

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

BRUNO TAYAR MARINHO DO NASCIMENTO

EFEITO DO LÁTEX DA *Euphorbia splendens* (COROA-DE-CRISTO) DE AÇÃO MOLUSCICIDA EM JOVENS RECÉM METAMORFOSEADOS DE *Rhinella schneideri* (ANURA, BUFONIDAE) EM LABORATÓRIO

**BAURU
2010**

BRUNO TAYAR MARINHO DO NASCIMENTO

**EFEITO DO LÁTEX DA *Euphorbia splendens* (COROA-DE-
CRISTO) DE AÇÃO MOLUSCICIDA EM JOVENS RECÉM
METAMORFOSEADOS DE *Rhinella schneideri* (ANURA,
BUFONIDAE) EM LABORATÓRIO**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências Biológicas da Universidade Sagrado Coração, para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas, sob orientação da Prof^a.Dr^a. Rosângela Aparecida Marques Martinez.

**BAURU
2010**

N244e

Nascimento, Bruno Tayar Marinho do

Efeitos do látex da *Euphorbia splendens* (Coroa-de-Cristo) de ação moluscicida em jovens recém metamorfoseados de *Rhinella schneideri* (Anura-Bufonidae) em laboratório / Bruno Tayar Marinho do Nascimento -- 2010.

29f.

Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Aparecida Marques Martinez.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) - Universidade Sagrado Coração - Bauru - SP.

1. Anfíbios. 2. *Rhinella schneideri*. 3. Moluscicida. 4. *Euphorbia splendens*. I. Martinez, Rosângela Aparecida Marques. II. Título.

BRUNO TAYAR MARINHO DO NASCIMENTO

**EFEITO DO LÁTEX DA *Euphorbia splendens* (COROA-DE-CRISTO)
DE AÇÃO MOLUSCICIDA EM JOVENS RECÉM
METAMORFOSEADOS DE *Rhinella schneideri* (ANURA,
BUFONIDAE) EM LABORATÓRIO**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências Biológicas da Universidade Sagrado Coração, para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas, sob orientação da Prof^a.Dr^a. Rosângela Aparecida Marques Martinez.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a Rosângela Aparecida Marques Martinez
Universidade Sagrado Coração

Prof^a.Dr^a Maricê Thereza Corrêa Domingues Heubel
Universidade Sagrado Coração

Bauru, 03 de dezembro de 2010.

Dedico este trabalho ao meu pai, minha
mãe, meu irmão, a eles devo tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai e minha mãe por sempre acreditarem no meu potencial, pela dedicação, pelo amor e carinho, pelas conversas, pelos conselhos, por me moldarem como pessoa através de sua educação, seus saberes que por vezes me parecem ser infinitos e por me guiarem até aqui.

Agradeço meu irmão Renan por sempre estar ao meu lado me ouvindo, me apresentando novas idéias, novos pontos de vista, mostrando sempre o que realmente é ser um irmão.

À minha namorada Tatiana Pimentel Chinellato por seu imenso companheirismo, por sua compreensão, sua amizade, seu apoio incondicional, por ser a “mulher maravilha”, não por ter tudo na bolsa quando preciso, mas sim por ter as palavras certas quando necessário, e claro por me ajudar com este trabalho.

À minha querida avó Neide, pelo seu grande amor por mim e por compartilhar comigo uma profunda admiração pelos seres que vivem conosco neste planeta, tendo sido uma das grandes responsáveis por ter semeado em mim este grande sentimento de carinho pelos seres vivos, sempre me mostrando e me ensinando coisas com seu saber inigualável.

À Deus pela família que tenho, por colocar pessoas por quem tenho grande carinho e respeito ao meu redor, por me mostrar o caminho certo a seguir e me trazer as respostas para as minhas muitas dúvidas ao longo da minha vida.

À Prof. Dr^a. Rosângela Aparecida Marques Martinez, por me orientar nesta pesquisa e por me ceder alguns minutos de seus dias para esclarecer-me dúvidas.

Ao Caio (Vurcão) pelo material emprestado e passado pela internet para elaboração do projeto, pelas muitas idéias e conversas sobre este e outros muitos assuntos.

Ao Hudson Moggioni Munhoz (Hud) pela imensa atenção e grande apoio neste trabalho, sem os quais esta pesquisa provavelmente não seria possível.

Ao Marcos Bernardino (Marquinhos) por me acompanhar e me ajudar na coleta dos girinos.

À Prof. Dr^a. Maricê por ceder o laboratório de ecologia da USC onde esta pesquisa foi realizada.

À Fabiane (Fabi) pelo auxílio no laboratório de ecologia.

Aos amigos que conquistei na USC ao longo destes cinco anos, por tornarem esta etapa importante da minha vida mais alegre, cheia de novas idéias, aprendizado diário e por partilharem momentos que guardarei sempre comigo na minha memória.

Agradeço novamente a Deus por colocar em minha vida cada uma dessas pessoas maravilhosas, que possuem grande potencial, conhecimento e respeito à vida.

“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da Criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante.”

(Albert Schweitzer)

RESUMO

Os anfíbios são vertebrados que tem como característica pele nua e permeável à água, o que é importante para respiração, osmorregulação e termorregulação. Em estudos recentes verificou-se que populações de anfíbios no mundo sofrem um grave declínio colocando em risco de extinção pelo menos um terço de todas as espécies conhecidas. Duas das principais causas apontadas para tal declínio são o uso de espécies introduzidas e também pesticidas, já que essas substâncias podem ser absorvidas pela pele. O *Achatina fulica* é uma espécie de caramujo introduzida no Brasil, o qual habita cidades e seus arredores sendo encontrado em áreas úmidas como matas e brejos. Diversos trabalhos mostram que o látex da *Euphorbia splendens* possui ação moluscicida e que pode vir a ser usado para controle do *A. fulica*, que é hospedeiro de diversos parasitas como *Angiostrongylus cantonensis* e *Cryptosporidium spp.* Neste estudo, foi aplicada uma solução aquosa do látex da *E. splendens* a 5% em jovens recém metamorfoseados de *Rhinella schneideri* e jovens e jovens-adultos de *Achatina fulica*. Os resultados mostraram que após 48 horas da aplicação, 26,7% dos anfíbios morreram sendo que no mesmo período a taxa de mortalidade em caramujos foi de 100%. Sendo assim, o látex da *E. splendens* mesmo tendo apresentando maior letalidade nos caramujos, o mesmo deve ser utilizado com cuidado em áreas, nas quais se encontram anfíbios, para que o moluscicida não comprometa suas populações.

Palavras-chave: Anfíbios. *Rhinella schneideri*. Moluscicida. *Euphorbia splendens*.

ABSTRACT

Amphibians are vertebrates that are characterized by bare skin and permeable to water which is important for respiration, osmoregulation and thermoregulation. In recent studies it was found that amphibian populations worldwide suffers a serious decline poses a risk of extinction at least one third of all known species. Two of main causes for this declines are introduces species as well as pesticides as these substances can be absorbed through skin. *Achatina fulica* is a species of snail introduced in Brazil here it lives and surroundings cities being found in damp areas such as forests and wetlands. Several studies show that the latex of *Euphorbia Splendens* has molluscicidal action and that may be used to control *A. fulica*, which is host to many parasites such as *Angiostrongylus cantonensis* and *Cryptosporidium spp.* In this study, we applied an aqueous latex of *E. Splendens* to 5% in young newly metamorphosed from *Rhinella schneideri* and young and young adults of *A. fulica*. Results showed that after 48 hours of application, 26,70% of the amphibians have died while in the same period the mortality rate in snails was 100%. Thus the latex of *E. Splendens* even though showing higher mortality in snails, it should be used with caution in areas where there are amphibians, so that the molluscicide does not compromises their populations.

Key-words: Amphibians, *Rhinella schneideri*, Molluscicide, *Euphorbia splendens*.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Mortalidade obtida em GE1, GE2, GE3 e GC no período após 24 horas da aplicação do látex diluído em solução aquosa a 5%:.....	19
TABELA 2- Mortalidade obtida em GE1, GE2, GE3 e GC no período após 48 horas da aplicação do látex diluído em solução aquosa a 5%:.....	20
TABELA 3- Porcentagem do total de mortalidade após 24h e 48h.....	20
TABELA 4- Indivíduos de <i>R. schneideri</i> , mortos e vivos ao término do experimento classificados por tamanho em mm.....	21
TABELA 5- Porcentagem de mortalidade total dos indivíduos de 9mm e 6mm..	22
TABELA 6- Porcentagem de mortalidade total obtida em indivíduos de <i>R. schneideri</i> por grupo experimental.....	22

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1	EFEITO DA APLICAÇÃO DA SOLUÇÃO DE LÁTEX NA MORTALIDADE DOS INDIVÍDUOS ESTUDADOS.....	19
4.2	COMPORTAMENTO DOS INDIVÍDUOS DE <i>RHINELLA SCHNEIDERI</i> ANTES, DURANTE E APÓS A APLICAÇÃO DA SOLUÇÃO DE LÁTEX.....	25
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
	REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

Os anfíbios no Brasil constituem um grupo de vertebrados com 877 espécies descritas, sendo que 849 são da ordem Anura (SBH, 2010).

A palavra “Anfíbio” é uma derivação do grego que significa “vida dupla”, que se refere ao ciclo típico de desenvolvimento no meio aquático e terrestre. Esta característica confere aos anfíbios uma dupla vulnerabilidade, ou seja, qualquer perturbação na água ou na terra pode afeta-los, o que os torna bons indicadores de saúde ambiental (FREITAS; SILVA, 2004).

Em uma recente avaliação de todo o grupo descobriu que quase um terço das espécies de anfíbios do mundo (32%) já se encontram ameaçadas de extinção e aproximadamente 25% são tão pouco conhecidas que não somos capazes de dizer se essas espécies, de fato, estão ou não ameaçadas, e, do início da crise até hoje, 35 espécies já foram extintas na natureza. (HALLIDAY, 2009; VERDADE; DIXO; CURCIO, 2010).

A pele dos anfíbios, geralmente descrita como nua, pois não possui alguns anexos da epiderme como penas, pêlos ou características da maioria das outras classes de vertebrados. Além disso, a pele dos anfíbios apresenta permeabilidade a água que é importante para a respiração, osmorregulação e de forma limitada, termorregulação. (DUELLMAN; TRUEB, 1994).

Esta permeabilidade da pele dos anuros faz deles bons indicadores ambientais, pois além desta característica permitir que agentes contaminantes se acumulem no organismo destes animais, cerca de 70% das espécies de anfíbios possui formação de ovos e fase larval aquática, o que os tornam bons indicadores de qualidade da água (SÁ, 2007).

Nas últimas décadas, herpetologistas do mundo todo têm voltado sua atenção para um fenômeno documentado mundialmente: o declínio de anfíbios, sendo vários os fatores atribuídos ao problema, entre eles o uso de pesticidas (KOPP *et al*, 2007).

A primeira publicação sobre o declínio das populações de anfíbios, data de 1980, mas, somente no início dos anos 90, este problema tem sido mais estudado, com um crescente número de publicações, fato que pode ser explicado com o aumento da velocidade com estes animais estão diminuindo e desaparecendo de seus habitats. Juntamente com estes trabalhos, seis hipóteses principais foram levantadas para explicar o declínio de anfíbios: destruição de habitat (para cultivo de lavouras ou criação de rebanhos bovinos), uso de defensivos agrícolas, aumento da radiação UV-B causada pela diminuição da camada de ozônio, mudanças climáticas, introdução de espécies exóticas e doenças. Destas seis hipóteses, a perda de habitat

e os pesticidas são apontados como os maiores causadores da diminuição das populações de anfíbios, porém ainda não se chegou a um consenso (KOPP *et al.*, 2007).

No Brasil, pouca ou nenhuma informação existe a respeito dos efeitos de pesticidas ou outros agrotóxicos e das espécies invasoras, além de outros fatores. Porém, os pesticidas vêm sendo utilizados indiscriminadamente nas lavouras em todo o país e existem registros de populações de espécies exóticas (p. ex., *Lithobates catesbeianus*) no ambiente natural, principalmente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, que podem também afetar as populações nativas (SILVANO; SEGALLA, 2005).

Nos Estados Unidos por exemplo, há registro do caramujo *Planorbella tenuis*, que hospeda o parasita trematódeo *Ribeiroia* sp. que está interferindo no desenvolvimento anormal dos membros posteriores de uma espécie de anuro (*Pseudacris regilla*) e pode provocar a mortalidade de 50% dos girinos dessa espécie (JOHNSON *et al.*, 1999 apud JUNCÁ, 2001)

Além de espécies exóticas de anfíbios introduzidas no Brasil, outras espécies animais introduzidas pelo homem podem causar algum efeito em populações de anfíbios anuros, já que há uma sobreposição de hábitos e hábitat.

Dentre as espécies introduzidas, o molusco *Achatina fulica* é considerada a segunda pior espécie introduzida disseminada pelo mundo (INVASIVE SPECIES SPECIALIST GROUP, 2004).

No Brasil o caramujo *A. fulica* se encontra disseminado por 23 estados englobando diferentes ecossistemas (TELES *et al.*, 1997; VASCONCELLOS; PILE, 2001), sendo que sua introdução no país se deu visando o cultivo e comercialização de “escargots”, a partir de meados de 1988, conforme noticiado em diversas reportagens jornalísticas (TELES *et al.*, 1997).

Segundo Munhoz (2010) o *A. Fulica* é hospedeiro do parasita *Angiostrongylus cantonensis*, que é causador de parasitose pulmonar em ratos urbanos e silvestres e angiostrongilíase meningoencefálica em humanos, mais comumente chamada de meningoencefalite ou ainda meningite eosinofílica, enquanto que *Angiostrongylus costaricensis* é responsável pela angiostrongilíase abdominal, com casos registrados nas regiões Sul, Sudeste e no Distrito Federal.

O mesmo autor cita que, em 2008, um estudo realizado em nove bairros do município de Campo dos Goytacazes, no estado do Rio de Janeiro, incluiu o *A. fulica* na cadeia epidemiológica da criptosporíase, após promover análise de fezes dos espécimes coletados,

encontrando grande variabilidade e amostras de *Cryptosporidium spp.*, patógeno intestinal de distribuição mundial, que acomete indivíduos imunossuprimidos e imunocompetentes.

O *A. fulica* compete com moluscos nativos por alimentação e sítios de repouso, podendo levá-los a extinção; sua presença é observada em áreas florestais, especialmente na borda, na margem de brejos, em áreas de preservação ambiental e em unidades de conservação (FISCHER; COLLEY, 2005).

Em Bauru, estado de São Paulo, a intensa proliferação do molusco *A. fulica* motivou a Secretaria do Meio Ambiente do município a publicar a Resolução nº 08/2007, no ano de 2007 onde estabelece as Estratégias de Implementação do Plano de Manejo do caramujo gigante africano, além de incluí-lo na lista oficial de espécies exóticas invasoras ou com potencial de invasão do município (MUNHOZ, 2010).

Desde 1930, tem sido investigadas as propriedades moluscidas de várias plantas na tentativa de desenvolver substâncias que possam ser utilizadas no combate ao caramujo africano e outras espécies de caramujo que são hospedeiros de parasitas que atingem o homem, causando doenças (MOZLEY, 1939 apud MENDES et al, 1997).

As propriedades moluscidas de diferentes espécies de Euphorbiaceae vêm sendo estudadas utilizando-se diferentes partes das plantas e processos de extração, sendo que o látex extraído da planta *Euphorbia esplendens* (Coroa-de-Cristo) se mostrou mais efetivo que outras plantas do mesmo gênero já estudadas (MENDES et al, 1997).

Estudos realizados por pesquisadores do Núcleo de Biologia e Controle de Endo e Ectoparasitas de Interesse Médico e Veterinário, do Departamento de Biologia e do Centro de Pesquisas René Rachou do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) utilizando o látex da *E. splendens* diluído em solução aquosa tem apresentado ótimos resultados no combate a moluscos aquáticos e anfíbios.

Resultados preliminares de bioensaios com o látex da *E. splendens* var. *hislopii*, liofilizado e *in natura*, em diferentes concentrações e em diferentes formas de dieta oferecida ao *A. fulica*, demonstraram sua ótima ação como moluscida no combate ao molusco terrestre. Taxas de mortalidade entre 5% e 60% foram observadas nos testes com as soluções aquosas do látex *in natura* e entre 10% e 26,6% de mortalidade quando administrado na forma liofilizada (SZABÓ; VASCONCELLOS, 2004).

Em recente trabalho realizado por Munhoz (2010), foi verificado que a concentração de 5% (5 ml/látex + 90 ml H₂O destilada) apresentou ação moluscida no período de 48 horas após aplicação da solução, aparentemente interferindo na capacidade de defesa do molusco em relação a fatores bióticos e abióticos.

No entanto a utilização em larga escala de qualquer pesticida sintético ou natural exige um estudo prévio de seus riscos para saúde humana bem como organismos não-alvo (OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTTEN, 1997).

Considerando que a maioria dos anfíbios apresenta uma fase de desenvolvimento aquática, a pele permeável e ricamente vascularizada e habitam os mesmos ambientes que podem ser ocupados por *A. Fulica*, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a bioatividade do látex da *Euphorbia esplendens* (Coroa-de-Cristo) na concentração de 5% (5ml de látex + 95 ml de água destilada) no desenvolvimento e sobrevivência de jovens de *Rhinella schneideri*, considerando que há sobreposição na ocupação de hábitat, microambientes e hábito noturno e que produtos extraídos de plantas, tem sido testados no combate a caramujos como o *A. fulica*, com este trabalho pretende-se avaliar se a ação do látex da *E. esplendens* como moluscicida, apresenta riscos às populações naturais de anfíbios anuros que podem compartilhar o mesmo ambiente que o *A. fulica*, já que uma das principais causas do declínio de anfíbios em todo mundo é decorrente de problemas como a utilização de pesticidas em larga escala.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visou verificar o efeito de látex da *Euphorbia splendens* na sobrevivência de indivíduos recém metamorfoseados de *Rhinella schneideri* considerando o uso deste como molusciscida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito do látex da *E. splendens* no comportamento e na sobrevivência dos indivíduos recém-metamorfoseados de *R. schneideri*;
- Avaliar a taxa de mortalidade dos indivíduos *R. schneideri* recém metamorfoseados juntamente com indivíduos de *Achatina fulica*, após 24 e 48 horas da aplicação;
- Verificar se o látex interfere na alimentação dos jovens de *R. schneideri*;
- Analisar a mobilidade dos animais após a aplicação do látex;

3 MATERIAL E MÉTODOS

As larvas de *Rhinella schneideri* foram coletadas no município Borebi, região de Bauru, estado de São Paulo, utilizando uma peneira de malha fina. Os girinos que se apresentavam em diversos estágios de desenvolvimento, foram transportados para o laboratório de Biologia da USC em sacos de polietileno, contendo água do local da coleta.

Os sacos contendo as larvas foram lavados externamente com água corrente e então colocados dentro dos aquários que receberam as larvas já contadas (1 saco por aquário). Cada saco ficou trinta minutos dentro d'água para igualar a temperatura, sendo que a cada 10 minutos foi colocado um copo americano contendo água dos aquários (cada saco recebeu água do aquário em que estava aclimatando) para que os girinos não sofressem choque de pH.

As larvas de *Rhinella schneideri* foram mantidas em aquários com 40X20X27 (comprimento X largura X altura) onde se manteve uma coluna d'água de 12,5cm totalizando 10 litros. Cada aquário recebeu um total de 20 larvas.

A oxigenação dos aquários foi feita através de compressores de ar com pedra porosa. O pH foi medido diariamente e mantido em pH 7.0.

Para obtenção de indivíduos jovens, os girinos foram mantidos nos aquários até completarem a metamorfose, onde receberam como alimentação ração para peixes ornamentais em flocos da marca Tetra®. Após completada a metamorfose, os jovens recém metamorfoseados foram transferidos para um terrário com substrato de terra peneirada e folhas secas onde receberam como alimento moscas-da-fruta (*Drosophila melanogaster*) em coletadas em armadilhas de garrafa pet de 2 litros.

Os animais metamorfoseados foram “estocados” neste terrário até que se tivesse o número de indivíduos necessários para a experimentação.

Foram montados um total de quatro grupos, três experimentais e um controle. O grupo experimental um (G1), grupo experimental dois (G2), grupo experimental três (G3) e grupo controle (GC).

Para a experimentação com os jovens de *Rhinella schneideri* foram selecionadas quatro caixas plásticas (polipropileno) com 350x160x490 mm, lavadas em água corrente e expostas ao sol durante trinta minutos para secagem completa e cobertas com tela mosquiteiro.

Cada caixa recebeu 10 indivíduos recém metamorfoseados de *R. schneideri* e cinco caramujos como “sentinelas” para verificação da toxicidade do látex.

O fundo de cada caixa foi coberto com uma camada de terra com cerca de 30mm de espessura. A adoção da camada de 30 mm de solo caracterizado por Cavaguti (1994) como Latossolo vermelho-escuro de textura média ou solo “glei húmico” a pouco “húmico” com acentuado horizonte gleizado e predominantemente arenoso, se deu pelo fato de que este trabalho tentou reproduzir ao máximo as condições encontradas em campo.

Os animais foram alimentados no dia da aplicação, no período da manhã, antes de ocorrer à aplicação do látex da *E. splendens*.

A coleta do látex ocorreu por volta das 19h horas (horário de verão) do dia da aplicação, nos arredores do campus da Universidade do Sagrado Coração com o auxílio de um bisturi fazendo-se um corte cerca de 10 cm abaixo do meristema apical do tronco de cada planta. Com um tubo de ensaio com tampa rosqueável o látex foi armazenado e vedado para evitar coagulação. A solução foi preparada baseando-se na utilizada por Munhoz (2010) e logo em seguida e reservada em balão volumétrico sob temperatura ambiente.

A aplicação do látex nas caixas contendo os jovens de *R. schneideri* e os caramujos “sentinelas” foi realizada às 21h horas com o auxílio de um spray borrifador com reservatório dotado de gatilho (Guarany®, modelo Multi sprayer, código 0321.04.00) contendo a solução de látex previamente preparada à 5%.

Após o preparo da solução foi então borrifado 30 ml no modo “spray”, a uma distância de 400 mm para diminuir o impacto mecânico da solução sobre os animais. A aplicação foi feita utilizando-se luvas de látex, máscara e óculos de proteção.

As medições de temperatura do ar e umidade relativa do ar foram efetuadas na hora da aplicação e durante 48 horas após a aplicação, tempo este em que foi observado o comportamento dos animais levando-se em conta a locomoção, a alimentação e sobrevivência dos indivíduos estudados.

O período do experimento teve a duração de 48 horas e a metodologia utilizada foi adaptada para os anuros de acordo com a proposta de Munhoz (2010), tendo-se em vista a perda das propriedades moluscidas após este período.

Durante as primeiras 24 horas os indivíduos jovens de *R. schneideri* e os caramujos *A. fulica* sentinelas permaneceram nas caixas, nas quais foi borrifada a solução de látex. Após este período, os animais foram colocados em três caixas semelhantes isentas da solução de látex, nas quais foi colocado alimento aos anfíbios. Estas caixas plásticas tiveram todas as características das caixas de experimentação, onde o látex foi aplicado (tipo de solo e umidade).

Durante toda experimentação, levou-se em conta o fotoperíodo de 12 horas de iluminação artificial, feita por uma lâmpada fria do tipo tubo fluorescente da marca Osram®, modelo Luz do dia de 40W.

Os animais mostraram-se estressados antes da aplicação apenas na mudança feita do aquário de estocagem para as caixas, sendo que esta mudança teve de ser feita manualmente utilizando luvas de látex. As mãos vestindo as luvas foram lavadas em água corrente antes do manuseio dos animais. O mesmo procedimento foi utilizado com os caramujos sentinelas.

Logo após a transferência e contagem dos animais para as caixas, foi dado um tempo de 20 minutos e então foi oferecido aos anfíbios moscas-da-fruta, sendo que logo após as moscas caírem no substrato os animais começaram a se alimentar das mesmas.

Minutos antes da aplicação, todos os animais foram observados para verificar se o movimento estava normal. Também foi realizada observação do comportamento durante e após a aplicação da solução de látex.

Após a aplicação da solução de látex, a temperatura e umidade relativa do ar nas caixas foram medidas e apresentaram-se em 27°C e 70% , respectivamente.

Em um período de 12 horas após a aplicação os anfíbios e caramujos foram observados levando-se em conta a locomoção e mortalidade.

Após 24 horas, os animais foram colocados em caixas isentas da solução de látex e umedecidas com água destilada e os anfíbios alimentados conforme já citado.

Conforme os animais morriam (tanto caramujos como anfíbios) os mesmos eram retirados das caixas e contados. Os anuros após a contagem tiveram seu tamanho medido utilizando um paquímetro da marca Jomarca de 150mm, Ref.NO205501. Os caramujos mortos foram descartados, os jovens de *R. Schneideri* foram contados e fixados em formol à 10%.

O mesmo procedimento de medição dos anfíbios vivos foi realizado ao final do experimento.

Durante o período de 24 horas após a troca das caixas os animais foram observados e foram efetuadas medidas de temperatura e umidade relativa do ar que apresentaram-se em 28°C e 75% respectivamente.

Após o período de 48 horas, os anfíbios vivos que restaram dos grupos experimentais GE1, GE2 e GE3 foram fixados em formol a 10%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EFEITO DA APLICAÇÃO DA SOLUÇÃO DE LÁTEX NA MORTALIDADE DOS INDIVÍDUOS ESTUDADOS

Após 24 horas da aplicação da solução de látex a 5% nos três grupos experimentais (30 indivíduos), um total de seis indivíduos de *Rhinella schneideri* (anfíbio) foram registrados mortos e nenhum caramujo *Achatina fulica* foi registrado morto como mostra a Tabela 1, porém todos os caramujos apresentavam sinais de estresse como liberação de um muco alaranjado. Neste mesmo período, nenhuma morte foi registrada no grupo controle, tanto para *R. schneideri* como para *A. fulica*.

Tabela 1 – Mortalidade obtida em GE1, GE2, GE3 e GC no período após 24 horas da aplicação do látex diluído em solução aquosa a 5%:

Espécie	Indivíduos mortos em 24h	
	GE1, GE2 e GE3	GC
<i>Rhinella schneideri</i> n=30	6	0
<i>Achatina fulica</i> N=15	0	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após 48 horas da aplicação do látex nos três grupos experimentais, mais dois indivíduos de *R. schneideri* foram registrados mortos e todos exemplares de *Achatina fulica* (caramujos) estavam mortos como mostra a Tabela 2. Neste mesmo período, nenhuma morte foi registrada no grupo controle (anfíbio e caramujo).

Tabela 2 - Mortalidade obtida em GE1, GE2, GE3 e GC no período após 48 horas da aplicação do látex diluído em solução aquosa a 5%:

Espécie	Indivíduos mortos em 48h	
	GE1, GE2 e GE3	GC
<i>Rhinella schneideri</i> n=30	2	0
<i>Achatina fulica</i> N=15	15	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

A maior taxa de mortalidade de *Rhinella schneideri* foi obtida nas primeiras 24 horas após a aplicação, representando 20% dos 30 animais (anfíbios), porém mesmo que significativamente menor, a ação do látex se mostrou contínua, e ao final do experimento o número de mortes obtidas nestes jovens recém-metamorfoseados foi de oito indivíduos, totalizando 26,7% do número de animais estudados.

Já a taxa de mortalidade dos jovens e jovens-adultos de *Achatina fulica*, foi nula nas primeiras 24 horas após aplicação do látex, porém nas últimas 24 horas de experimento, foi obtido um significativo grau de mortalidade desses animais, representando 100% dos indivíduos de *A. fulica* mortos após 48 horas da aplicação. Estes dados são ilustrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Porcentagem do total de mortalidade após 24h e 48h:

Espécie	Após 24 horas	Após 48 horas
<i>Rhinella schneideri</i>	20,00%	26,70%
<i>Achatina fulica</i>	0,00%	100,00%

Fonte: Elaborado pelo autor.

A mortalidade dos indivíduos de *Rhinella schneideri* e *Achatina fulica* do momento da aplicação (0) até o final do experimento (48h) são apresentados na figura 1.

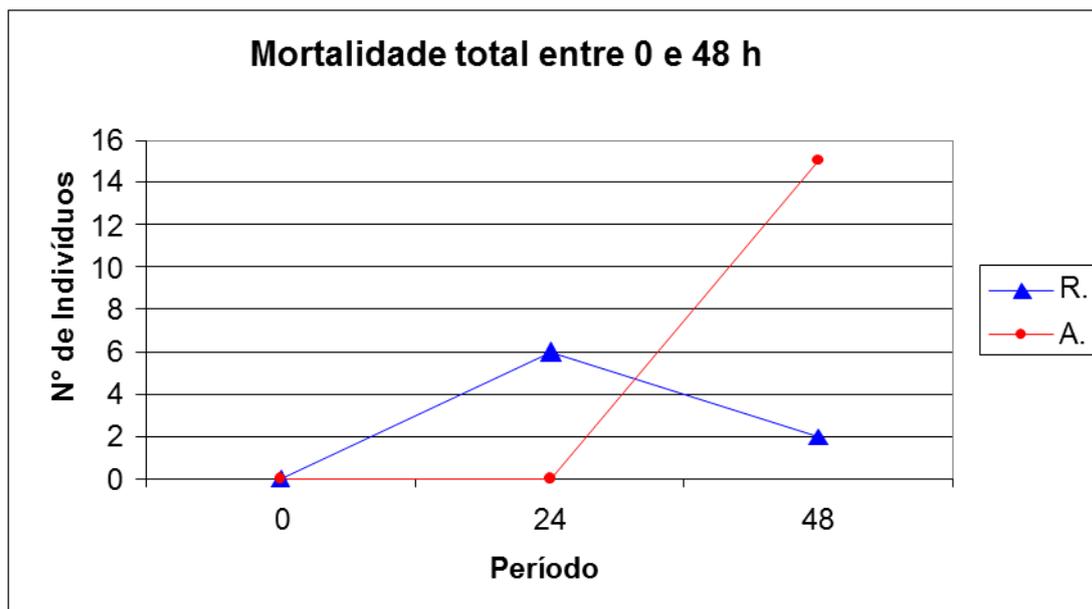


Figura 1- Mortalidade total entre 0 e 48h em *Rhinella schneideri* (R.) e *Achatina fulica* (A.)
Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao final do experimento, foi tomada a medida do tamanho de cada animal morto e vivo. Os animais foram separados em tamanhos de 9mm, 8mm, 7mm e 6mm e. A tabela 4 ilustra os resultados após esta contagem.

Tabela 4 -Indivíduos de *R. schneideri*, mortos e vivos ao término do experimento
classificados por tamanho em mm:

Tamanho	Indivíduos mortos	Indivíduos vivos
9mm	2	6
8mm	0	3
7mm	0	4
6mm	6	9

Fonte: Elaborado pelo autor

Pode-se verificar que a idade dos jovens de *R. schneideri* influenciou na taxa de mortalidade total, pois a mortalidade nos grupos experimentais foi maior em indivíduos menores, os indivíduos de 6mm. Em animais maiores com cerca de 9mm a taxa de mortalidade foi menor.

Animais com 7 mm e 8 mm não contribuíram para cálculo da taxa de mortalidade total dos anfíbios, provavelmente por estarem em número consideravelmente menor.

De acordo com a Tabela 5, entre os jovens de *R. schneideri* com 9mm o número de indivíduos mortos foi de dois animais num total de oito distribuídos nos três grupos experimentais, representando assim 25% dos animais deste tamanho. Já os jovens de *R. schneideri* com 6 mm, o número de indivíduos mortos foi de seis em um total de 15 animais distribuídos nos três grupos experimentais, representando 40% dos animais que apresentaram este tamanho.

Tabela 5- Porcentagem de mortalidade total dos indivíduos de 9mm e 6mm:

Tamanho	Taxa de mortalidade (%)
9mm	25%
6mm	40%

Fonte: Elaborado pelo autor

Sendo assim, dos 26,7% de anuros mortos durante o experimento, 75% eram mais novos medindo 6mm, enquanto que 25% deste total de *R. schneideri* mortos eram mais velhos e conseqüentemente mais desenvolvidos, medindo 9mm.

Tal resultado demonstra que a fase pós-metamorfose dos anuros é bastante frágil, pois é um período em que o animal encontra-se em meio a grandes mudanças tanto de caráter morfológico como fisiológico, mudanças essas que possibilitam o animal deixar de viver em meio aquático para habitar o meio terrestre.

Tendo-se em vista os resultados descritos acima e o fato de que os animais não foram proporcionalmente divididos de acordo com seus tamanhos nos três grupos controle, a porcentagem de mortalidade em cada caixa foi diferente, porém essa diferença em nada atrapalhou os resultados. A Tabela 6 ilustra a porcentagem de mortalidade por grupo experimental (GE).

Tabela 6 - Porcentagem de mortalidade total obtida em indivíduos de *R. schneideri* por grupo experimental e no controle:

Grupo Experimental	% de mortalidade/GE
GE1 (n=10)	10%
GE2 (n=10)	40%
GE3 (n=10)	30%
GC (n=10)	0%

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na natureza as espécies *R. schneideri* e *A. fulica* podem apresentar sobreposição a diversos fatores ecológicos como a ocupação de habitats mais úmidos (ex: brejos, proximidades de corpo d'água e outros); sobreposição espacial (ambos ocupam o solo, chão), temporal (ocorrem nos períodos mais chuvosos do ano, onde há também maior número de indivíduos e jovens recém-metamorfoseados de *R. schneideri*) e a sobreposição no período do dia (em ambos, a atividade é predominantemente noturna), mostrando a necessidade de avaliar a ação do látex moluscicida não somente nos moluscos alvo, mas também em populações de anfíbios nativas, como *R. schneideri*, já que ambas partilham diversos recursos ambientais.

Verificou-se que a solução de látex foi letal para 26,7 % dos indivíduos de *R. schneideri* quando aplicados diretamente sobre esses e de 100% sobre os indivíduos de *A. fulica* de classe de tamanho jovem e jovem-adulto. Considerando que os anfíbios anuros apresentam pele fina, úmida, permeável e vascularizada, a mortalidade poderia ter sido maior, já que a pele apresenta características tão peculiares na vida desses animais, como no processo de respiração. Porém, entre os anuros, os sapos apresentam a pele mais seca em relação a rãs e pererecas e provavelmente menos vascularizada, o que poderia diminuir a absorção do látex. Porém não podemos descartar a possibilidade da ação ser maior em outros anuros como rãs, que apresentam pele mais úmida e mais vascularizada e também partilham com esses moluscos muitos recursos ambientais.

Como esse moluscicida apresentou ação letal sobre 26,7% dos jovens de *R. schneideri*, são necessários trabalhos mais completos envolvendo um maior número de indivíduos e também com outras espécies de anuros que possam ser mais susceptíveis a ação do látex. Deste modo, poderemos reavaliar o uso dessa solução de látex da *Euphorbia splendens* (Coroa de Cristo) proposta por Munhoz (2010) como de eficaz ação moluscicida para aplicação na natureza, sem comprometer a fauna nativa de anfíbios, cujo declínio apresenta ainda causas pouco conhecidas.

Sobre a taxa de mortalidade dos caramujos, os resultados deste trabalho corroboram com os dados obtidos por Munhoz (2010), que apresenta uma média de mortalidade aferida até 48 horas maior do que a constatada até 24 horas, pois mesmo em concentrações sub-letais, a solução aquosa de látex da *E. Splendens* parece atuar nos mecanismos de proteção utilizados pela espécie, prejudicando a reidratação por contato, a formação de epifragma, a capacidade de forrageio, a capacidade de locomoção para alcançar sítios de repouso e estivação dos indivíduos jovens e jovens-adultos de *A. fulica*.

Após 48 horas todos os caramujos morreram, o que demonstra a ação moluscicida bastante eficaz para *Achatina fulica*, porém mais demorada quando comparada com a ação sobre os anuros testado

4. 2. COMPORTAMENTO DOS INDIVÍDUOS DE *RHINELLA SCHNEIDERI* ANTES, DURANTE E APÓS A APLICAÇÃO DA SOLUÇÃO DE LÁTEX

Em relação ao comportamento dos jovens de *R. Schneideri* foi observado que antes da aplicação do látex nas caixas, os animais apresentaram comportamento de forrageio no período diurno, sendo que este comportamento se intensificou no período noturno.

Logo após a transferência e contagem dos animais para as caixas, foi dado um tempo de 20 minutos e então foi oferecido aos anfíbios moscas-da-fruta, sendo que logo após as moscas caírem no substrato da caixa, os animais começaram a se alimentar das mesmas.

Durante a aplicação do látex os jovens de *Rhinella schneideri* mostraram-se estressados, saltando todo o tempo durante a aplicação, porém pode-se observar o mesmo padrão de comportamento durante o tempo em que foi borrifado água destilada sem látex no grupo controle. Essa comparação entre o grupo experimental e o grupo controle mostra que a aplicação de líquido (tanto a solução de látex como a água destilada) através da borrifação, pode causar estresse no momento da aplicação, porém não causa letalidade, já que nenhum indivíduo do grupo controle morreu.

Então se pode descartar qualquer interferência de estresse na mortalidade dos jovens de *R. schneideri*. Essa observação é interessante, pois esse período do ciclo de vida, logo após a metamorfose constitui ainda uma etapa na qual ocorrem várias mudanças para o animal, do ambiente aquático para o terrestre, a qual vem acompanhada de uma série de modificações morfológicas e fisiológicas, além do período de metamorfose (o animal pára de se alimentar, reduzindo suas reservas de energia), tornando essa etapa da vida pós-metamorfose (jovem) ainda bastante frágil.

Foi observado que após a aplicação do látex, os jovens de *R. schneideri* mantiveram um padrão de comportamento normal tanto de descanso embaixo de folhas como de forrageio. Porém, um total de seis animais se mostraram afetados pelo látex da *E. splendens*, após 12 horas da aplicação. Os mesmos passaram a se movimentar com certa dificuldade sendo que depois de cada salto eles indicavam uma perda de equilíbrio ao tocar o solo novamente como se “tropeçassem”. Estes mesmos indivíduos vieram a morrer ao final do primeiro período de 24 horas em que os animais permaneceram nas caixas de aplicação.

Após a transferência dos indivíduos das caixas de aplicação para as caixas isentas da solução de látex, foram observados mais dois indivíduos com as mesmas dificuldades de locomoção.

Deve-se atentar para o fato de que nenhum dos indivíduos observados com esta dificuldade apresentou comportamento de forrageio ou qualquer comportamento normal descrito no presente trabalho, sendo que estes animais só se movimentavam quando era realizada a abertura da tampa de tela mosquiteira das caixas para observação dos animais. Tal procedimento causou nos anfíbios um pequeno estresse, levando alguns animais a darem alguns saltos, porém, os animais que apresentavam comportamento e movimentação normal, mesmo após a abertura das tampas das caixas voltavam sua atenção para as moscas-da-fruta assim que lhes foi oferecidas após a troca das caixas, comportamento este que não foi observado nos animais que apresentavam dificuldade de se locomoverem.

Ao final do experimento, todos os jovens de *R. schneideri* estavam se movimentando normalmente e buscaram alimento quando foi oferecido.

Os caramujos sentinelas, logo após aplicação do látex, recolheram a massa cefalopodal e apresentaram total inatividade. O mesmo comportamento foi descrito por Munhoz, 2010 estudando a ação moluscicida do látex sobre o *Achatina fulica*.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O látex da *Euphorbia splendens* de ação moluscicida interferiu na sobrevivência de jovens de *Rhinella schneideri*, causando a mortalidade de 26,7% dos indivíduos, sendo descartada outras possíveis causas de mortalidade como estresse, inanição, falta de umidade ou mudanças de temperatura, já que nenhum indivíduo do grupo controle morreu sendo que o GC recebeu os mesmos cuidados e apresentou indivíduos de tamanho igual ao dos três grupos experimentais.

A ação do látex na mortalidade dos anuros estudados foi mais rápida, em relação à ação nos caramujos. Verificou-se também que a ação do látex é contínua tanto para os anfíbios como para os caramujos estudados, porém sendo mais letal para *Achatina fulica* que apresentou taxa de mortalidade de 100%, do que para *Rhinella schneideri* (26,70%).

No que se refere ao comportamento de alimentação e a mobilidade dos anfíbios, se pode afirmar que a ação do látex interferiu significativamente sobre os mesmos, já que nenhum dos animais que foram afetados pelo látex apresentou movimentação normal ou se alimentou quando foi lhes oferecido as *D. melanogaster*.

Os dados obtidos nesse estudo sugerem cuidado no uso do látex na natureza, pois o efeito em anuros foi parcialmente letal, porém rápido se comparado ao efeito nos *A. fulica*.

Sugere-se estudos mais completos envolvendo a ação do látex na fisiologia do *R. schneideri* e também estudos com outras espécies de anuros que possam ser mais susceptíveis a ação do látex, devido a características morfológicas, fisiológicas ou ecológicas, podendo seu uso ser avaliado com mais segurança, sem contribuir para o declínio de anfíbios, que é um problema global e com causas ainda pouco conhecidas.

REFERÊNCIAS

CAVAGUTI, N. **Erosões Lineares e solos urbanos: Estudos, caracterização e análise da degradação do meio físico em Bauru, SP.** 1994. 548 f. Tese de Livre Docência – Universidade do Estado de São Paulo, Faculdade de Engenharia e Tecnologia, Bauru, São Paulo, 1994.

DUELLMAN, W.E. ; TRUEB, L. **Biology of Amphibians.** Baltimore: The John Hopkins University Press, 1994. 670p.

HALLIDAY, T. Amphibians declines. 22 jan. 2009. Disponível em:
<http://amphibiaweb.org/declines/declines.html>
 Acesso em: 15 ago. 2010.

FISCHER, M. L.; COLLEY, E. Espécie invasora em reservas naturais: caracterização da população de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca-Achatinidae) na Ilha Rasa, Guaraqueçaba, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 127-144, 2005. Disponível em: <<http://biotaneotropica.org.br/v5n1/pt/abstract?article+BN03305012005>>. Acesso em: 30 out. 2010.

FREITAS, M. A; SILVA, T. F. S. **Anfíbios na Bahia: um Guia de Identificação.** Camaçari, BH: [s.n.], 2004, 60 p.

FREITAS, J. C. B. R. et al. Toxicological study of the molluscicidal latex of *Euphorbia splendens*: irritant action on skin and eye. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, suppl. 2, p. 87-88, 1991.

JOHNSON, P. T. J; LUNDE, K. B; RITCHIE, E. G; LAUNER, A. E. The Effect of Trematode Infection on Amphibian Limb Development and Survivorship. *Revista Science*, Washington DC, vol.284, p. 802-804, 30 abr. 1999. Disponível em: <http://www.colorado.edu/eeb/facultysites/pieter/documents/sciencepaper.pdf> Acesso em: 16 de nov. 2010.

JUNCA, F. A . Declínio Mundial das populações de Anfíbios. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v.1, n.1, p. 84-87, 2001.

MUNHOZ, H. M. **Estudo da ação moluscicida do látex da *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B. (coroa-de-Cristo) (Euphorbiaceae) no combate ao *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (caramujo gigante africano) (Stylommatophora : Achatinidae) teste em laboratório.** Iniciação Científica, USC, Bauru, SP, 2010.

KOPP, K.; et al. Publicações Sobre Efeitos de Pesticidas em Anfíbios no Período de 1980 a 2007. **Revista Multiciência**, Unicamp, Campinas, n. 8, p.173-186, MAI. de 2007. Disponível em: http://www.multiciencia.unicamp.br/rede_1_8.htm. Acesso em: 07 mar. 2010.

MENDES, M. N. et al. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.E.B.) latex: experimental test in a endemic area in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 5, p. 719-724, set./out. 1997.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Photodegradation of the molluscicidal latex of “crown of thorns” (*Euphorbia milii* var. *hislopii*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 5, p. 657-659, set./out. 1997.

SÁ, J.F.O.F. **Efeito da Poluição dos Igarapés Sobre Ovos e Larvas de *Osteocephalus taurinus* (AMPHIBIA, ANURA, HYLIDAE)**. 2007. 15p. Projeto (Mestrado-Diversidade Biológica) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.

SILVANO, D.L. E ; SEGALLA, M.V. Conservação de anfíbios no Brasil. **Megadiversidade**, v.1, n1, julho, p.79-86, 2005.

SBH- Sociedade Brasileira de Herpetologia. **Brazilian Amphinians – List of species**. 2009. Disponível em:

SZABÓ, R. B.; VASCONCELLOS, M. C. Estudo da biologia e avaliação da ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (coroa-de-Cristo), sobre o molusco terrestre *Achatina fulica*, hospedeiro intermediário de *Angiostrongylus cantonensis*. In: JORNADA DE VOCAÇÃO CIENTÍFICA - AVANÇADO, 9., 2004, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2004. p. 16-16.

TELES, H. M. S. et al. Registro de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) no Brasil: caramujo hospedeiro intermediário de Angiostrongilíase. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 310–312, 1997. Disponível em: <<http://www.scielosp.org/pdf/rsp/v31n3/2294.pdf>>. Acesso em: 30 out. 2010.

VASCONCELLOS, M. C.; PILE, E. Ocorrência de *Achatina fulica* no Vale do Paraíba, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n. 6, p. 582-584, 2001. Disponível em: <http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102001000600013&lng=pt&nrm=isso>. Acesso em: 01 nov. 2010.

VERDADE, V. K.; DIXO, M.; CURCIO, F. F. Os riscos de extinção de sapos, rãs e pererecas em decorrência das alterações ambientais. **Estudos avançados**, São Paulo, v. 24, n. 68, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-40142010000100014&script=sci_arttext&tlng=en. Acesso em: 16 nov. 2010.