereira & Mercante, 2005; Lima *et al.*, 2009).

Sendo assim, resta saber se os compostos nitrogenados estão ou se podem causar de fato outros efeitos negativos sobre larvas de anuros na natureza, e em que situações isso ocorre com maior frequência e intensidade.

Estudos ecotoxicológicos, como o que aqui apresento, talvez permitam futuramente desenvolver critérios de qualidade ambiental mais adequados à conservação dos ambientes aquáticos tropicais. Por estes motivos, evidências biológicas, ecotoxicológicas, químicas, físicas e físico-químicas devem ser empregadas de forma integrada, para a obtenção de informações objetivas, que subsidiem ações de proteção do meio ambiente. Portanto, estudos de laboratório, manipulação de poluentes isoladamente, ou em mais complexos modelos multivariados, poderão ser feitos futuramente com o intuito de completar este e os demais estudos feitos a respeito deste assunto. Além disso, é de fundamental importância que as concentrações de nitrogênio

inorgânico, ou mesmo os demais parâmetros físico-químicos sejam monitorados diretamente em campo. Assim, saberemos a que concentrações as larvas são de fato expostas na natureza, e principalmente, poderemos avaliar como as atividades humanas estão afetando a qualidade ambiental, bem como os efeitos dessa degradação sobre a biodiversidade.

### **Conclusão**

1. As condições físico-químicas e químicas da água dos Igarapés do Mindu e do Quarenta mostraram-se estar mais degradadas que a água dos demais locais estudados.
2. A água dos Igarapés do Mindu e do Quarenta não causaram nenhum tipo de dano aparente, em um período de 96 horas, em ovos e larvas de *Osteocephalus taurinus*.
3. Após um período de longo prazo de exposição, as larvas de *Osteocephalus taurinus*, não sofreram mortalidade e tiveram seu período larvário diminuído, tamanho na metamorfose e taxa de crescimento aumentados, quando expostos à água do Igarapé do Mindu.
4. Após um período de longo prazo de exposição, as larvas de *Osteocephalus taurinus*, não sofreram mortalidade e tiveram seu período larvário aumentado, tamanho na metamorfose e taxa de crescimento diminuído, quando expostos à água do Igarapé do Quarenta.
5. Houve significativa variação intraespecífica na sensibilidade de larvas de *Osteocephalus taurinus* expostos à água dos Igarapés do Mindu e Quarenta.

## Literatura citada

- American Public Health Association – APHA. 1985. American Water Work Association – AWWA; Water Pollution Control Federation – WPCF (eds). **Standard Methods of the Experimentation of Water and Wasterwater**. New York, 14: 1268 p.
- Agostini, M.G.; Natale, G.S.; Ronco, A.E. 2010. Lethal and sublethal effects of cypermethrin to *Hypsiboa pulchellus* tadpoles. **Ecotoxicology**. 19 (8): 1545-1550.
- Alonso, A.; Camargo, J. A. 2003. Short-term toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to the aquatic snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 70: 1006 – 1012.
- Alonso, A.; Camargo, J.A. 2004 Toxic effects of unionized ammonia on survival and feeding activity of the freshwater amphipod *Eulimnogammarus toletanus* (Gammaridae, Crustaea). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 72: 1052-1058.
- American Society for Testing and Materials – ASTM. 2004. Active standard: E1439-1498 (2004) **Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX)**.
- Barret, K.; Guyer, C.; Watson, D. 2010. Water from Urban Streams Slows Growth and Speeds Metamorphosis in Fowler’s Toad (*Bufo fowleri*). **Larvae Journal of Herpetology**. 44 (2): 297–300.
- Berrill, M.; Bertram, S.; McGillivray, L.; Kolohon, M.; Pauli, B. 1994. Effects of low concentrations of forest-use pesticides on frog embryos and tadpoles. **Environ. Toxicol. Chem.**, 13: 657-664.
- Birge, W. J.; Westerman, A. G.; Spromberg, J. A. 2000. Comparative toxicology and risk assessment of amphibians. 727-791. In. Sparling, D. W.; Linder, G.; Bishop, C. A. (eds), **Ecotoxicology of amphibians and reptiles**. Society of Environmental Toxicology an Chemistry Press. Pensacola, Florida.
- Blaustein, A. R.; Wake, D. B. 1995. The puzzle of declining amphibian populations. **Scientific American**, 272: 52-57.
- Blaustein, A. R.; Romansic, J. M.; Kiesecker, J. M.; Hatch, A. C. 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. **Diversity & Distributions**, 9: 123-140.
- Blaustein, R. B.; Kiesecker, J. M. 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. **Ecology Letters**, 5: 597-608.
- Bringel, S. R. B. 1986. **Estudos do nível de poluição nos igarapés do Quarenta e do Parque Dez de Novembro**. Relatório Técnico, Instituto de Tecnologia da Amazônia/UTAM.

- Broomhall, S. 2002. The effects of endosulfan and variable water temperature on survivorship and subsequent vulnerability to predation in *Litoria citropa* tadpoles. **Aquatic Toxicology**, 61: 243-250.
- Boone, M. D.; Bridges, C. M.; Rothermel, B. B. 2001. Growth and development of larval green frogs (*Rana clamitans*) exposed to multiple doses of an insecticide. **Oecologia**, 129: 518-524.
- Boone, M. D.; Bridges, C. M. 2003. Effects of pesticides on amphibian populations. In: Semlitsch, R. D. (Ed.). **Amphibian Conservation**. Washington: Smithsonian Institution: 152-167.
- Bokermann, W. C. A. 1964. Field observations on the hylid frog *Osteocephalus taurinus* Fitz. **Herpetologica**, 20: 252-255.
- Boyd, C. E.; Queiroz, J. F. 2004. Manejo das condições do sedimento do fundo e da qualidade da água e dos efluentes de viveiros. In: Cyrino, J. E. P.; Urbinati, E. C.; Fracalossi, D. M.; Castagnolli, N. (Ed.) Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. São Paulo: **TecArt**: 533p.
- Bridges, C. M. 2000. Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*). **Archives Environmental Contamination Toxicology**, 39: 91-96.
- Burkhart, J. G.; Helgen, J. C.; Fort, D. J.; Gallagher, K.; Bowers, D.; Propst, T. L.; Gernes, M.; Magner, J.; Shelby, M. D.; Lucier, G. 1998. Induction of mortality and malformation in *Xenopus laevis* embryos by water sources associated with field frog deformities. **Environmental Health Perspectives**, 106 (12).
- Cairns, J. Jr.; Heath, A. G.; Parker, B. C. 1975. The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. **Hydrobiologia**, 47: 135-171.
- Camargo, J. A.; Alonso, A.; Salamanca, A. 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: A review with new data for freshwater invertebrates. **Chemosphere**, 58: 1255-1267.
- Camargo, J. A.; Alonso, A. 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment **Environment International**, 32: 831-849.
- Carmouze, J. P. 1994. **O metabolismo dos ecossistemas aquáticos**. São Paulo: Edgard Blücher / Fapesp, 1: 253 p.
- CETESB. 2009. **Relatório de qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo**. Disponível em: <[HTTP://www.cetesb.sp.gov.br/publicacoes/](http://www.cetesb.sp.gov.br/publicacoes/)>. Acessado em 29/07/2010.
- Cleto Filho, S. E. N. 1998. **Efeitos da ocupação urbana sobre a macrofauna de insetos aquáticos de um igarapé da cidade de Manaus/AM**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas área de concentração Ecologia) – Instituto

Nacional de Pesquisas da Amazônica/Universidade Federal do Amazonas, Manaus: 300 p.

- De Oliveira, P. M. A. 2003. **Animais silvestres e exóticos na clínica particular**. Editora roca: 375 p.
- Dodd, C. K.; Smith, L. L. 2003. Habitat destruction and alteration: historical trends and future prospects for amphibians. In: Semlitsch, R. D. (Ed.). **Amphibian Conservation. Smithsonian Institution**. Washington: 94-112.
- Edwards, T. M.; McCoy, K. A.; Barbeau, T.; McCoy, M. W.; Thro, J. M.; Guillett-Jr, L. J. 2006. Environmental context determines nitrate toxicity in Southern toad (*Bufo terrestris*) tadpoles. **Aquatic Toxicology**, 78: 50–58.
- Elias, A. S. S.; Silva, M. S. R. 2001. Hidroquímica das águas e quantificação de metais pesados nos sedimentos das bacias hidrográficas de área urbana de Manaus, que deaguam no rio Negro. In: X Jornada de Iniciação Científica do PIBIC/INPA, 2001, Manaus. **Anais**. Manaus: INPA: 402 - 405.
- Esteves, F. A. 1998. **Fundamentos da limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2: 602p.
- Environment Canada. 2003. Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life: Nitrate Ion. Ecosystem Health: Science-based Solutions and Coordination Directorate, **Environment Canada**. 115p.
- Franco-de-Sá, J. F. O. 2009. **Efeito da poluição de um igarapé de Manaus, sobre ovos e larvas de *Osteocephalus taurinus* (Amphibia, Anura, Hylidae)**. Dissertação de Mestrado em Diversidade Biológica – Universidade Federal do Amazonas, Manaus: 46 p.
- Fonseca, O. J. M.; Salem, J. I.; Guarim, V. L. 1982. Poluição e autopurificação do Rio Negro nas cercanias de Manaus. **Acta Amazonica**, 12(2): 271-278.
- Gascon, G. 1995. Tropical larval anuran fitness in the absence of direct effects of predation and competition. **Ecology**, 76: 2222-2229.
- Gedron, A. D.; Marcogliese, D. J.; Barbeau, S.; Christin, M. S.; Brousseau, P.; Ruby, S.; Cyr, D.; Fournier, M. 2003. Exposure of Leopard frogs to a pesticide mixture affects life history characteristics of the lungworm *Rhabdias ranae*. **Oecologia**, 135(3): 469-476.
- Geomanus. 2002. Relatório Ambiental Urbano Integrado: informe GEO: Manaus/Supervisão: Ana Lúcia Nadalutti La Rovere, Samyra Crespo: Coodenação: Rui Velloso. **Consórcio Parceria**, Rio de Janeiro, 21: 188.
- Golterman, H. L.; Clymo, R. S.; Ohnstad, M. A. M. 1978. Methods for Physical and Chemical Analysis of Fresh Water. **Blackwell Scientific Publications**, IBP Handbook: 8213 p.

- Gosner, K. L. A. 1960. Simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, 16: 183-190.
- Greulich, K.; Pflugmacher, S. 2003. Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. **Aquatic Toxicology**, 65: 329-336.
- Hach, A. C.; Blaunstein, A. R. 2000. Combined effects of UV-B, nitrate and low pH reduce the survival and activity level of larval Cascades Frogs (*Rana cascadae*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 39(4): 494-499.
- Harrel, R. C. 1985. Effects of a crude oil spill on water quality and macrobenthos of a southeast Texas stream. **Hydrobiologica**, 124: 223-228.
- Hecnar, S. J. 1995. Acute and chronic toxicity of ammonium nitrate fertilizer to amphibians from southern Ontario. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 14: 2131-2137.
- Hero, J. M. 1990. An illustrated key to tapoles occurring in the Central Amazon rainforest, Manaus, Amazonas, Brasil. **Amazoniana**, 11(2): 201-262.
- Hero, J. M. 1991. **Predation, palatability and the distribution of tadpoles in the amazon rainforest**. PhD thesis. Griffith University. Brisbane: Australia: 230p.
- Hödl, W. 1990. Reproductive diversity in Amazonian lowland frogs. In: Hanke, W (Ed.). **Biology and Physiology of the Amphibians**. Stuttgart and New York: G. Fischer Verlag.: 41-60.
- Hopkins, W. A.; Congdon, J.; Ray, J. K. 2000. Incidence and impact of axial malformations in larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*) developing in sites polluted by a coal-burning power plant. **Environ. Toxicol. Chem.**, 19: 862-868.
- Howe, G. E.; Marking, L. L.; Bills, T. D.; Rach, J. J.; Mayer, F. L. 1994. Effects of water temperature and pH on toxicity of terbufos, trichlorfon, 4-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol to the amphipod *Gammarus pseudolimnaeus* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 13: 51-66.
- Howe, G. E.; Gillis, R.; Mowbray, R. C. 1998. Effects of chemical synergy and larval stage on the toxicity of atrazine and alachlor to amphibian larvae. **Environ. Toxicol. Chem.**, 17: 519-525.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Demográfico 2010**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 24 jan. 2011.
- INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 2001. **Relatório Bacias hidrográficas: Projeto Avaliação dos Recursos Hídricos da Região Metropolitana de Manaus. 1997-2000**. Manaus.

- Johansson, M.; Räsänen, K.; Merilä, J. 2001. Comparison of nitrate tolerance between different populations of the common frog, *Rana temporaria*. **Aquatic Toxicology**, 54: 1-14.
- Kelso, K. W. H.; Glass, D. M.; Smith, R. V. 1999. Toxicity of nitrite in freshwater invertebrates. In Wilson, W. S.; Ball, A. S.; Hinton, R. H. (eds). Managing risks of nitrites to human and the environment. **Royal Society of Chemistry**, Cambridge. 174-178.
- Krishnamurthy, S. V.; Meenakumari, D.; Gurushankara, H. P.; Griffiths, R. A. 2006. Effects of nitrate on feeding and resting of tadpoles of *Nyctibatrachus major* (Anura: Ranidae). **Australasian Journal of Ecotoxicology**, 11: 123-127.
- Kwok, K. W., H. Leung, K. M. Y.; Lui, G. S. G.; Chu, U. K. H.; Lam, P. K. S.; Morritt, D.; Maltby, L.; Brock, T. C. M.; Brink, P. J. V.; Warne, M. S. T.; Crane, M. 2007. Comparison of tropical and temperate freshwater animal species acute sensitivities to chemicals: Implications for deriving safe extrapolation factors. **Integrated Environmental Assessment and Management**, 3(1): 49-67.
- La Marca, E.; Lips, K. R.; Lötters, S.; Puschendorf, R.; Ibáñez, R.; Rueda-Almonacid, J. V.; Schulte, R.; Marty, C.; Castro, F.; Manzanilla-Puppo, J.; Garcia-Perez, J. E.; Toral, E.; Bolaños, F.; Chaves, G.; Pounds, J. A.; Young, B. 2005. Catastrophic population declines and extinctions. *In*: Neotropical harlequin frogs (Bufonidae:Atelopus). **Biotropica**, 37(2): 190-201.
- Larini, L. 1970. **Toxicologia**, Rio de Janeiro. Manole, 1º Ed.: 281 p.
- Lebbononi, M.; Ricchiardino, G.; Bellavita, M.; Chelazzi, G. 2006. Potential use of anurans as indicators of biological quality in upstreams of central Italy. **Amphibia-Reptilia**, 27: 73-79.
- Lefcort, H.; Hancock, K. A.; Maur, K. M.; Rostal, D. C. 1997. The effects of used motor oil, silt, and the water mold *Saprolegnia parasitica* on the growth and survival of mole salamanders (Genus *Ambystoma*). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 32: 383-388.
- Lima, A. P.; Magnusson, W. E.; Menin, M.; Erdtmann, L. K.; Rodrigues, D. J.; Keller, C.; Hödl, W. 2006. **Guia de sapos da Reserva Adolpho Ducke, Amazônia Central**. Áttema design editorial. Manaus: 168 p.
- Lima, R. G.; Cavalcante, P. R. S.; Melo, O. T.; Mello, W. Z. 2009. Concentrações de amônio na água da chuva e estimativa de emissão de amônia de rebanhos domésticos de Pinheiro e Viana, baixada maranhense. **Quim. Nova**, 32(9): 2273-2276.
- Lopes, M. J. N.; Silva, M. S. R.; Sampaio, R. T. M.; Belmont, E. L. L.; Santos-Neto, C. R. 2008. Avaliação preliminar da qualidade da água de bacias hidrográficas de Manaus utilizando o método BMWP Adaptado. **Rev. Saúde e Biol.**, 3(2): 1-9.

- Lombardi, J. V. 1999. **Toxicidade aguda de pesticidas para o camarão de água doce.** Rio Claro: UNESP. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Unesp: 101p.
- Mackereth, F. J. H.; Heron, J.; Talling, J. F. 1978. Water Analysis: Some revised methods for Limnologists. **Freshwater Biological Association.** Cumbria: 121 p.
- Mahaney, P. A. 1994. Effects of freshwater petroleum contamination on amphibian hatching and metamorphosis. **Environ. Toxicol.**, 13:259-265.
- Marco, A.; Quilchano, C.; Blaustein, A. R. 1999. Sensitivity to nitrate and nitrite in pond-breeding amphibians from the Pacific Northwest, USA. **Environ. Toxicol. Chem.**, 18:2836–2839.
- Marco, A.; Cash, D.; Belden, L. K.; Blaustein, A. R. 2001. Sensitivity to urea fertilization in three amphibian species. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 40:406–409.
- Marco, A.; Ortiz-Santaliestra, M. No prelo. Pollution: Impact of reactive nitrogen on amphibians (**Nitrogen Pollution**).
- Matthews, E. 1994. Nitrogenous fertilizers: Global distribution of consumption and associated emissions of nitrous and ammonia. **Global Biogeochemical Cycles**, 8: 411-439.
- McCauley, R. M. 1966. The biological effects of oil pollution in a river. **Limnology and Oceanography**, 11: 475-486.
- Melo, E. G. F.; Silva, M. S. R.; Miranda, S. A. F. 2005. Influência antrópica sobre águas de igarapés na cidade de Manaus - Amazonas. **Caminhos de Geografia**, 5(16): 40-47.
- Mendonça, F. P.; Magnusson, W. E.; Zuanon, J. 2005. Relationships between habitat characteristics and fish assemblages in small streams of central Amazonia. **Copeia.**, 4: 750 – 768.
- Mendonça, R. B. S.; Santana, G. P. 2006. **Avaliação dos parâmetros físico-químicos das águas do Igarapé do Quarenta (Manaus-AM).** I Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, Natal: 07 p.
- Monteiro, J. M. F. 2004. **Avaliação experimental do efeito da contaminação por óleo lubrificante sobre larvas de *Osteocephalus taurinus* (Amphibia, Hylidae).** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas área de concentração Biologia de Água Doce e Pesca Interior) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônica/Universidade Federal do Amazonas, Manaus: 45 p.
- Pahkala, M.; Laurila, A.; Merilä, J. 2001. Carry-over effects of ultraviolet-B radiation on larval fitness in *Rana temporaria*. **Proceedings of the Royal Society London**, 268: 1699 – 1706.

- Pahkala, M.; Räsänen, K.; Laurila, A.; Johanson, U.; Björn, L. O.; Merilä, J. 2002. Lethal and sublethal effects of UV-B/pH synergism on common frog embryos. **Conservation Biology**, 16(4): 1063-1073.
- Pereira, L. P. F.; Mercante, C. T. J. 2005. **A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão.** B. Inst. Pesca. São Paulo, 31(1): 81 – 88.
- Pinto, A. G. N.; Horbe, A. M. C.; Silva, M. S. R.; Miranda, S. A. F.; Pascoaloto, D.; Santos, H. M. C. 2009. Efeitos da ação antrópica sobre a hidrogeoquímica do rio Negro na orla de Manaus/AM. **Acta Amazônica**. 39(3): 627 – 638.
- Rodrigues, D. O.; Silva, S. L. R.; Silva, M. S. R. 2009. Avaliação Ecotoxicológica Preliminar das Águas das Bacias Hidrográficas dos rios Tarumã, São Raimundo e Educandos. **Acta Amazonica**., 39(4): 935 – 942.
- Rose, C. S. 2005. Integrating ecology and developmental biology to explain the timing of frog metamorphosis. **Trends in Ecology and Evolution**, 20: 129–135.
- Rouse, J. D.; Bishop, C. A.; Struger, J. 1999. Nitrogen pollution: An assessment of its threat to amphibian survival. **Environmental Health Perspectives**., 107: 799-803.
- Rowe, C.L.; Kinney, O.M.; Nagle, R.D.; Congdon, J.D. 1998. Elevated maintenance costs in an anuran (*Rana catesbeiana*) exposed to a mixture of trace elements during the embryonic and early larval periods. **Physiological Zoology**, 7(1): 27-35.
- Russo, R. C. 1985. Ammonia, nitrite and nitrate. In Fundamentals of aquatic toxicology (Rand, M. G.; Petrochelli, S. R. (eds), **Hemisphere Publishing Corporation**, Washington, 455-471.
- Santana, G. P.; Barroncas, P. S. R. 2007. Estudo de metais pesados (Co, Cu, Fe, Cr, Ni, Mn, Pb e Zn) na Bacia do Tarumã-Açu, Manaus – (AM). **Acta Amazônica**, 37(1): 111 -118.
- Santos, I. N.; Horbe, A. M. C.; Silva, M. S. R.; Miranda, S. A. F. 2006. Influência de um aterro sanitário e de efluentes domésticos nas águas superficiais do Rio Tarumã e afluentes – AM. **Acta Amazônica**, 36(2): 229 – 236.
- SBH - Sociedade Brasileira de Herpetologia. 2010. **Lista de espécies de anfíbios do Brasil**. Disponível em <[HTTP://www.sbherpetologia.org.br/](http://www.sbherpetologia.org.br/)>. Acessado em 23/03/2011.
- Schiesari, L.; Grilltsch, B.; Grilltsch, H. 2007. Biogeographic biases in ecotoxicological research and their consequences for linking amphibian declines to pollution. **Conservation Biology**, 21 (2): 465-471.
- Silva, M. S. R. 1996. **Metais pesados em sedimentos de fundo de igarapés (Manaus-Am)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará, Belém, PA: 109p.

- Sipaúba-Tavares, L. H. 1998. **Limnologia dos sistemas de cultivo**. Carcinicultura de água doce. São Paulo: FUNEP: 47-75.
- Smith, G. R.; Temple, K. G.; Vaala, D. A.; Dingfelder, H. A. 2005. Effects of Nitrate on the Tadpoles of Two Ranids (*Rana catesbeiana* and *R. clamitans*). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 49: 559–562.
- Sparling, D. W.; Bishop, C. A.; Linder, G. 2000. The current status of amphibian and reptile ecotoxicological research. In: Sparling, D.W.; Linder, G.; Bishop, C.A. (Ed.). **Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles**. Pensacola, FL: Society of Environmental Toxicology (SETAC): 1-13.
- Sprague, J. B. 1990. Methods of fish biology. In: Schrech, C. B.; Moyle, P. B. (Ed.). **Aquatic toxicology**. Maryland, USA: American Fisheries Society Bethesda: 491-528.
- Sprague, J. B. 1985. Factors that modify toxicity. In: Rand, G. M.; Petrocelli, S. R. (eds), **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Bristol (UK): Taylor & Francis. 124-163.
- Sturner, R. W.; Elser, J. J. 2002. Ecological stoichiometry: the biology of elements from molecules to the biosphere. **Princeton univ. press**, 439p.
- Tomasso, R. V.; Carmichael, G. J. 1986. Acute toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to the Guadeloupe bass, *Micropterus treculi*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 36: 866-870.
- Townsend, A. R.; Braswell, B. H.; Holland, E. A.; Penner, J. E. 1996. Spatial and temporal patterns in terrestrial carbon storage due to deposition of fossil fuel nitrogen. **Ecological Applications**, 6: 806-814.
- Vieira, M. I. 1986. **Rãs: criação prática e lucrativa**. Editora do autor. São Paulo: 380p.
- Waichman, A. V. 2008. Uma proposta de avaliação integrada de risco do uso de agrotóxicos no estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, 38(1): 45 – 50.
- Werner, E. E.; Anholt, B. R. 1993. Ecological consequences of the trade-off between growth and mortality rates mediated by foraging activity. **American Naturalist**, 142: 242-272.
- Wetzel, R. G. 2001. Limnology. Lake and river ecosystems. 3 ed. **Academic Press**, San Diego, 1006p.
- Wilbur, H. M.; Collins, J. P. 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis. **Science**, 182: 1305–1314.
- Young, B. E.; Lips, K. R.; Reaser, J. K.; Ibanez R.; Salas, A. W.; Cedeno, J. R.; Coloma, L. A.; Ron, S.; La Marca, E.; Meyer, J. R.; Munoz, A.; Bolanos, F.; Chaves, G.; Romo, D. 2001. Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. **Conservation Biology**, 15: 1213-1223.