

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO**

ALINE NOGUEIRA MAGALHÃES

**EFEITOS DO BISFENOL A SOBRE GIRINOS DE
PHYSALAEMUS CUVIERI (ANURA: LEIUPERIDAE)
EM AMBIENTES TEMPORÁRIOS E PERMANENTES**

**São Luís
2012**

ALINE NOGUEIRA MAGALHÃES

**EFEITOS DO BISFENOL A SOBRE GIRINOS DE *PHYSALAEMUS CUVIERI*
(ANURA: LEIUPERIDAE) EM AMBIENTES TEMPORÁRIOS E PERMANENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Orientador: Prof^a Dra. Natilene Mesquita Brito.

Co-orientador: Prof^a Dra. Gilda Vasconcellos de Andrade.

**São Luís
2012**

Magalhães, Aline Nogueira

Efeitos do bisfenol A sobre girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae) em ambientes temporários e permanentes./ Aline Nogueira Magalhães. – 2012.

103 f.

Impresso por computador (fotocópia)

Orientador: Natilene Mesquita Brito.

Co-orientador: Gilda Vasconcellos de Andrade.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, 2012.

1. Amphibia - Contaminação plástica 2. Efeitos de densidade 3. Efeitos do hidroperíodo. I. Título.

CDU 597.6:678.5

ALINE NOGUEIRA MAGALHÃES

**EFEITOS DO BISFENOL A SOBRE GIRINOS DE *Physalaemus cuvieri* (ANURA:
LEIUPERIDAE) EM AMBIENTES TEMPORÁRIOS E PERMANENTES**

A Comissão julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 13/04/2012, considera a candidata APROVADA.

Profa. Dra. Natilene Mesquita Brito
Orientadora

Profa. Dra. Gilda Vasconcellos de ANDRADE
Co-Orientadora

Profa. Dra Flora Acuna Juncá

Prof. Dr Nivaldo Piorsk

Aos meus pais e irmãos.

À minha filha Manuella.

A Luiz Gustavo.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo auxílio financeiro (processos CNPq/Casadinho 620163/2008 9 e CNPq/SISBIOTA 563075/2010-4), à FAPESP/SISBIOTA pelo auxílio financeiro 10/52321-7) e à FAPEMA pelo bolsista AT;
Ao Consorcio de Alumínio do Maranhão – ALUMAR pela permissão ao acesso nas áreas de coleta;

À Gilda Vasconcellos de Andrade, pelos ensinamentos e direcionamentos;

À Natilene Brito pelos ensinamentos químicos e empréstimo dos equipamentos de medição de dados de laboratório;

Aos professores participantes das defesas de projetos e dissertação, pelas sugestões ao longo do trabalho;

Ao Profº Felipe Rego pelo direcionamento nas análises estatísticas;

À Profa. Flora A. Juncá pelas valiosas sugestões ao artigo produzido nessa dissertação;

À minha grande amiga Brena Borges pelo auxílio e estímulo durante todas as fases deste trabalho;

Ao Anderson Ferreira pelas dicas de montagem e manutenção do experimento e pelo auxílio na análise das gônadas dos metamorfos;

Ao Bruno Costa pela ajuda na montagem dos experimentos.

Aos alunos do PPGBC - 2010 por tornarem esse período de muito estudo um momento muito prazeroso.

À Ana Lúcia Reis Dias, secretária do mestrado, pelo auxílio em muitos momentos e pela forma carinhosa que sempre nos recebeu na secretaria.

À minha filha Manuella por ser hoje o motivo da minha busca por mais estudos.

Ao meu esposo Luiz Gustavo por me apoiar durante todo o mestrado.

À Deus por estar presente em todas as fases a minha vida.

ÍNDICE

	p.
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	01
ABSTRACT.....	02
1. INTRODUÇÃO.....	03
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	06
2.1 Características químicas do BPA.....	06
2.2 Histórico do BPA.....	09
2.3 Risco ecológico do BPA.....	11
2.4 Concentrações de BPA detectadas no meio ambiente.....	11
2.5 Efeitos do BPA em anfíbios.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Espécie estudada.....	14
3.2 Local de coleta.....	16
3.3 Experimentos em aquários.....	17
3.4 Análises estatísticas.....	20
4. RESULTADOS	22
4.1 Temperatura e pH.....	22
4.2 Sobrevivência até a metamorfose.....	22
4.3 Tempo de desenvolvimento.....	23
4.4 Tamanho na metamorfose.....	24
4.5 Biomassa.....	24
4.6 Razão sexual.....	34
5. DISCUSSÃO	36

5.1 Temperatura e pH.....	36
5.2 Sobrevivência até a metamorfose.....	37
5.3 Tempo de desenvolvimento.....	38
5.4 Tamanho na metamorfose.....	39
5.5 Biomassa.....	40
5.6 Razão sexual.....	40
6. CONCLUSÕES.....	42
8. REFERÊNCIAS	43
ARTIGO	52
NORMAS DA REVISTA.....	87

LISTA DE FIGURAS

	p.
Figura 1. Esquema do experimento	07
Figura 2. Estrutura química do bisfenol A.....	08
Figura 3. Indivíduo de <i>Physalaemus cuvieri</i>	15
Figura 4. Desova em espuma e girinos.....	15
Figura 5. Área de coleta.....	16
Figura 6. Aquários de vidro utilizados no experimento.....	17
Figura 7. Organograma dos tratamentos.....	19
Figura 8. Valores das temperaturas médias dos tratamentos.....	25
Figura 9. Valores dos pHs médios dos tratamentos.....	25
Figura 10. Efeito dos tratamentos na sobrevivência.....	28
Figura 11. Efeito da interação dos ambientes e da densidade inicial na sobrevivência..	28
Figura 12. Sobrevivência dos indivíduos nos tratamentos ao longo do tempo.....	29
Figura 13. Efeito dos tratamentos sobre tempo até a metamorfose.....	30
Figura 14. Efeito do BPA e dos ambientes no tamanho.....	30
Figura 15. Efeito da interação do BPA e dos ambientes no tamanho.....	31
Figura 16. Efeito da interação dos ambientes e da densidade inicial no tamanho.....	32
Figura 17. Efeito da interação dos tratamentos no tamanho.....	32
Figura 18. Efeito dos tratamentos sobre a biomassa produzida.....	33
Figura 19. Efeito do BPA sobre a razão sexual.....	34
Figura 20. Efeito do BPA sobre a razão sexual nos quarenta e oito aquários.....	35

LISTA DE TABELAS

	p.
Tabela 1. Identificação química do BPA.....	06
Tabela 2. Propriedades físico-químicas do BPA.....	08
Tabela 3. Risco ecológico do BPA.....	12
Tabela 4. Concentrações de BPA em esgoto, corpos d'água e água potável.....	13
Tabela 5. ANOVA dos efeitos dos tratamentos sobre a metamorfose.....	26
Tabela 6. Resposta de <i>Physalaemus cuvieri</i> aos tratamentos.....	26
Tabela 7. MANOVA dos efeitos dos tratamentos.....	27
Tabela 8. ANOVA dos efeitos dos tratamentos sobre o tempo até a metamorfose.....	27
Tabela 9. ANOVA dos efeitos dos tratamentos sobre o tamanho.....	31
Tabela 10. ANOVA dos efeitos dos tratamentos sobre a biomassa produzida.....	33
Tabela 11. ANOVA do efeito do BPA sobre a porcentagem de fêmeas.	34

RESUMO

MAGALHÃES, A. N. **Efeitos do bisfenol A sobre girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae) em ambientes temporários e permanentes.** 2012. 103 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2012.

Os contaminantes ambientais contribuem para o declínio de populações de muitas espécies de anfíbios anuros, porém poucos estudos relatam os efeitos do bisfenol A (BPA) nesses animais. No entanto, a concentração dessa substância aumenta no ambiente juntamente com o avanço tecnológico e social causando impactos negativos nos ecossistemas e organismos aquáticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do BPA, associados a outros fatores estressantes (alta densidade e secagem do ambiente) sobre o desenvolvimento de girinos de *Physalaemus cuvieri* que se desenvolvem em corpos d'água lânticos e temporários, locais onde podem se tornar depósito ilegal de lixo nas cidades. Para isso, realizamos um experimento em aquários de vidro testando as concentrações $0,005 \mu\text{g L}^{-1}$ e $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de BPA aliadas a diferentes densidades iniciais de girinos (10 ou 100) em ambientes permanentes ou temporários. Avaliamos cinco variáveis resposta: sobrevivência até a metamorfose, tempo de desenvolvimento médio, comprimento rostro-cloacal dos jovens recém-metamorfoseados, biomassa produzida e a proporção de fêmeas metamorfoseando. A presença do BPA na água diminuiu a sobrevivência e a biomassa produzida, no entanto não interferiu no tempo de metamorfose, no tamanho dos metamorfoseados e na razão sexual dos indivíduos de *P. cuvieri*. Portanto, como em muitos locais já foram detectados níveis de BPA maiores do que as concentrações testadas neste estudo, podemos esperar que esse contaminante esteja afetando muitas populações de anfíbios, além de outras espécies animais.

Palavras-chave: Amphibia. Contaminação plástica. Efeitos de densidade. Efeitos do hidroperíodo.

ABSTRACT

MAGALHÃES, A. N. **Effects of Bisphenol A on tadpoles of *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae) in temporary and permanent environments.** 2012. 103 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2012.

The environmental contaminants contribute to the declining populations of many species of frogs, but few studies report the effects of bisphenol A (BPA) in these animals. However, the concentration of that substance in the environment increases with the technological and social advancement causing negative impacts on ecosystems and aquatic organisms. The aim of this study was to evaluate the effects of BPA, associated with other stressors (high density and environment drying) on the development of tadpoles of *Physalaemus cuvieri* that develop in lentic water bodies and temporary locations that may become illegal dumping in the cities. For this, we conducted one experiment in glass aquariums testing concentrations $0,005 \mu \text{L}^{-1}$ and $2.5 \mu \text{L}^{-1}$ of BPA combined with different initial densities of tadpoles (10 or 100) in permanent and temporary environments. We evaluated five response variables: survival until metamorphosis, mean larval period, snout-vent length of metamorphs, biomass production, and proportion of metamorphic females. The presence of BPA in the water decreased the survival and biomass production, however did not affected the larval period, body size of metamorphs and the sex ratio of individuals of *P. cuvieri*. Therefore, as in many places it have already been detected greater levels of bisphenol A than the tested concentrations used in this study, we expect that this contaminant may be affecting many amphibian populations, as many other animal species.

Key words: Amphibia. Plastic contamination. Density effects. Hydroperiod effects.

1 INTRODUÇÃO

Os poluentes emergentes são aqueles que estão sendo introduzidos rapidamente no meio ambiente sem restrições ou estudos apropriados dos possíveis danos que possam causar (FILHO *et al.* 2007). Dentre esses poluentes estão os disruptores endócrinos (*endocrine disruptores*, ED) que são agentes ou substâncias químicas presentes no meio ambiente que tendem a se acumular no solo e nos sedimentos dos rios. Os ED's mesmo em baixa concentração afetam as espécies aquáticas diminuindo a fertilidade, causando deformidades, masculinização e feminilização em muitos grupos de animais, dependendo da sensibilidade de cada espécie e do período de exposição ao contaminante (GHISSELLI ; JARDIM 2007; SANTAMARTA 2001). Exposições nos estágios iniciais de vida podem causar danos irreversíveis que podem levar muitas espécies até mesmo à extinção (GASCON *et al.* 2007).

O bisfenol A (BPA) é um desses poluentes que atua no sistema endócrino e está presente nos ecossistemas aquáticos. É matéria-prima para fabricação do plástico que quando em contato com um meio líquido pode ser liberado ao ambiente externo por lixiviação, reação esta acelerada com o aumento da temperatura (RAIMUNDO 2007; KRISHNAN *et al.* 1993). Quando o BPA encontra-se biodisponível é potencialmente negativo ao desenvolvimento dos indivíduos, pois mimetiza o hormônio estrogênio e se liga aos seus receptores, se armazenando no tecido adiposo de muitos seres vivos, podendo causar uma série de efeitos negativos em muitas espécies (SANTAMARTA 2001; FDA 2008). Dentre os principais efeitos do BPA temos redução da biomassa em algas (ALEXANDER *et al.* 1988), malformação, feminilização e aumento do número de desovas e ovos por desova em moluscos (OEHLMANN *et al.* 2006), diminuição da sobrevivência em crustáceos (JOHNSON *et al.* 2005), feminilização e malformações em anfíbios (LEVY *et al.* 2004; IWAMURO *et al.*

2003), alterações na vitelogenese e reprodução em peixes (FENSKE *et al.* 2005) e redução da espermatogenese em aves (FURUYA *et al.* 2006).

Os contaminantes ambientais contribuem para o declínio de populações de muitas espécies, porém ainda poucos estudos relatam os efeitos do BPA. No entanto, a concentração desse ED aumenta no ambiente juntamente com o avanço tecnológico e social causando impactos negativos nos ecossistemas e organismos aquáticos (SODRÉ *et al.* 2007; DUARTE 2008).

Os anfíbios anuros são um dos grupos de animais que potencialmente sofrem os impactos negativos do BPA no meio ambiente, apresentando-se como importantes bioindicadores da contaminação ambiental (BLAUSTEIN *et al.* 1995; MARCANTONIO 2005; SANCHEZ 2006). Eles são sensíveis às mudanças em seu ambiente externo por estarem em contato íntimo com muitos componentes do seu ambiente natural devido ao seu ciclo de vida duplo e a sua pele permeável (GARDNER 2001).

Em alguns ecossistemas, os anfíbios são os vertebrados mais abundantes, e assim a sua ausência pode comprometer seriamente o funcionamento da comunidade ecológica (BLAUSTEIN *et al.* 1995). No entanto, nas últimas décadas tem-se observado em diferentes regiões do mundo o declínio de algumas populações de anfíbios que pode estar relacionado, além de outros fatores, à contaminação química dos ambientes por estressores que afetam os anuros tornando-os susceptíveis a predadores, afetando relações competitivas e reduzindo o sucesso reprodutivo dos indivíduos (GASCON *et al.* 2007).

As interações bióticas e abióticas atuam sobre a distribuição e abundância das espécies influenciando direta ou indiretamente no desenvolvimento dos anfíbios (e.g. ANDRADE 1995; ROGERS; CHALCRAFT 2008). Dentre os fatores bióticos, o efeito da densidade de

indivíduos age diretamente sobre o desenvolvimento larvário dos anuros aumentando o estresse, devido à falta de espaço ou liberação de inibidores de crescimento (JOHN; FENSTER 1975; STEINWASCHER 1979) e aumenta a competição principalmente por alimento (NEWMAN 1994). O hidroperíodo da lagoa também influencia o desenvolvimento dos girinos já que leva os indivíduos a metamorfosearem rapidamente, antes que a lagoa seque por completo (ROGERS; CHALCRAFT 2008).

Portanto, fatores como a densidade de girinos, mudanças no hidroperíodo da lagoa e alterações no pH são conhecidos por influenciar negativamente a dinâmica da população e da comunidade de anfíbios, podendo influenciar na potência de um contaminante (BOONE; SEMLITSCH 2002). Assim, esses fatores naturais somados à contaminação dos ambientes aquáticos podem ser responsáveis pelo rápido declínio de várias espécies de anfíbios, ressaltando a necessidade urgente de pesquisas e a implementação imediata de estratégias para aumentar os esforços para a conservação desses animais. Em regiões, como o nordeste do Brasil, onde existem poucos dados sobre diversidade, abundância e distribuição das espécies, muitas espécies já devem ter sido extintas antes de serem descobertas, algumas já estão ameaçadas de extinção e muitas outras em breve vão desaparecer, se não forem tomadas medidas de preservação e conservação dos ambientes (HADDAD; PRADO 2005).

Diante disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do BPA sobre o desenvolvimento de girinos de *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 (Anura: Leiuperidae) em ambientes artificiais permanentes e temporários. Essa espécie se desenvolve em corpos d'água lênticos (ANDRADE 1995), que nas cidades e seus arredores podem se tornar depósito ilegal de lixo. Portanto, *P. cuvieri* pode servir de modelo para avaliarmos o efeito do bisfenol A sobre o desenvolvimento de muitas espécies de anfíbios anuros ecologicamente similares. A hipótese central desse estudo foi que o BPA afeta negativamente a sobrevivência

e o tamanho dos indivíduos na metamorfose e, portanto, a biomassa produzida, bem como prolonga o tempo para atingir a metamorfose e altera a razão sexual, aumentando o número de fêmeas, com maior efeito em pequenas poças temporárias com alta densidade devido ao aumento da temperatura somado aos efeitos de densidade (Figura 1).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características químicas do BPA

O BPA é um composto orgânico encontrados no ambiente natural, pertencente ao grupo dos ED's, que apresenta dois anéis de fenol ligados por uma ponte de metil, com dois grupos metil funcionais ligados a essa ponte (GLOUBKOVA; SPRITZER 2000; FONTENELLE *et al.* 2010; Figura 2; Tabela 1).

Tabela 1. Identificação química do BPA

Nome na Lista de Substâncias Domésticas (DSL)	Outros nomes	Fórmula química	Grupo químico	Subgrupo químico	Massa Molecular
<i>Fenol, 4,4'-(1-metiletilidene)bis-</i>	<i>Bisfenol A, BPA</i> <i>Difenilolpropano,</i>	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	Orgânico discreto	Fenol	228,29/mol

O destino e comportamento dos compostos no ambiente são influenciados por suas propriedades físico-químicas, as quais determinam seu comportamento na água, solo ou biota. O BPA é caracterizado por possuir baixa pressão de vapor à temperatura ambiente (25°C), solubilidade em água moderada e um moderado coeficiente partição água-carbono orgânico (coeficiente de log K_{oc}). Com base na estrutura química do BPA e propriedades físico-químicas (Figura 2; Tabela 2), o valor do K_{oc} pode ser sensível e variar significativamente com o pH (COUSINS *et al.* 2002). Em espécies bentônicas, como *P. cuvieri*, podemos

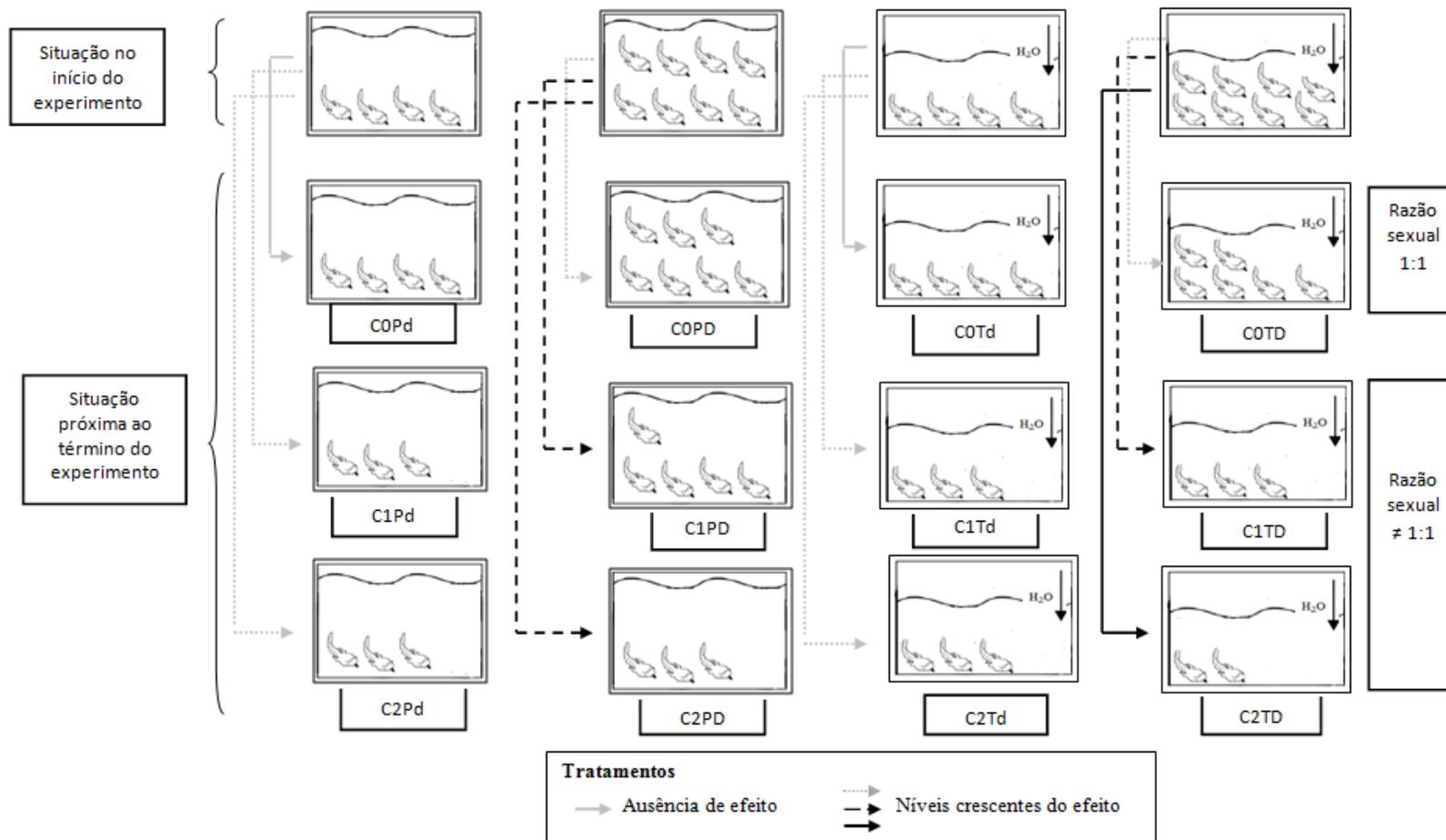


Figura 1. Esquema do experimento com *Physalaemus cuvieri* aos tratamentos concentração de BPA (C0=ausente, C1=0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$, C2=2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), ambientes permanentes (P) ou temporários (T) e densidade inicial de girinos baixa (d) ou alta (D) evidenciando a hipótese central.

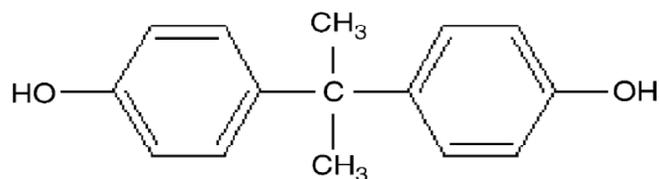


Figura 2. Estrutura química do bisfenol A.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas do BPA.

Propriedades	
Ponto de fusão (°C)	154 – 157
Densidade específica (25°C)	1,195
Pressão de vapor (Pa) (170°C)	2,6
Pressão de vapor (mmHg) (25°C)	Insignificante
Pressão de vapor (mmHg) (170°C)	0,2
Constante de Henry (atm ⁻¹ .mol L ⁻¹)	1,0 x10 ⁻¹¹
Densidade específica (25°C)	1,195
Densidade de volume (kg/m ³)	0,50 – 0,64
Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	120
Coefficiente de partição Octanol-água (Log Kow)	3,40
Coefficiente de partição carbono-água (Log Koc; kg L ⁻¹)	2,85
Coefficiente de partição carbono-ar (Log Koa)	12,7
Constante de dissociação ácida (pKa)	10,2

Fonte: Casquímica 2005; Ghisselli 2006

esperar um maior impacto negativo do BPA. Pois como essa espécie se alimenta de algas aderidas ao substrato, além da absorção do BPA contido na coluna d'água, também assimilará o contaminante através da alimentação.

A faixa de pKa elevado indica que o BPA é um ácido muito fraco, mas apesar da ionização da substância ocorrer em pH alto, não é improvável que seja sensível a ionização em níveis ambientais de pH igual a 7 ou menor (COUSINS *et al.* 2002). O pKa está relacionado com adsorção, que é um mecanismo de sorção que está relacionada com interações eletrostáticas e com a tendência da substância se dissociar no meio aquoso (RAIMUNDO 2007).

Compostos como o BPA, com baixa solubilidade e alto coeficiente de partição octanol/água (Kow), geralmente estão presentes em tecidos gordurosos da biota, pela maior afinidade dessas substâncias pela matéria orgânica, o que pode levar à bioacumulação na cadeia alimentar (COUSINS *et al.* 2002; RAIMUNDO 2007).

Dessa forma, as propriedades físico-químicas desse contaminante indicam que este pode estar presente na água, pela solubilidade aquosa, e no solo, pelo elevado coeficiente de partição octanol-água.

2.2 Histórico do BPA

A história do BPA data de 1930, tendo diferentes usos desde sua produção inicial. Primeiramente, o composto teve uso clínico como estrógeno sintético, mas a fabricação de fármacos mais eficazes fez com que o mesmo deixasse de ser utilizado para este fim (BORRELL 2010).

Por volta de 1950, o BPA foi redescoberto pela indústria química Bayer sendo empregado como matéria-prima na fabricação de policarbonato (PC), que é um termoplástico, de alto peso molecular, com uma forte estrutura em rede, boa resistência aos impactos e com propriedades térmicas muito boas, com temperatura de uso bem acima de 100°C (TALSNESS *et al.* 2009).

Esse produto químico também é utilizado como estabilizante em plásticos (por isso denominado plastificante) à base de cloreto de polivinila (PVC) e como resinas epóxi, sendo essas, hoje, suas principais aplicações comerciais (OEHLMANN *et al.* 2009).

Em 2003, os padrões de consumo do BPA nos EUA indicaram que aproximadamente 72% do BPA foi usado para a fabricação de policarbonatos, 21% foi utilizado em resinas epóxi e 6% foi utilizado em outras aplicações (NTP 2007).

O BPA está presente em uma gama de produtos incluindo equipamentos médicos, selantes dentários, embalagens de alimentos, perfumes, cosméticos (batons, maquiagens, esmaltes, etc), brinquedos plásticos, materiais de revestimento (como latas de conserva revestidas internamente com filme de polímero), computadores, carcaças de celulares, lentes de óculos, eletrodomésticos, materiais automotivos, mamadeiras, garrafas plásticas, tintas, tubulações de ar-condicionado, encanamentos de água de abastecimento, adesivos, resinas epóxi, CDs, DVDs, etc. (FDA 2008; HESS 2007; NTP 2007; ANDRADY; NEAL 2009). As resinas epóxi-fenólicos são usadas como revestimentos de latas de alimentos, bebidas, em tampas metálicas para potes de vidro e garrafas, e também como revestimentos de superfícies de tanques de armazenamento de água potável residenciais (EFSA 2006).

Em 2006, o Canadá e a Dinamarca diminuíram significativamente a fabricação do produto e em 2008, o Ministério do Meio Ambiente da cidade de Ottawa- Canadá, proibiu o uso do produto químico em mamadeiras, brinquedos e outros produtos para crianças, por declarar oficialmente a toxicidade do BPA, para seres humanos e para o meio ambiente (FDA 2008). Em resposta à crescente preocupação dos consumidores, com relação aos efeitos do BPA, alguns fabricantes e varejistas em todo o mundo começaram a limitar o uso e venda de produtos contendo esse contaminante (FDA 2008).

Hoje, muitos estudos estão sendo realizados por pesquisadores para avaliarem a segurança do BPA, para os seres humanos e outros seres vivos (BORRELL 2010).

2.3 Risco ecológico do BPA

Para a caracterização do risco ecológico do contaminante é considerado o potencial de ocorrência ambiental, persistência, bioacumulação, toxicidade, e as tendências na produção e utilização (FDA 2008; Tabela 3).

2.4 Concentrações de BPA detectadas no meio ambiente

Ghisselli (2006) realizou um estudo de detecção do BPA em água de esgoto, em corpos d'água (rios e riachos) e em água potável do Estado de São Paulo, Brasil. Esta autora também realizou um levantamento das concentrações encontradas em vários estudos com BPA em outros países. A tabela 4 apresenta os valores mínimos e máximos levantados por Ghisselli (2006).

2.5 Efeitos do BPA em anfíbios

O BPA tem demonstrado induzir uma série de efeitos adversos em anfíbios. Efeitos teratogênicos foram induzidos em girinos de *Xenopus laevis* expostos a uma concentração de BPA de $4,6 \mu\text{g L}^{-1}$ que incluem problemas no desenvolvimento, como vértebras anormais da cabeça e abdomen, bem como apoptose no sistema nervoso central (OKA *et al.* 2003). É relatado também que o plastificante afeta o desenvolvimento sexual dos anfíbios durante sua fase larval, causando inversão de sexo de girinos de *X. laevis*, induzindo a feminização quando expostos à concentrações de $22,8 \mu\text{g L}^{-1}$ de BPA, em exposições semi-estáticas (KLOAS *et al.* 1999; LEVY *et al.* 2004), no entanto, sob sistema de fluxo contínuo, em

exposição de até 500 mg L⁻¹ de BPA, não foi observado efeito nos indivíduos (PICKFORD *et al.* 2003). Em *Hyla japonica*, o BPA reduziu significativamente absorção de água basal em machos, sendo esta uma resposta estrogênica (KOHNO *et al.* 2004).

Porém, quando a exposição é iniciada em um estágio mais avançado não foi observado impactos negativos do BPA sobre a sobrevivência ou desenvolvimento *X. laevis* (IWAMURO *et al.* 2003; PICKFORD *et al.* 2003; LEVY *et al.* 2004).

Exposição de girinos de *Rana temporaria* ao BPA em combinação à radiação ultravioleta (UVB), induziu a um maior efeito sobre mortalidade dos girinos (KOPONEN; KUKKONEN 2002). O mecanismo para isso é desconhecido, mas sabe-se que não se deve ao efeito da radiação UVB sobre a acumulação ou cinética de depuração de BPA (KOPONEN *et al.* 2007).

Em estudo realizado utilizando sistema de fluxo e concentrações de BPA de 228 ng L⁻¹ e 2,28, 22,8 e 228 µg L⁻¹ em *X. laevis*, foram observados efeitos na análise histológica dos testículos, demonstrando efeitos estrogênicos mesmo em concentrações baixas (228 ng L⁻¹) de BPA. Além disso, o BPA também afetou significativamente o crescimento e o peso corporal dos machos expostos a concentrações de BPA a partir de 2,28 µg L⁻¹ (KLOAS *et al.* 1999)

O BPA também afeta o sistema de tireóide dos anfíbios. A exposição de *X. laevis* à 2,28 µg L⁻¹ de BPA mostrou inibição espontânea de TSH, alterações no hormônios T3 (tiodotironina) e induziu mudanças metamórficas em um período mais curto (IWAMURO *et al.* 2003). Resultados semelhantes, para efeitos de alterações em T3, após tratamento com 2,28 µg L⁻¹ de BPA foram observados em *Silurana tropicalis*, *Rana rugosa*, *Rana tagoi* (GOTO *et al.* 2006; OHNUMA *et al.* 2006; FINI *et al.* 2007).

Tabela 3. Risco ecológico do BPA

<i>Potencial de ocorrência ambiental</i>	A entrada no ambiente se dá através da degradação física e química de produtos plásticos finais (FDA 2008), que podem liberar o contaminante naturalmente por lixiviação, para a água e solo (YAMAMOTO <i>et al.</i> 2001). No entanto, a maior concentração fica nos sedimentos (FDA 2008), podendo se mover para baixo no perfil do solo e contaminar águas subterrâneas (LOFFREDO; SENESI 2006).
<i>Persistência</i>	A duração máxima do contaminante na água é de 2,5 a 4 dias, no solo a persistência pode chegar a 180 dias, assim como em águas subterrâneas (GHISSELLI 2006; RUDE <i>et al.</i> 2001). A persistência do BPA depende da presença ou ausência de oxigênio. Em ambiente anaeróbico a degradação é mais lenta (WEST <i>et al.</i> 2001; RUDEL <i>et al.</i> 2001) do que em ecossistemas aeróbicos (KANG; KONDO 2002; RONEN; ABELIOVICH 2000).
<i>Bioacumulação</i>	Tende a se acumular no tecido adiposo das espécies de uma cadeia alimentar, podendo causar biomagnificação (GHISSELLI 2006). Estudos na América do Norte, Europa e Japão tem documentado altos níveis do composto em várias espécies da biota aquática (FDA 2008).
<i>Toxicidade</i>	O BPA é um estrógeno não esteróide que interfere na ligação do 17 β -estradiol ao seu receptor nos tecidos-alvo (FDA 2008). Apresenta efeitos crônicos, dentre eles estão mudanças comportamentais, como natação errática, diminuição da relação presa-predador, alterações fisiológicas, crescimento retardado, alterações bioquímicas e histológicas, além da incapacidade dos organismos expostos produzirem proles viáveis (MARCANTONIO 2005).
<i>Sensibilidade dos organismos aquáticos</i>	Moluscos, crustáceos e anfíbios são muito sensíveis, com a maioria dos efeitos induzidos quando expostos a concentrações baixas na água (ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$). Em contraste, os efeitos nos peixes são geralmente induzidos por concentrações em um intervalo maior ($\mu\text{g L}^{-1}$ a mg L^{-1}), com exceção da interrupção da espermatogênese, que ocorre em pequenas concentrações do contaminante ($\mu\text{g L}^{-1}$; FDA 2008).

Tabela 4. Comparação entre as concentrações mínimas e máximas obtidas em estudos com BPA, em esgoto bruto e tratado, corpos d'água e água potável em quatro diferentes países (Ghisselli 2006).

País	Esgoto bruto ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Esgoto tratado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Água bruta ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Água potável ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Brasil	8,7	8,0	2,2 - 64,2	2,0 - 3,6
Estados Unidos	0,094 – 0,15	<0,0001 – 0,310	<0,0001 – 12	<0,0001
Espanha	<0,05 – 1,51	<0,05 – 0,27	<0,05 – 0,029	0,005
Alemanha		0,01 – 0,70	0,0047 – 0,410	0,002

Diante dos impactos negativos causados à várias espécies de anfíbios anuros, o presente estudo visa avaliar os efeitos do BPA sobre o desenvolvimento de girinos de *P. cuvieri*, analisando a sobrevivência dos indivíduos que atingiram a metamorfose, o tempo de desenvolvimento, o tamanho, a biomassa produzida e a razão sexual quando em contato com o BPA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Espécie estudada

O estudo avaliou os efeitos do BPA em girinos da espécie de anfíbio anuro *Physalaemus cuvieri*. É uma espécie generalista com ampla distribuição no Brasil, do nordeste ao sul do país, sendo encontrada, facilmente, próxima às habitações humanas (IUCN 2010; ANDRADE 1995; Figura 3). É uma espécie que se reproduz no período chuvoso e utiliza ambientes temporários para desovar (ANDRADE 1995), incluindo áreas abertas urbanas. A desova é feita em ninhos de espuma depositados na superfície da água, próximo à

margem do corpo d'água (Figura 4-A). São depositados cerca de 400 ovos por desova, e em cerca de 72 h eclodem girinos raspadores (Figura 4-B), cujo desenvolvimento larvário ocorre em cerca de 45 dias (ANDRADE 1995).

O estágio do desenvolvimento da prole em que a exposição acontece é importante, pois em espécies aquáticas a fase embrio-larval é crítica e os danos causados nessa etapa são permanentes (MANAHAN 2003). Diante disso o presente trabalho está sendo realizado a partir dos estágios iniciais do desenvolvimento de girinos de *P. cuvieri*, até a metamorfose.



Figura 3. Indivíduo da espécie *Physalaemus cuvieri*. Fonte: IUCN <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=57250>



(A)



(B)

Figura 4. Desova em espuma (A) e girinos (B) de *Physalaemus cuvieri*.

3.2 Local de coleta

As coletas de 13 desovas de *P. cuvieri* ocorreram em poças temporárias na estação chuvosa de 2011, no sudoeste da ilha do Maranhão (2°40''S; 44°15''O; Figura 5), localizadas a cerca de 40 km do centro do município de São Luís, Maranhão, Brasil. Após a coleta, acomodamos as desovas em potes de vidro contendo a água da poça para transportar ao Laboratório de Herpetologia e Ecologia Aplicada à Conservação da Universidade Federal do Maranhão.

Após o início do experimento, soltamos os girinos não utilizados no mesmo local da coleta.

Apesar da ausência de contato dos ovos de *P. cuvieri* com a água, as desovas foram coletadas em poças d'água temporárias que não apresentavam indícios de contaminação (áreas controle, sem contato com esgoto, lixo ou agrotóxicos) para evitar que as respostas dos experimentos fossem influenciadas por outros fatores.

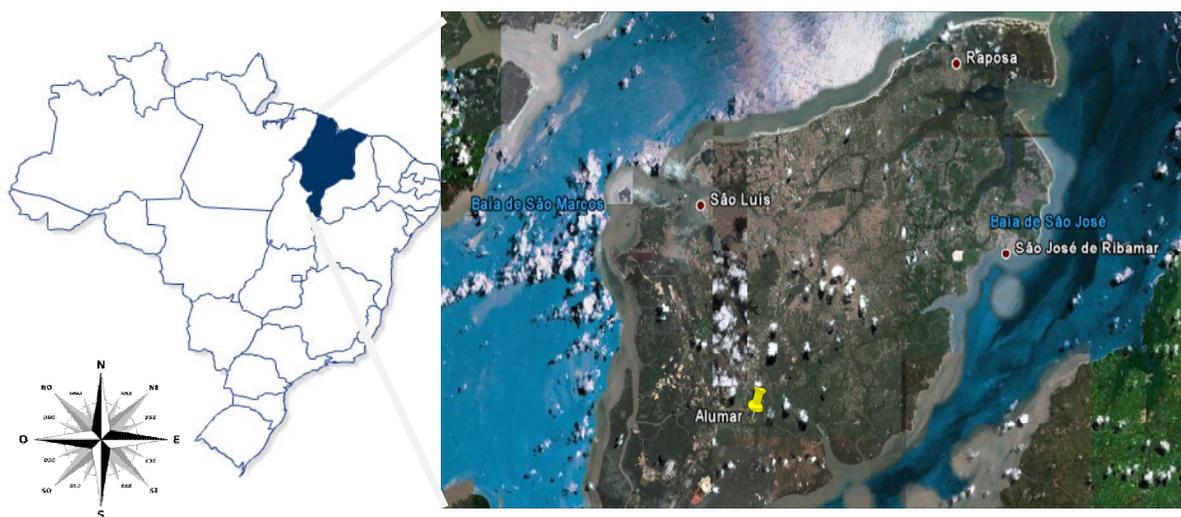


Figura 5. Área de coleta de desovas de *Physalaemus cuvieri* no sudoeste da ilha do Maranhão, município de, São Luís - MA.

3.3 Experimentos em aquários

As desovas coletadas permaneceram em aquários no laboratório até a eclosão. Durante todo experimento evitamos o contato da água com qualquer tipo de recipiente plástico, evitando dessa forma que nos aquários controle houvesse presença do BPA advindo da lixiviação do contaminante presente nesses produtos, assim como alteração das concentrações testadas nos aquários com BPA.

Após dois dias, quando as larvas atingiram o estágio 25 (GOSNER 1960), montamos o experimento em aquários de vidro alocados em uma varanda coberta, com iluminação natural e temperatura ambiente (Figura 6).



Figura 6. Aquários de vidro utilizados no experimento com bisfenol A e girinos de *Physalaemus cuvieri*.

Visando comparações com os resultados de Ferreira (2011), que testou os efeitos do hormônio 17α -etinilestradiol no desenvolvimento de girinos de *P. cuvieri*, utilizamos as mesmas concentrações para o BPA que as utilizadas para o hormônio: $0,005 \mu\text{g L}^{-1}$ (C1), $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (C2) e o controle, ausente (C0).

Utilizamos água de abastecimento urbano, decantada por três dias para eliminação do cloro, em baldes de alumínio. A cada troca de água, medimos o pH e temperatura da água decantada, repusemos as devidas concentrações em cada aquário de vidro e fizemos a permuta aleatória dos mesmos, através de sorteios, para reduzir ou excluir a influência das variações existentes no local do experimento, como temperatura e luminosidade.

Diariamente, avaliamos a mortalidade, retirando os indivíduos mortos dos recipientes e medimos a umidade do ar e a temperatura ambiente ($^{\circ}\text{C}$), máxima e mínima, com termômetro digital.

Realizamos um experimento fatorial $3 \times 2 \times 2$, onde avaliamos o efeito do fator BPA em concentrações alta (C2), baixa (C1) ou ausente (C0), e dos fatores densidade (dez girinos para densidade inicial baixa (d) e 100 para densidade inicial alta (D) e hidropériodo permanente (P) e temporário (T; Figura 7). Utilizamos quatro réplicas de cada tratamento, dezesseis aquários para cada concentração de BPA, totalizando 48 aquários ($6 \times 20 \times 12 \text{ cm}$). Selecionamos 2640 girinos de tamanhos semelhantes, excluindo os indivíduos muito pequenos. Cada tratamento e repetição recebeu o mesmo número de girinos das diferentes desovas, para garantir uma maior variabilidade genética.

Mantivemos a aeração dos aquários durante 12 horas por dia (das 19:00 às 7:00h) para que nos aquários com grande densidade não houvesse competição por oxigênio. A troca de

água foi feita a cada cinco dias para reposição da concentração do contaminante e retirada de fezes e de restos de alimento.

Para o hidroperíodo permanente, mantivemos os aquários com o mesmo nível de água do início do experimento (2,5 l) e para o temporário retiramos gradativamente a água, de acordo com Andrade (1995). A partir do 15º dia, a cada troca de água, reduzimos o volume de água para 66%, 50%, 33% e 16%. Este último nível permaneceu até o fim do experimento, pois um grande número de girinos ainda não havia metamorfoseado.

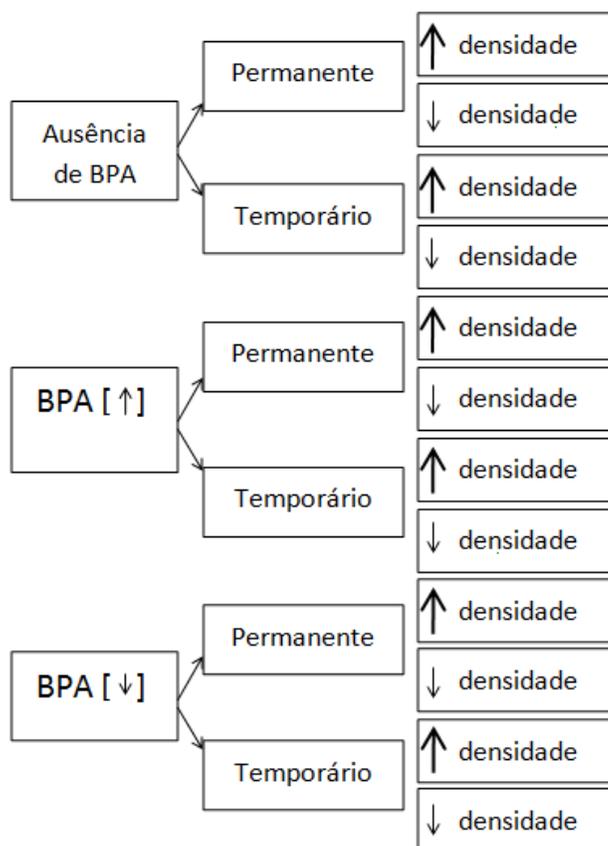


Figura 7. Organograma dos tratamentos realizados com BPA (C_0 =ausente, $C_1=0,005 \mu\text{g L}^{-1}$, $C_2=2,5 \mu\text{g L}^{-1}$), ambientes permanentes ou temporários e densidade inicial de girinos baixa ou alta de girinos de *Physalaemus cuvieri*.

Utilizamos diariamente ração em flocos para peixes herbívoros (marca Alcon Vegetal), inicialmente na proporção de 0,1 g /10 indivíduos, proporcionalmente aumentada com o crescimento dos girinos. À medida que foram crescendo, adicionávamos ração duas vezes ao dia para sobrar alimento nos aquários, evitando a competição pelo mesmo.

Antes de iniciarmos o experimento pesamos 100 girinos com 2 dias de eclosão, selecionados com o mesmo critério dos introduzidos nos aquários, em balança analítica com precisão de 0,0001 g, para obtenção da massa média inicial de cada girino. Para o cálculo da razão da biomassa produzida em cada tratamento utilizamos a soma da massa dos indivíduos recém-metamorfoseados (*in vivo*), m_f , dividida pela soma da massa média inicial dos girinos introduzidos, m_i : $B = \sum m_f / \sum m_i$.

À medida que os indivíduos começaram a metamorfosear (estágio 42, Gosner 1960), os retiramos dos aquários, pesamos, medimos o comprimento rostro-anal (CRA) com paquímetro digital (0,01 mm precisão) e fixamos em álcool a 70%. Também fixamos em álcool 70% os girinos que não metamorfosearam até o fim do experimento.

Não foi possível fazer a diferenciação sexual por caracteres secundários, por isso todos os indivíduos metamorfoseados foram dissecados para determinação do sexo. Para visualização das gônadas, abrimos a região ventral e analisamos as estruturas masculinas e femininas com auxílio de microscópio estereoscópico.

3.4 Análises Estatísticas

As médias de temperatura e pH da água dos aquários simulando ambientes permanentes e temporários foram comparadas através do teste U de Mann-Whitney.

Avaliamos cinco variáveis-resposta: 1 - sobrevivência dos indivíduos de *P. cuvieri* até a metamorfose, em porcentagem para não sofrer influência das densidades iniciais; 2 - tempo de desenvolvimento médio (em dias); 3 - tamanho dos jovens recém-metamorfoseados (Comprimento rostro-cloacal - CRC), em mm; 4 - razão da biomassa produzida e 5 - proporção de fêmeas metamorfoseando.

Para checar a distribuição normal dos dados realizamos o teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias com o teste de Levene. Transformamos os dados de sobrevivência (%) e porcentagem de fêmeas em arco-seno da raiz quadrada, de tempo até a metamorfose e CRC em logaritmo natural e de razão de biomassa em raiz quadrada, visando normalizar a distribuição e homogeneizar as variâncias dos resíduos (SOKAL; ROHLF 1995). Os dados de CRC e proporção de fêmeas não normalizaram, por isso optamos por preencher os dados ausentes de repetições onde não ocorreram sobreviventes utilizando a média do tratamento, que é um procedimento conservativo com a vantagem de manter o desenho original balanceado (TABACHNICH; FIDELL 1989).

Analisamos os efeitos dos tratamentos (BPA, hidroperíodo e densidade inicial) e suas interações sobre as variáveis-resposta através de análise de variância de três fatores (ANOVA) ($P < 0.05$). Para análise da feminilização realizamos uma análise de variância unifatorial (BPA), uma vez que não havia razão para considerar que a densidade ou o hidroperíodo alterariam a proporção de fêmeas metamorfoseando, o que foi confirmado através de uma anova fatorial prévia comparando apenas os tratamentos sem BPA.

Para as variáveis-resposta sobrevivência até a metamorfose, tempo médio de desenvolvimento e CRC na metamorfose realizamos uma análise de variância multivariada (MANOVA) ($P < 0.05$), para obter um teste ajustado para o erro do tipo I devido às múltiplas ANOVAs. Utilizamos para análises estatísticas o programa SYSTAT versão 12.0.

4. RESULTADOS

4.1 Temperatura e pH

A temperatura ambiente média foi $28,7 \pm 2^\circ\text{C}$, com mínima de 26 e máxima de 32°C . A umidade do ar média foi 80%, com mínima de 56% e máxima de 90%. A temperatura média da água decantada para troca da água dos aquários foi $27,5 \pm 0,7^\circ\text{C}$ e o pH $4,9 \pm 0,1$.

A água dos aquários apresentou valor médio de temperatura $26,2 \pm 0,02^\circ\text{C}$ e de pH $4,9 \pm 0,02$. A média da temperatura em $^\circ\text{C}$ da água foi significativamente maior ($U=199$, $p=0,022$, $N=24$) nos ambientes temporários ($26,239 \pm 0,0018$; mínimo= $26,220$; máximo= $26,290$) do que nos permanentes ($26,227 \pm 0,010$; mínimo= $26,2$; máximo= $26,2$; Figura 8). Mas essa diferença foi em uma escala de temperatura muito pequena, menor do que $0,5^\circ\text{C}$. O pH não diferiu significativamente ($U=290$, $p=0,958$, $N=24$) entre os ambientes permanentes ($4,931 \pm 0,015$; mínimo= $4,890$; máximo= $4,940$) e temporários ($4,927 \pm 0,025$; mínimo= $4,850$; máximo= $4,940$; Figura 9).

4.2 Sobrevivência até a metamorfose

Obtivemos 160 sobreviventes (6%), destes 111 (4,2%) atingiram a metamorfose e 49 indivíduos se mantiveram na fase larval até o término do experimento. Os girinos que sobreviveram se mantiveram no estágio 39 (Gosner 1960) até o fim do experimento, com o maior número de larvas remanescentes, 23, na maior concentração (C2), seguida de 19 girinos na concentração baixa e 7 no controle.

Em seis réplicas não obtivemos sobreviventes, três do tratamento C1 ($0,005 \mu\text{g L}^{-1}$)/permanente/densidade alta (C1PD), duas do C1/temporário/densidade alta (C1TD), e uma da concentração C2 ($2,5 \mu\text{g L}^{-1}$)/permanente/densidade alta (C2PD).

A presença de BPA na água, a densidade inicial dos girinos e o ambiente temporário ou permanente influenciaram significativamente na sobrevivência até a metamorfose dos girinos de *P. cuvieri*, havendo interação entre densidade e ambiente (Tabela 5). A maior sobrevivência ocorreu na ausência de BPA (Tukey, C0xC1: $p=0,001$; C0xC2: $p=0,002$), na baixa densidade e no ambiente temporário (Figura 10). O efeito foi maior nos ambientes temporários de alta densidade (Figura 11). A sobrevivência máxima dos indivíduos ocorreu até o décimo dia de experimento, quando a maioria dos girinos ainda estava no estágio 25 e 26, a partir desse marco a mortalidade aumentou nos três tratamentos (C0, C1 e C2), apresentando-se maior no tratamento C1PD e C1TD (Figura 12, Tabela 6).

A análise multivariada mostrou que os fatores isolados e suas interações causaram efeito significativo sobre a sobrevivência até a metamorfose, tamanho na metamorfose e a biomassa produzida, exceto a interação do contaminante com a densidade inicial de indivíduos (Tabela 7).

4.3 Tempo de desenvolvimento

O experimento ocorreu durante 81 dias, período em que a maioria dos girinos havia alcançado a metamorfose. O tempo mínimo de desenvolvimento individual ocorreu no controle, 19 dias, e o máximo de 80 dias, no C2.

A média geral de tempo de desenvolvimento dos indivíduos durante todo o experimento foi 33 dias. Os girinos que se desenvolveram em ambientes sem BPA (C0) apresentaram menor variação e médias mais baixas de período larvário, exceto em relação aos tratamentos C1 e C2 em ambientes permanentes com densidade baixa (Tabela 6; Figura 13). As diferenças entre os tratamentos não foram significativas (Tabela 8).

4.4 Tamanho na metamorfose

Os indivíduos de *P. cuvieri* que chegaram à metamorfose obtiveram a média geral de 8,19 mm de CRC, sendo que o menor tamanho individual na metamorfose foi 6,28 mm em C1PD, e o maior foi 9,64 mm em C0Pd.

A média no tratamento C1PD foi menor do que a dos outros tratamentos (Tabela 6), mas foi baseada em apenas um girino que metamorfoseou. Este resultado influenciou o resultado da análise, que mostrou a redução do tamanho dos metamorfos em C1 e dos indivíduos dos ambientes permanentes (Figura 14) e da interação entre esses fatores (Figura 15). A média dos indivíduos do tratamento ambientes permanentes x densidade alta também foi menor (Figura 16) e a interação entre os fatores (BPA x ambientes x densidade; Figura 17) foi altamente significativa (Tabela 9). No entanto as comparações a posteriori, apenas as que envolveram o tratamento C1PD foram significativas (Tukey, $p \leq 0,003$).

4.5 Biomassa

O peso inicial médio individual dos girinos de *P. cuvieri* foi 0,0044 mg (N=100; $s = 0,001$).

A biomassa produzida variou entre os tratamentos (Tabela 6). Os fatores tiveram efeitos significativos, mas não apresentaram interação significativa (Tabela 10). O BPA diminuiu a biomassa produzida (Figura 18; Tukey, C0xC1: $p=0,000$, C0xC2: $p=0,001$), não diferindo em efeito entre as concentrações (Figura 18; Tukey, C1xC2: $p=0,522$). A biomassa produzida foi maior nos ambientes temporários e nas baixas densidades (Figura 18).

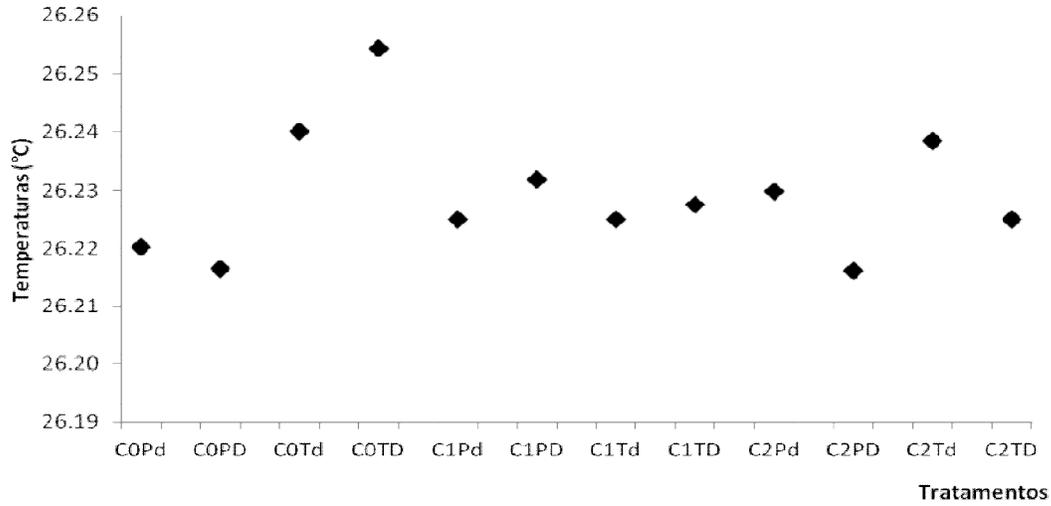


Figura 8. Valores das temperaturas médias dos tratamentos de BPA (C0=ausente, C1=0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$, C2=2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), ambientes permanentes (P) ou temporários (T) e densidade inicial de girinos baixa (d) ou alta (D).

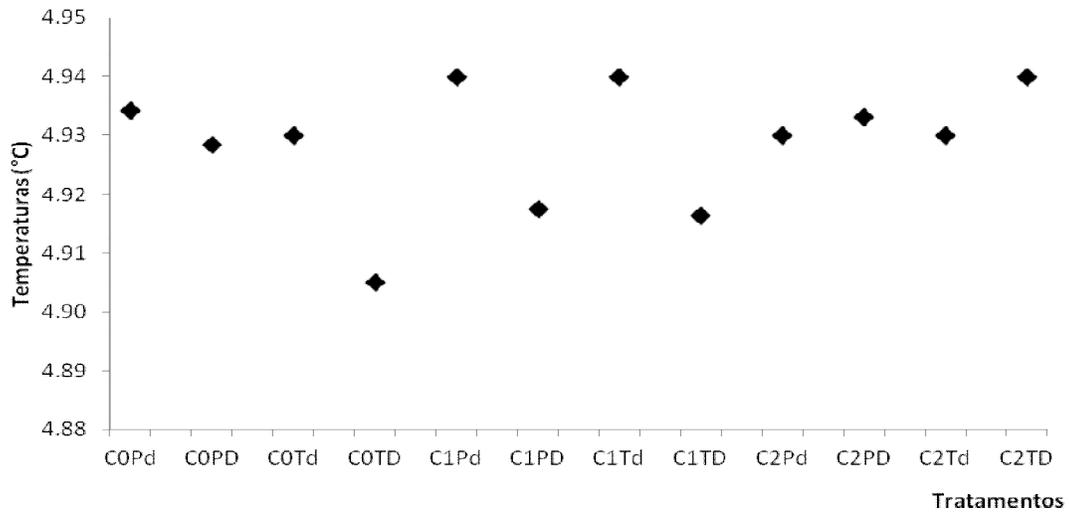


Figura 9. Valores dos pHs médios dos tratamentos de BPA (C0=ausente, C1=0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$, C2=2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), ambientes permanentes (P) ou temporários (T) e densidade inicial de girinos baixa (d) ou alta (D).

Tabela 5. ANOVA dos efeitos de BPA (ausente, 0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$ ou 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), densidade inicial alta ou baixa e ambientes permanentes ou temporários sobre a porcentagem de girinos de *Physalaemus cuvieri* que alcançaram a metamorfose (transformada em arco seno V% metamorfos).

Fatores	SQ	gl	QM	F	p
BPA	0.240	2	0.120	10.029	<0,0001
Ambientes	0.156	1	0.156	13.038	0,001
Densidade	2.984	1	2.984	249.615	<0,0001
Ambientes*BPA	0.010	2	0.005	0.432	0,652
Densidade*BPA	0.071	2	0.036	2.988	0,063
Densidade*Ambientes	0.057	1	0.057	4.734	0,036
Densidade*Ambientes*BPA	0.003	2	0.001	0.119	0,888
Erro	0.430	36	0.012	10.029	

Tabela 6. Resposta de *Physalaemus cuvieri* aos tratamentos concentração de BPA (C0=ausente, C1=0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$, C2=2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), ambientes permanentes (P) ou temporários (T) e densidade inicial de girinos baixa (d) ou alta (D). Os dados de cada tratamento são as médias seguidas do desvio padrão.

Tratamentos	N	Porcentagem metamorfos	Porcentagem de girinos remanescentes	Tempo até metamorfose (d)	CRC na metamorfose (mm)	Razão de Biomassa Produzida
C0Pd	4	41 ± 5	2,5 ± 5	30,5 ± 3,5	8,0 ± 0,9	5,5 ± 2,3
C0PD	4	1,7 ± 0,5	0,2 ± 0,5	34,0 ± 4,6	8,2 ± 0,2	0,2 ± 0,1
C0Td	4	35 ± 30	5 ± 8,3	32,1 ± 7,0	8,5 ± 0,4	8,9 ± 2,8
C0TD	4	2,2 ± 1,4	0,4 ± 0,9	33,4 ± 9,9	8,3 ± 0,5	0,4 ± 0,2
C1Pd	4	20 ± 14	10 ± 8,1	29,2 ± 4,1	8,1 ± 0,8	2,9 ± 2,1
C1PD	4	0,3 ± 0,5	0,8 ± 0,9	41,0 ± 0	6,2 ± 0	7,1 ± 1,1
C1Td	4	35 ± 12	20 ± 11	37,5 ± 5,3	7,6 ± 0,2	4,1 ± 1,6
C1TD	4	0,3 ± 0,5	1 ± 2	35,0 ± 0	8,8 ± 0	0,03 ± 0
C2Pd	4	15 ± 5	5 ± 5	28,7 ± 6,9	8,5 ± 0,6	2,3 ± 0,6
C2PD	4	0,5 ± 0,5	0,5 ± 1	37,5 ± 12,0	8,5 ± 0,1	0,07 ± 0,08
C2Td	4	32 ± 9	12 ± 9	38,3 ± 7,4	8,1 ± 0,2	4,4 ± 1,5
C2TD	4	3 ± 2	3 ± 1	37,2 ± 11,3	8,5 ± 0,4	0,5 ± 0,4

Tabela 7. MANOVA dos efeitos dos fatores BPA (ausente, C1=0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$ e C2 =2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), tipo de ambiente (temporário e permanente) e densidade inicial (alta e baixa) sobre a sobrevivência até a metamorfose ($\arcsen V\%$), razão de biomassa produzida (V) e comprimento rostro-cloacal na metamorfose (ln) dos girinos de *Physalaemus cuvieri* em aquários.

Efeito	Wilks'λ	F	gl	p
BPA	0,399	6.605	6, 68	<0,001
Ambiente	0.585	8.052	3, 34	<0,001
Densidade	0.117	85.367	3, 34	<0,001
BPA*Ambiente	0.677	2.445	6, 68	0,034
BPA*Densidade	0.777	1.524	6, 68	0,184
Ambiente*Densidade	0.651	6.071	3, 34	0,002
BPA* Ambiente*Densidade	0.506	4.598	6, 68	0,001

Tabela 8. ANOVA dos efeitos de BPA (ausente, 0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$ ou 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), densidade inicial alta ou baixa e ambientes permanentes ou temporários sobre o tempo médio até a metamorfose de girinos de *Physalaemus cuvieri* (transformado em logaritmo natural do tempo até a metamorfose).

Fatores	SQ	gl	QM	F	p
BPA	0.058	2	0.029	0.607	0,552
Ambientes	0.028	1	0.028	0.591	0,449
Densidade	0.081	1	0.081	1.718	0,201
Ambientes*BPA	0.035	2	0.017	0.367	0,696
Densidade*BPA	0.007	2	0.004	0.076	0,927
Densidade*Ambientes	0.133	1	0.133	2.798	0,106
Densidade*Ambientes*BPA	0.041	2	0.021	0.435	0,652
Erro	1.280	27	0.047		

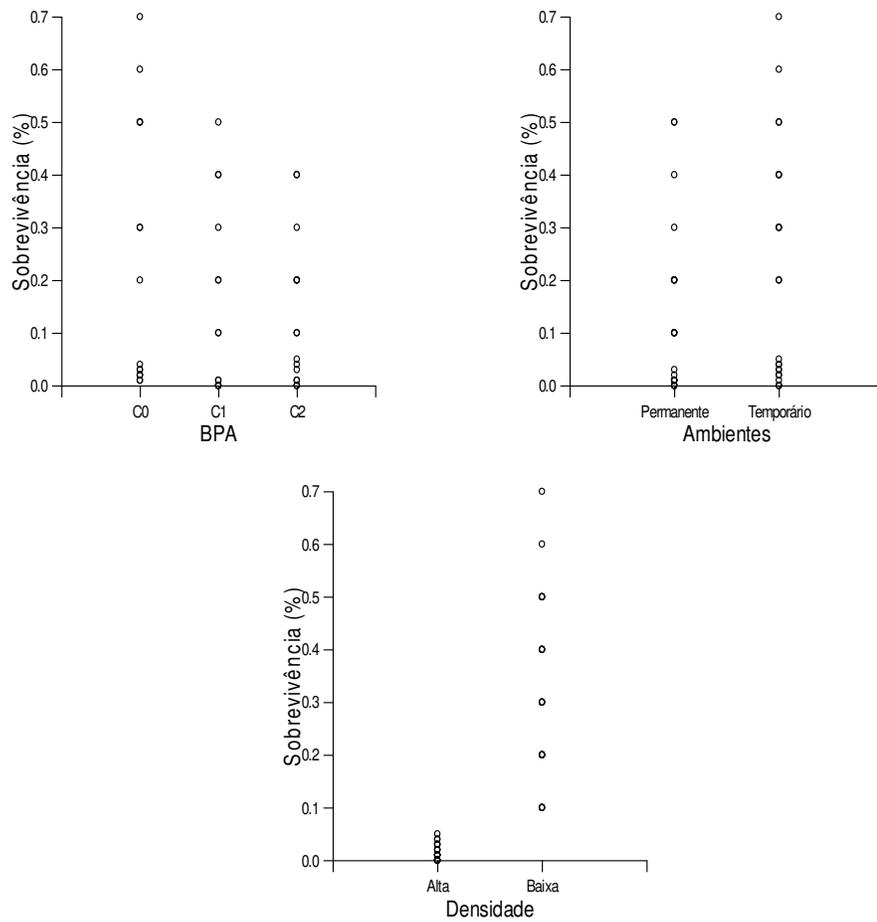


Figura 10. Efeito das concentrações de BPA, dos ambientes permanentes ou temporários e da densidade inicial de girinos de *Physalaemus cuvieri* na sobrevivência até a metamorfose (%). C0 ($0 \mu\text{g L}^{-1}$), C1 ($0,005 \mu\text{g L}^{-1}$) e C2 ($2,5 \mu\text{g L}^{-1}$).

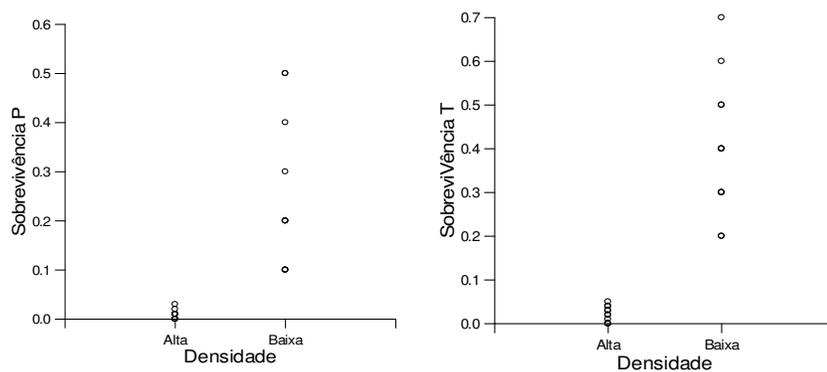


Figura 11. Efeito da interação dos ambientes permanentes (P) ou temporários (T) e da densidade inicial de girinos de *Physalaemus cuvieri* na sobrevivência (%) até a metamorfose.

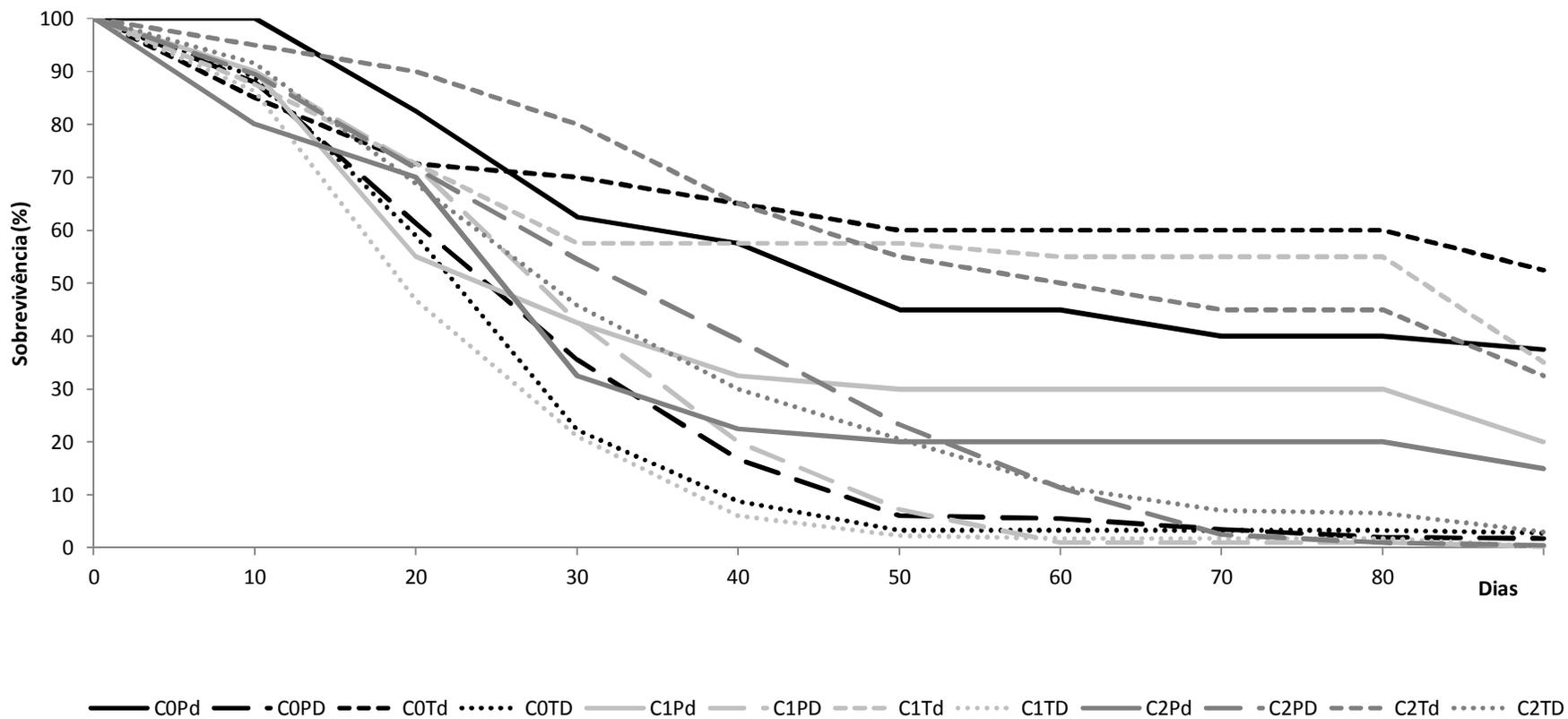


Figura 12. Sobrevivência dos indivíduos de *Physalaemus cuvieri* nos tratamentos com BPA ao longo do tempo (dias). (C0=ausente, C1=0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$, C2=2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), ambientes permanentes (P) ou temporários (T) e densidade inicial de girinos baixa (d) ou alta (D).

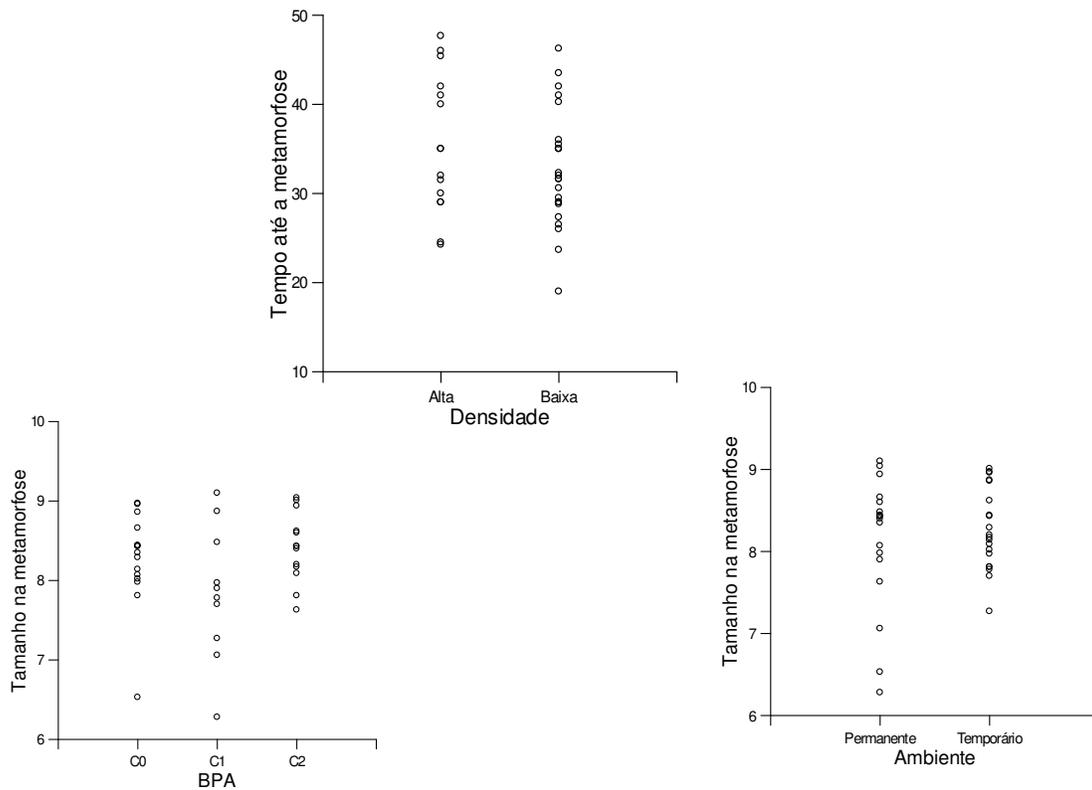


Figura 13. Efeito das concentrações de BPA, dos ambientes permanentes ou temporários e da densidade inicial de girinos de *Physalaemus cuvieri* no tempo até a metamorfose (dias). C0 ($0 \mu\text{g L}^{-1}$), C1 ($0,005 \mu\text{g L}^{-1}$) e C2 ($2,5 \mu\text{g L}^{-1}$).

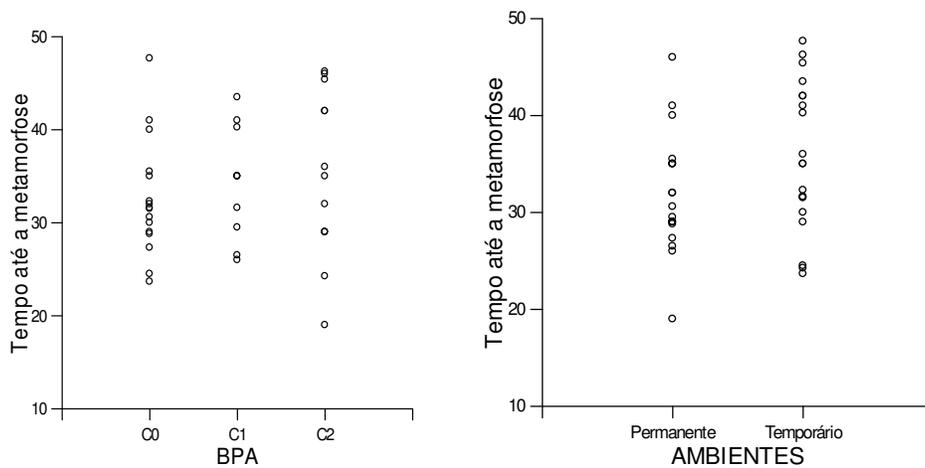


Figura 14. Efeito das concentrações de BPA e dos ambientes permanentes ou temporários no tamanho de *Physalaemus cuvieri* até metamorfose (dias). C0 ($0 \mu\text{g L}^{-1}$), C1 ($0,005 \mu\text{g L}^{-1}$) e C2 ($2,5 \mu\text{g L}^{-1}$).

Tabela 9. ANOVA dos efeitos de BPA (ausente, 0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$ ou 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), densidade inicial alta ou baixa e ambientes permanentes ou temporários sobre o tamanho médio dos metamorfoseados de *Physalaemus cuvieri* (transformado em logaritmo natural do comprimento rostro cloacal dos metamorfos).

Fatores	SQ	gl	QM	F	p
BPA	0.077	2	0.038	10.006	<0,0001
Ambientes	0.037	1	0.037	9.734	0,004
Densidade	0.001	1	0.001	0.312	0,580
Ambientes*BPA	0.052	2	0.026	6.724	0,003
Densidade*BPA	0.014	2	0.007	1.778	0,184
Densidade*Ambientes	0.048	1	0.048	12.525	0,001
Densidade*Ambientes*BPA	0.114	2	0.057	14.839	<0,0001
Erro	0.138	36	0.004		

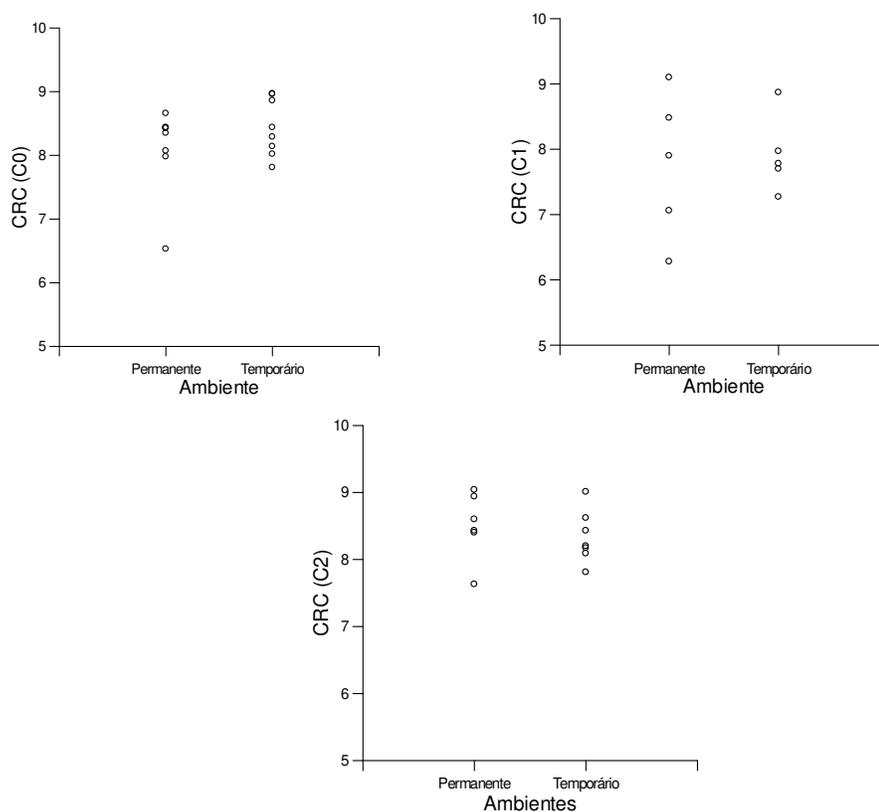


Figura 15. Efeito da interação de BPA e dos ambientes permanentes ou temporários no tamanho de *Physalaemus cuvieri* até metamorfose. C0 (0 $\mu\text{g L}^{-1}$), C1 (0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$) e C2 (2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$).

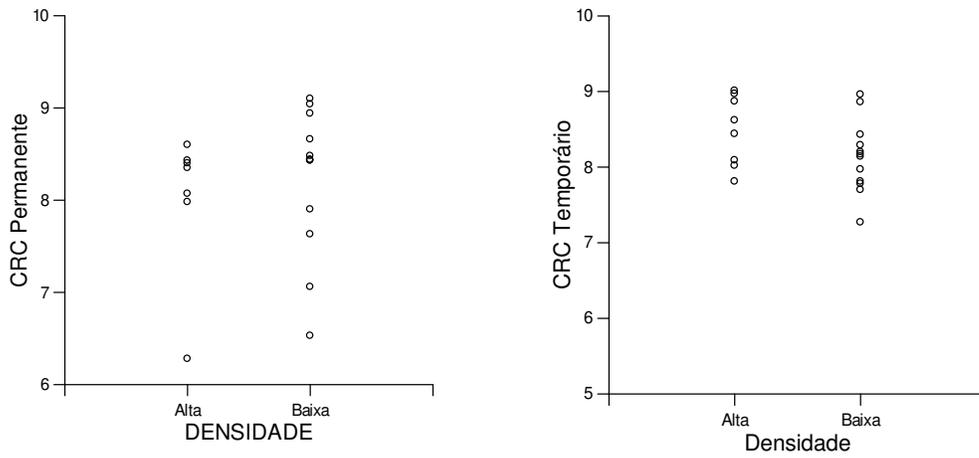


Figura 16. Efeito da interação dos ambientes permanentes ou temporários e da densidade inicial de *Physalaemus cuvieri* no tamanho na metamorfose.

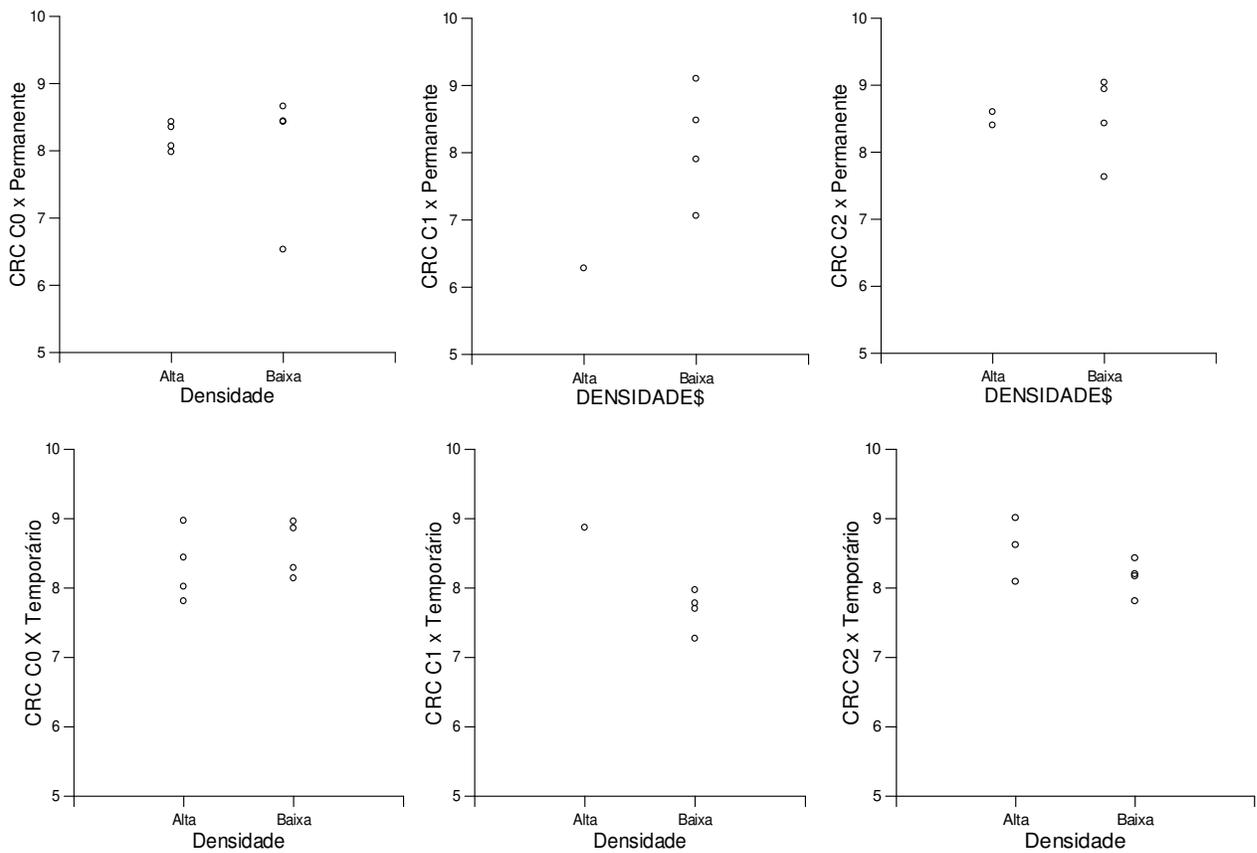


Figura 17. Efeito da interação de BPA, dos ambientes permanentes ou temporários e da densidade inicial de *Physalaemus cuvieri* no tamanho na metamorfose. C0 ($0 \mu\text{g L}^{-1}$), C1 ($0,005 \mu\text{g L}^{-1}$) e C2 ($2,5 \mu\text{g L}^{-1}$).

Tabela 10. ANOVA dos efeitos de BPA (ausente, 0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$ ou 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), densidade inicial alta ou baixa e ambientes permanentes ou temporários sobre a biomassa produzida de *Physalaemus cuvieri* (transformada em raiz quadrada da biomassa produzida).

Fatores	SQ	gl	QM	F	p
BPA	3.643	2	1.822	13.359	<0,0001
Ambientes	1.635	1	1.635	11.993	0,001
Densidade	35.949	1	35.949	263.639	<0,0001
Ambientes*BPA	0.191	2	0.096	0.701	0,503
Densidade*BPA	0.871	2	0.436	3.196	0,053
Densidade*Ambientes	0.350	1	0.350	2.568	0,118
Densidade*Ambientes*BPA	0.059	2	0.030	0.218	0,805
Erro	4.909	36	0.136		

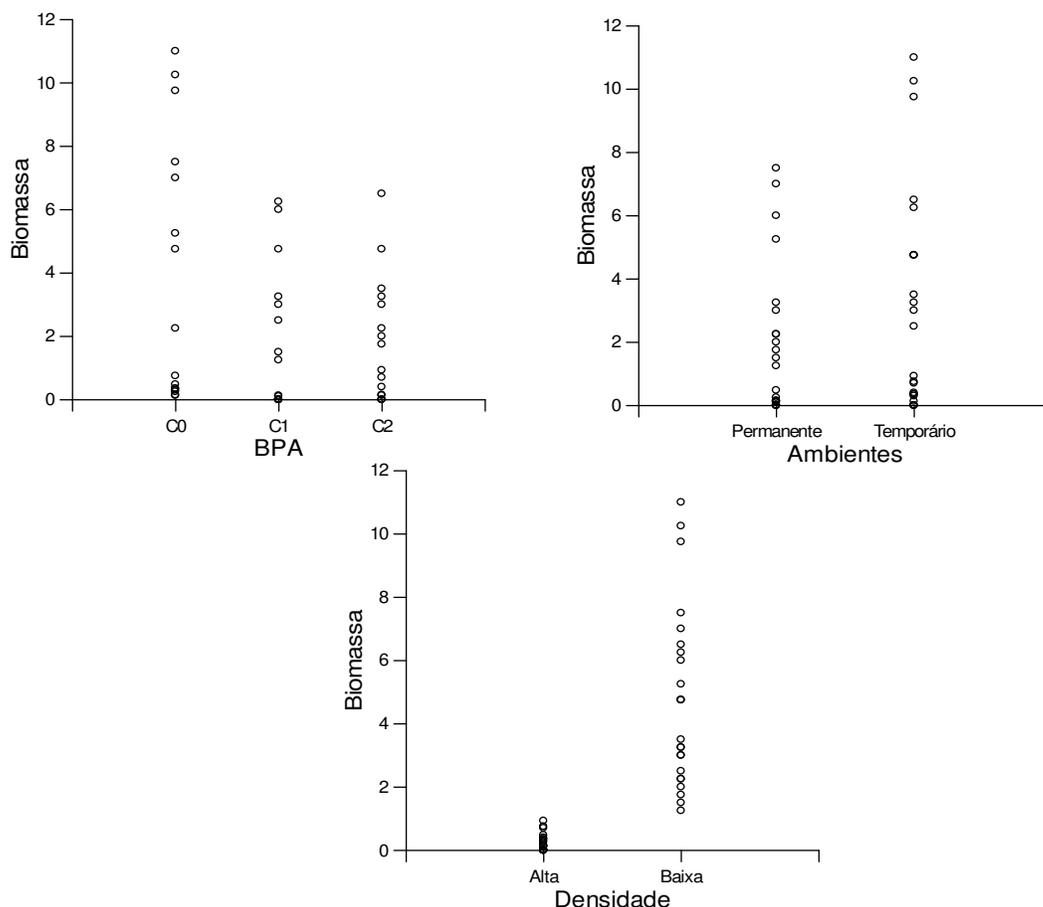


Figura 18. Efeito das concentrações de BPA, dos ambientes permanentes ou temporários e da densidade inicial de girinos de *Physalaemus cuvieri* sobre a biomassa produzida (g). C0 (0 $\mu\text{g L}^{-1}$), C1 (0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$) e C2 (2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$).

4.6 Razão sexual

Na ausência do BPA a razão sexual foi a mais próxima de 50%, em C1 houve uma menor proporção de fêmeas (47%) e em C2, a maior proporção de fêmeas (62%; Figura 19), mas houve grande variação dentro dos tratamentos (Figura 20) e essas diferenças não foram significativas (Tabela 11). Portanto, em girinos de *P. cuvieri* expostos às concentrações de BPA deste estudo não observamos feminilização.

Tabela 11. ANOVA do efeito do BPA sobre a porcentagem de fêmeas de *Physalaemus cuvieri* dos tratamentos C0 ($0 \mu\text{g L}^{-1}$), C1 ($0,005 \mu\text{g L}^{-1}$) e C2 ($2,5 \mu\text{g L}^{-1}$).

Fatores	gl	F	p
BPA	2	0.078	0,925
Erro	45		

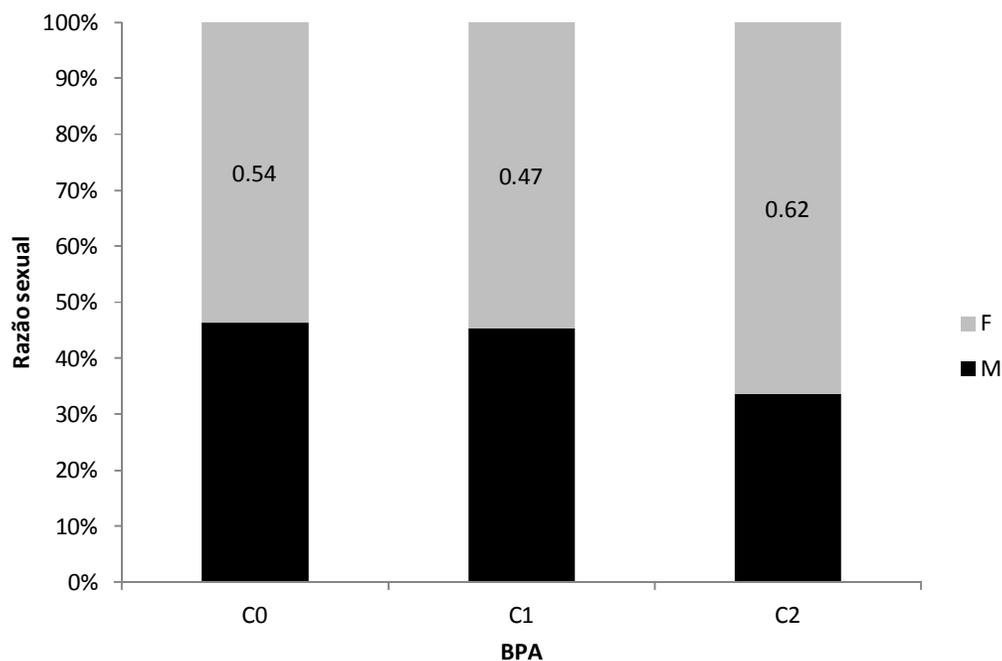


Figura 19. Efeito das concentrações de BPA sobre a razão sexual dos indivíduos metamorfoseados de *Physalaemus cuvieri*. C0 ($0 \mu\text{g L}^{-1}$), C1 ($0,005 \mu\text{g L}^{-1}$) e C2 ($2,5 \mu\text{g L}^{-1}$). F = fêmea e M = macho.

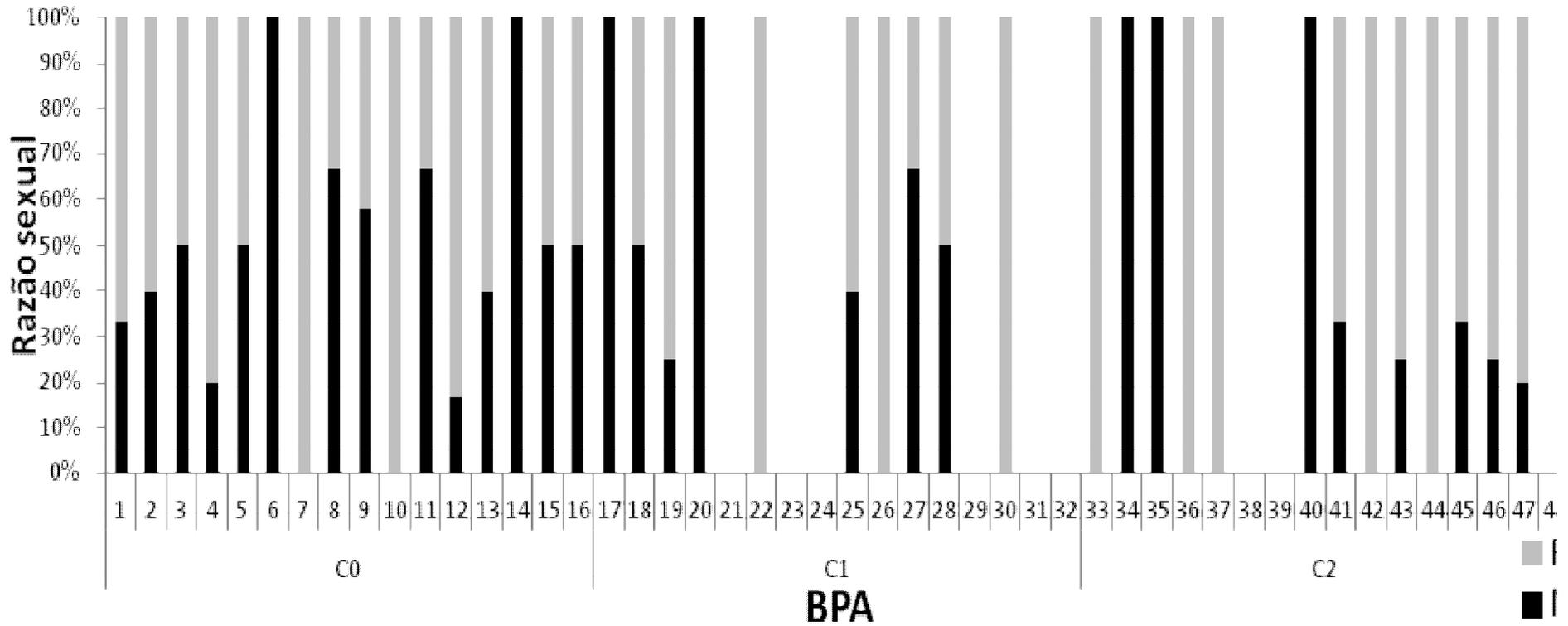


Figura 20. Efeito das concentrações de BPA sobre a razão sexual dos indivíduos metamorfoseados de *Physalaemus cuvieri* que se desenvolveram nos quarenta e oito aquários de vidro. C0 (0 µg L⁻¹), C1 (0,005 µg L⁻¹) e C2 (2,5 µg L⁻¹). F = fêmea e M = macho.

5. DISCUSSÃO

5.1 Temperatura e pH

Os ambientes temporários e permanentes apresentaram diferenças significativa nas temperaturas, como era esperado. A elevação da temperatura dos ambientes temporários pode influenciar na duração da metamorfose dos anfíbios anuros, levando os indivíduos a metamorfosearem mais rapidamente (LEIPS *et al.* 2000). Em ambiente natural de desenvolvimento de *P. cuvieri*, a temperatura média das poças é 24,9°C (MANEYRO; BEHEREGARAY 2007), valor abaixo da temperatura obtida no nosso estudo.

No entanto, a diferença de temperatura foi muito pequena para ter afetado o desenvolvimento. De qualquer modo, o nosso desenho experimental não pretendia diferenciar efeitos de temperatura de outros efeitos esperados em ambientes temporários, como a diminuição do espaço e o estresse.

O pH obtido nos aquários deste experimento está abaixo da faixa de variação encontrada por Leal (2007) de 5,56 a 8,77, que foram medidas em poças naturais localizadas em áreas abertas do município de São Luís, onde *P. cuvieri* se reproduz. O valor do pH da água pode influenciar no comportamento do contaminante, pois o BPA possui valor de pKa elevado indicando ser um ácido muito fraco, mas apesar da ionização dessa substância ocorrer em pH básico, não é improvável que seja sensível à ionização em níveis ambientais de pH igual a 7 ou menor (COUSINS *et al.* 2002).

5.2 Sobrevivência até a metamorfose

Alguns experimentos com anfíbios anuros demonstram aumento da mortalidade quando associados à presença do BPA (KLOAS *et al.* 1999; IWAMURO *et al.* 2003; LEVY *et al.* 2004; GOTO *et al.* 2006; OHNUMA *et al.* 2006; FINI *et al.* 2007).

Obtivemos neste experimento 6% de sobreviventes nos tratamentos controle (C0), o que está de acordo com a taxa de sobrevivência de populações naturais dos girinos que é em torno de 5%, devido às diversas pressões seletivas que sofrem durante seu desenvolvimento larvário nos ambientes naturais (SEMLITISH 1987).

Levy e colaboradores (2004) em experimentos com *Xenopus laevis* observaram que em tanques contendo 40 girinos, em concentrações de 2,3, 23 e 230 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BPA, a mortalidade foi em torno de 10 a 20%. No entanto, nossos resultados evidenciam 96% de mortalidade para *P. cuvieri* em tratamento com BPA. Mesmo nos tratamentos com baixa densidade, a mortalidade foi elevada, e a maior concentração utilizada neste trabalho foi similar à menor utilizada por Levy *et al.* (2004). Em outro estudo, Koponen e Kukkonen (2002) também observaram diminuição da sobrevivência (10% de mortalidade) de larvas de *Rana temporaria* dispostas em pratos pyrex, com 30 indivíduos por prato, contendo concentrações de BPA bem mais elevadas (1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$) do que as testadas no nosso trabalho.

A diferença na taxa de mortalidade observada pode ter ocorrido devido às diferenças ecológicas dessas espécies, *X. laevis* e *R. temporaria* são espécies filtradoras enquanto *P. cuvieri* é uma espécie raspadora. Como a maior concentração de BPA é encontrada nos sedimentos (FDA 2008), é esperado nos ambientes naturais que esse contaminante possa afetar mais as espécies que vivem no fundo dos corpos d'água, como *P. cuvieri*. No entanto, é

importante avaliar a resposta de espécies ecologicamente distintas e de regiões geográficas diferentes ao BPA, como essas duas espécies.

Physalaemus cuvieri, por ser sensível a baixas concentrações de BPA e ser facilmente observada em locais já alterados pelo homem pode ser considerada um bom bioindicador da contaminação ambiental. Espécies bioindicadoras indicam a condição do ambiente devido à sua moderada tolerância à variação ambiental (HOLT; MILLER 2011).

O maior número de metamorfos nos ambientes temporários pode ser explicado pela adaptação dessa espécie a esses ambientes, que apresentam risco de dessecação. Girinos que se desenvolvem em lagoas temporárias devem ajustar o desenvolvimento em resposta ao hidroperíodo, garantindo a sobrevivência e realização da metamorfose rapidamente (LEIPS *et al.* 2000).

O resultado obtido neste estudo é semelhante ao observado por Ferreira (2011), onde a mortalidade foi maior nos tratamentos com alta densidade, devido possivelmente à competição intraespecífica, principalmente por espaço, o que leva ao aumento do estresse. No entanto, o experimento apresentou alta mortalidade nos primeiros dez dias, independente dos tratamentos, o que provavelmente ocorre também em condições naturais.

5.3 Tempo de desenvolvimento

O tempo médio de desenvolvimento de *P. cuvieri* é quarenta e cinco dias (BARRETO; ANDRADE 1995), no entanto neste estudo o tempo de desenvolvimento foi menor. Nos ambientes experimentais, mesmo na ausência de predadores, a baixa densidade e a temperatura podem ter contribuído para a diminuição da média geral do período larvário.

Pickford *et al.* (2003) nos seus experimentos com larvas de *X. laevis* expostas ao BPA (concentrações 10, 23, 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) também não obtiveram diferenças significativas no tempo de metamorfose, quando comparados ao controle.

Era esperado que o ambiente temporário interferisse no tempo da metamorfose fazendo com que os girinos metamorfozassem mais rápido pela diminuição da área e consequente aumento da densidade populacional, reduzindo assim o risco de morte por dessecação e a competição (WILBUR; COLLINS 1973). Ao contrário do esperado, em alguns ambientes permanentes de baixa densidade o desenvolvimento larvário foi mais curto. Talvez o início da secagem dos aquários após o período de maior mortalidade das larvas tenha influenciado esse resultado, diminuindo os efeitos de densidade esperados. No entanto, Maciel e Juncá (2009) observaram em experimentos com baixa densidade de girinos de *Pleurodema diplolister*, também pertencente a família Leiuperidae, que a redução do volume de água, em 26°C, não influenciou no tempo de metamorfose dos indivíduos, assim como o resultado obtido no nosso estudo.

Por outro lado, como a água foi mantida no nível mínimo nos aquários temporários, foi possível que os girinos se mantivessem por mais tempo no estágio larval.

5.4 Tamanho na metamorfose

Andrade (1995) observou que o aumento da densidade de girinos de *P. cuvieri* causou diminuição da sobrevivência e biomassa das populações em poças artificiais, assim como diminuição do tamanho dos metamorfos.

Pickford *et al.* (2003) nos seus experimentos com larvas de *X. laevis* expostas ao BPA (concentrações 10, 23, 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) não obtiveram diferenças significativas no comprimento rostro-anal.

Embora a presença do contaminante nas concentrações testadas tenha mostrado um efeito significativo sobre *P. cuvieri*, com diminuição do tamanho no tratamento C1PD, esse resultado é questionável, pois resulta de um único metamorfo, podendo se tratar de uma variação individual. No geral, a maior concentração de BPA tende a levar a um maior CRA dos metamorfoseados, sendo possível que o BPA cause ação desregulatória endócrina sobre esses organismos. Levy *et al.* (2004) demonstraram aumento do tamanho e peso corporal dos indivíduos *X. laevis* nas 3 concentrações de BPA testadas (2,3, 23 e 230 $\mu\text{g L}^{-1}$), com uma tendência de pesos maiores na concentração mais baixa, que é semelhante a usada no nosso estudo.

A relação dose resposta é um tema ainda discutível (FONTENELE *et al.* 2010). São necessários outros experimentos, com mais repetições e utilizando uma variação maior de concentrações de BPA, para esclarecer melhor esta questão.

5.5 Biomassa

Os resultados mostraram que o BPA afeta negativamente a biomassa produzida, como era esperado. Esse resultado está associado diretamente à maior sobrevivência, uma vez que não houve variação no tamanho dos metamorfos. A biomassa foi maior nos ambientes temporários e também nas baixas densidades iniciais. Andrade (1995) também constatou em poças artificiais a diminuição de biomassa em altas densidades de girinos de *P. cuvieri*.

5.6 Razão sexual

Kloas *et al.* (1999) mostraram em experimentos com *Xenopus laevis* um aumento significativo do número de fêmeas na maior concentração de BPA (23 $\mu\text{g L}^{-1}$) quando comparada ao controle. Pickford *et al.* (2003), em experimentos com larvas dessa mesma espécie expostas ao BPA (concentrações 10, 23, 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$), não obtiveram diferenças

significativas na razão sexual (50:50). Levy *et al.* (2004) realizaram dois experimentos, também com larvas de *X. laevis* expostas a BPA, e observaram diferenças significativas na razão sexual em concentrações de 23 $\mu\text{g L}^{-1}$, com maior proporção de fêmeas em ambos experimentos (69% e 70%, respectivamente). Os diferentes resultados desses autores podem ter ocorrido pelas diferenças no desenho experimental dos estudos (FDA 2008), com regimes de exposição semi-estático, renovação periódica da solução de BPA (LEVY *et al.* 2004; KLOAS *et al.* 1999) e com sistema de fluxo contínuo das diluições contendo BPA durante todo o experimento (PICKFORD *et al.* 2003).

No entanto, a concentração testada em todos esses estudos foi muito maior do que as utilizadas no presente estudo, onde não evidenciamos efeito do BPA na razão sexual de *P. cuvieri*, quando presente na concentração de 0,005 e de 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Diferentes espécies podem apresentar diferentes respostas aos contaminantes ambientais, mas é necessário testar as mesmas concentrações para avaliar se o efeito é o mesmo ou não.

O BPA é um estrógeno não estereóide que interfere na ligação 17 β -estradiol ao seu receptor nos tecidos-alvo. Os esteróides sexuais agem nos primeiros estágios da metamorfose, na formação e diferenciação das gônadas, e a presença de um mimetizador do estrogênio nessa fase pode causar mudança de sexo (GOTO *et al.* 2006; HOGAN *et al.* 2008; MACKENZIE *et al.* 2003; PARK; KIDD 2005), no entanto essa modificação depende da dose desse xenoestrogênio presente na água.

Nosso estudo apresentou resultados semelhantes aos de Ferreira (2011) que testou as mesmas concentrações deste estudo para etinilestradiol em *P. cuvieri*, que assim como o BPA, pode causar mudança no sexo dos indivíduos, no entanto não houve mudança na razão sexual dos metamorfos. A explicação para esse resultado, assim como o do nosso estudo, foi que as

concentrações a que os girinos foram submetidos não foram suficientes para causar feminilização e mudanças na razão sexual.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no experimento fatorial que testou as interações ente BPA, ambientes permanentes ou temporários e densidades iniciais alta e baixa sobre o desenvolvimento larval de *Physalaemus cuvieri*, permite concluir que:

- A presença de BPA na água, a densidade inicial dos girinos e o ambiente temporário ou permanente influenciaram significativamente na sobrevivência até a metamorfose e na biomassa produzida de *P. cuvieri*.
- O tempo até a metamorfose, tamanho na metamorfose e razão sexual não variaram significativamente na presença de BPA.
- A maior sobrevivência ocorreu na ausência do contaminante, em baixa densidade e no ambiente temporário.
- A mortalidade foi maior nos tratamentos com alta densidade, onde ocorre aumento do estresse devido possivelmente à competição intraespecífica, principalmente por espaço.
- A mortalidade obtida foi maior do que a observada em estudos com outras espécies de anuros, o que pode ter ocorrido devido às diferenças ecológicas dessas espécies.
- A sobrevivência foi maior nos ambientes temporários, o que pode ser explicado pela adaptação dessa espécie a esses ambientes, que apresentam risco de dessecação.
- A sobrevivência diminuiu bastante nos 10 primeiros dias de experimento, independente dos tratamentos, o que provavelmente ocorre também em condições naturais.
- Mesmo não variando significativamente, o tamanho na metamorfose tende a se maior na maior concentração de BPA, sendo possível que o BPA cause ação desregulatória endócrina sobre esses organismos.

- O BPA afeta negativamente a biomassa produzida, como era esperado, e se deve pela diminuição da sobrevivência, com maior efeito nos ambientes permanentes e densidade alta.
- Não houve mudança na razão sexual dos girinos de *P. cuvieri*, diferentemente do esperado e registrado para *Xenopus laevis* em concentrações maiores de BPA do que a do nosso estudo.

7. REFERÊNCIAS

- Alexander, H.C., Dill, D. C., Smith, L.W., Guiney, P. D. and Dorn, P. 1988. Bisphenol-A: Acute aquatic toxicity. **Environmental Toxicology and Chemistry** 7, 19-26.
- Andrade, G.V. 1995. **A história de vida de *Physalaemus Cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) em um ambiente temporário.** Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Estadual de Campinas, Tese de Doutorado.
- Andrady, A. L. and Neal M. A. 2009. **Applications and societal benefits of plastics.** Phil. Trans. R. Soc. B 364, 1977–1984.
- Barreto, L. N.; Andrade, G. V. 1995. Aspects of the Reproductive Biology of *Physalaemus cuvieri* (Anura:Leptodactylidae) in northeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, Leiden, v. 16, p. 67-76.
- Blaustein, J. D., Tetel, M. J., Meredith, J. M. 1995. **Neurobiological regulation of hormonal response by progestin and estrogen receptors. Neurobiological effects of sex steroid hormones.** Micevych P.E., Hammer R.P.J., editors. Cambridge: Cambridge University Press: pp. 324 – 349.
- Boone, M.D. and Semlitsch R. D. 2002. Interaction of an insecticide with competition and pond drying in amphibian communities. **Ecol. Appl.** 12: 307 -316.
- Borrell, B. 2010. Toxicology: The big test for bisphenol A. **Nature** (London) 464, 1122-1124.
- Casquimica. 2005. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos: bisfenol A.**

Disponível em <http://www.casquimica.com.br/fispg/bisphenolA.pdf>. Acesso em 4 de abril de 2012.

Cousins, I.T., Staples C. A., Klečka G. M., Mackay D. 2002. A multimedia assessment of the environmental fate of bisphenol A. **Human and Ecological Risk Assessment (HERA)**. 8: 1107-1136.

Duarte, P. A. F. 2008. **Novos poluentes: Principais impactos de compostos desreguladores endócrinos na saúde pública**. Dissertação de Mestrado da Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

EFSA, European Food Safety Authority. 2006. **Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the Commission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A) Question number EFSA-Q-2005-100**. The EFSA Journal, 428:1-75.

FDA - Food and Drug Administration. 2008. **Draft Screening Assessment for Phenol, 4,4'-(1-methylethylidene)bis- (80-05-7)**. Disponível em: http://www.ewg.org/files/BPA_091208.pdf Acesso em: 2 de abril de 2012.

Fenske, M., Maack, G., Schäfers, C. and Segner, H. 2005. Assessment of estrogenic effects on reproduction and sexual differentiation in zebrafish (*Danio rerio*): Alterations in vitellogenesis and reproductive physiology. *Environ Toxicol Chem.* May;24(5):1088-98.

Ferreira, A. P. 2011. **Interações entre estressores naturais e etinilestradiol no desenvolvimento larval de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae)**. Dissertação de mestrado da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil.

Filho, R. W. R., Luvizotto-Santos, R., Vieira, E. M. 2007 Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 2, n. 3, 283-288.

Fini, J. B., Le Mevel, S., Turque, N., Palmier, K., Zalko, D., Cravedi, J. P. and Demeneix, B. 2007 An in vivo multiwell- based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. **Environ. Sci. Technol.** 41, 5908–5914. (doi:10.1021/es0704129).

Fontenele, E. P.; Martins, M. A.; Quidute, A. R. P. e Montenegro Junior, R. M. 2010.

- Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arq Bras Endocrinol Metab** [online], vol.54, n.1 [cited 2010-12-10], pp. 6-16. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302010000100003
- Furuya, M., Adachi, K., Kuwahara, S., Ogawa, K. and Tsukamoto, Y. 2006. Inhibition of male chick phenotypes and spermatogenesis by Bisphenol-A. **Life Sciences**, **78**, 1767-1776.
- Gardner, T. 2001. Declining amphibian populations: a global phenomenon in conservation biology. **Animal Biodiversity and Conservation**. 24.2: 25–44.
- Gascon, C., Collins; J. P., Moore; R. D., Church; D. R., McKay; J. E. and Mendelson, J. R. 2007. **Amphibian Conservation Action Plan**. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 64pp. III (eds).
- Ghisselli, G. 2006. **Avaliação da qualidade das água destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP)**. Tese de doutorado - Universidade Estadual de Campinas, SP.
- Ghisselli, G.; Jardim, W. F. 2007. Interferentes endócrinos no ambiente. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 3, 695-706.
- Gloubkova, T. and Spritzer, P. M. 2000. Xenoestrogênios: o exemplo do bisfenol A. **Arq. Bras. Endocrinol Metab**, v. 44, p. 323-330.
- Gosner, K. L. 1960. A simplified table for tagging anurans embryos and larvae with notes on identification. **Herpetol** 16: 183-190.
- Goto, Y., Kitamura, S., Kashiwagi, K., Oofusa, K., Tooi, O., Yoshizato, K., Sato, J., Ohta, S., Kashiwagi, A. 2006. Suppression of amphibian metamorphosis by bisphenol A and related chemical substances. **J Health Sci** 52(2):160-168.
- Haddad, C.F.B.; Prado, C. P. A. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **Bioscience**, 55(3):207–217.

- Hess, S. C. 2007. **Disruptores endócrinos ambientais: riscos à saúde pública**. Disponível em <http://www.agroecologiaealternativasecologicas.blogspot.com>. Acesso em 10 de maio 2010.
- Hogan, A.N.S., Duarte, P., Wadeb, M.G., Lean, D.R.S., Trudeau, V.L. 2008. Estrogenic exposure affects metamorphosis and alters sex ratios in the northern leopard frog (*Rana pipiens*): Identifying critically vulnerable periods of development. **Gen Comp Endocrinol** 156: 515-5232.
- Holt, E. A. & Miller, S. W. (2011) Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts. *Nature Education Knowledge* 2(2):8
- IUCN. Conservation International and Nature serve. 2010. **Global Amphibian Assentment: electronic database**. Disponível em: <http://www.globalamphibians.org>. Acesso em 10 de maio de 2010.
- Iwamuro, S., Sakakibara, M., Terao, M., Ozawa, A., Kurobe, C., Shigeura, T., Kato, M., Kikuyama, S. 2003. Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*. **Gen Comp Endocrinol** 133:189–198.
- John, K. R. and D. Fenster. 1975. The effects of partitions on the growth rate of crowded *Rana pipiens* tadpoles. **Am. Midl. Nat.** 93: 123-30.
- Johnson, I., Weeks, J. M. and Kille, P. 2005. **Endocrine Disruption in Aquatic and Terrestrial Invertebrates – Final Report**. WRC-NSF Ltd, Report No UC 4906/6 for the Department of the Environment, Food and Rural Affairs.
- Kang, J.H., Kondo, F. 2002. Bisphenol A degradation by bacteria isolated from river water. **Arch Environ Contam Toxicol.** Oct;43(3):265-9.
- Kloas, Werner; Lutz, Ilka and Einspanier. 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. **The Science of The Total Environment**, pp. 59-68.
- Kohno, S., Fujime, M., Kamishima, Y. & Iguchi, T. 2004 Sexually dimorphic basal water absorption at the isolated pelvic patch of Japanese tree frog, *Hyla japonica*. **J. Exp.**

Zool. A 301, 428–438.

Koponen, P. S, Tuikka, A., Kukkonen, J. V. K. 2007. Effects of ultraviolet-B radiation and larval growth on toxicokinetics of waterborne bisphenol A in common frog (*Rana temporaria*) larvae. **Chemosphere** 66:1323-1328.

Koponen, P. S. and Kukkonen, J, V. K. 2002. Effectes of bisphenol A and artificial UVB radiation on the early development of *Rana temporaria*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part. A.** 65: 947 – 959.

Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L., Feldman, D. 1993 Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonateflasks during autoclaving. **Endocrinology**, 132:2279-86.

Leal, C. B. 2007. **Efeitos da alteração da quantidade de alimento no crescimento e desenvolvimento de girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae).** Dissertação de mestrado do Programa de pós-graduação de Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão.

Leips, J., McManus, M. G., Travis, J. 2000. Response of treefrog larvae to drying ponds: Comparing Temporary and Permanent Pond Breeders. **Ecology**, Vol. 81, No. 11 pp. 2997-3008.

Levy, G.; Lutz, I.; Krüger, A.; Kloas, W. 2004. Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. **Environ Res** 94:102-111.

Loffredo, E. and Senesi, N. 2006. Fate of anthropogenic organic pollutants in soils with emphasis on adsorption/desorption processes of endocrine disruptor compounds. **Pure Appl Chem** 78(5): 947-961.

Maciel, T. A. and Juncá, F. A. 2009. Effects of temperature and volume of water on the growth and development of tadpoles of *Pleurodema dipolister* and *Rhinella granulose* (Amphibia: Anura). **Zoologia** (3): 413–418.

Mackenzie, C.A., Berrill, M., Metcalfe, C., Pauli, B.D. 2003. Gonadal differentiation in frogs exposed to estrogenic and antiestrogenic compounds. **Environ Toxicol Chem** 22:2466-

2475.

Manahan, S. E. 2003. **Toxicological Chemistry and Biochemistry**. 3rd ed., Lewis Publishers: Boca Raton.

Maneyro, R. And Beheregaray, M. 2007. First record of *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 (Anura, Leiuperidae) in Uruguay, with comments on the anuran fauna along the borderline Uruguay – **Brazil**. **Bol. Soc. Zool. Uruguay**. 2^a época, 16:36-41.

Marcantonio, A. S. 2005. **Toxicidade do Sulfato de cobre e do sulfato de zinco para a Rã-touto *Rana catesbeiana* Shaw, 1802: Toxicidade aguda e crônica**. Tese de doutorado programa de pós- graduação em Aquicultura de Águas Continentais, Jaboticabal, São Paulo.

Newman, R. A. 1994. Genetic variation for phenotypic plasticity in the larval life history of spadefoot toads (*Scaphiopus couchii*). **Evolution** 48, 1773–1785.

NTP, National Toxicology Program (US). 2007. **NTP-CERHR Expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol-A**. Research Triangle Park (NC): US Department of Health and Human Services, Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction, National Toxicology Program.

Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Bachmann J, Oetken M, Lutz I, Kloas W. 2006. Bisphenol A induces super-feminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda: Prosobranchia) at environmentally relevant concentrations. **Environ Health Perspect**;114(suppl 1):127–133.

Oehlmann, J.; Schulte-Oehlmann, U.; Kloas, W.; Jagnytsch, O.; Lutz, I.; Kusk, K. O.; Wollenberger, L.; Santos, E. M.; Paull, G. C.; VanLook, K. J. W.; Tyler, C. R. 2009. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. doi: 10.1098/ Phil. Trans. **R. Soc. B** vol. 364 no. 1526 2047-2062

Ohnuma, A., Conlon, J. M., Kawasaki, H. & Iwamuro, S. 2006 Developmental and triiodothyronine-induced expression of genes encoding preprotemporins in the skin of Tago's brown frog *Rana tagoi*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 146, 242–250.

(doi:10.1016/j.ygcen.2005.11.015)

- Oka T, Adati N, Shinkai T, Sakuma K, Nishimura T and Kurose K. 2003. Bisphenol A induces apoptosis in centralneural cells during early development of *Xenopus laevis*. *Biochem. Biophys. Res. Comm*, 312, 877-882.
- Park, B. J. and Kidd, K. A. 2005. Effects of the synthetic estrogen ethynylestradiol on early life states of mink frogs and green frogs in the wild and *in situ*. *Environ. Toxicol. Chem.* 24(8):2027-2036.
- Pickford, D. B., Hetheridge, M. J., Caunter, J. E., Hall, A. T., Hutchinson, T. H. 2003. Assessing chronic toxicity of bisphenol A to larvae of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) in a flow-through exposure system. *Chemosphere* 53: 223–235.
- Raimundo, C. C. M. 2007. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. Dissertação de mestrado da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- Rogers, T. N.; Chalcraft, David. R. 2008. Pond hydroperiod alters the effect of density-dependent processes on larval anurans. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 65 n 12 2761-8 D.
- Ronen, Z., Abeliovich, A. 2000. Anaerobic–aerobic process for microbial degradation of tetrabromobisphenol A. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2372–2377.
- Rudel, R. A., Brody, J. G., Spengler, J. D., Vallarino, J., Geno, P. W., Sun, G., Yau, A. 2001. Identification of selected hormonally active agents and animal mammary carcinogens in commercial and residential air and dust samples. *J Air Waste Manag Assoc* 51:499–513.
- Sanchez, D. C. O. 2006. **Desreguladores endócrinos na indução da vitelogenina em peixes nativos**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná.
- Santamarta, J. 2001. A ameaça dos disruptores endócrinos. *Revista Agroecologia e*

Desenvolvimento Rural Sustentável, Porto Alegre: v.2, nº3.

Semlitsch , R.D. 1987. Relationship of pond drying to the reproductive success of salamander *Anlbystoma talpoidrum*. **Copeia**: 61-69.

Sodré, F.F., Montagner, C.C., Logatelli, M.A.F., Jardim, W.F. 2007. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil). **J Braz Soc Ecotoxicol** 2:187-196.

Sokal, R. R. and Rohlf, F. J. 1995. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**. 3rd edition. W. H. Freeman and Co.: New York. pp. 887.

Steinwascher, K. 1979. Interference and exploitation competition among tadpoles of *Rana utricularia*. **Ecology** 59: 1039 -1046.

Tabachnick, B. G. and Fidell, L. S. 1989. **Using multivariate statistics**. Harper & Row, Publis., New York, 2º ed. 746pp.

Talsness, C. E., Andrade, A. J. M., Kariyama, S. N., Taylor, J. A; vom Saal , F. S. 2009. Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 364, 2079-2096.

West, R.J., Goodwin, P. A., Klecka, G. M. 2001. Assessment of the Ready Biodegradability of Bisphenol-A. **Bull Environ Contam Toxicol** 67:106-112.

Wilbur, H. M., J. P. Collins. 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis. **Science** 182:1305-1314.

Yamamoto, T., Yasuhara, A., Shiraishi, H., Nakasugi, O. 2001. Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates. **Chemosphere**, pp. 415-418.

APÊNDICE

**EFEITOS DO BISFENOL A SOBRE GIRINOS DE *PHYSALAEMUS CUVIERI*
(ANURA: LEIUPERIDAE) EM AMBIENTES TEMPORÁRIOS E PERMANENTES**

ALINE N. MAGALHÃES; NATILENE M. BRITO; BRENA MÁRCIA F. BORGES, and
GILDA V. DE ANDRADE

Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia. Av. dos Portugueses, s/n - Campus do Bacanga, Depto Biologia Bacanga 65085-580 - São Luis, MA – Brasil.

Abstract. The environmental contaminants contribute to the declining populations of many species of frogs, but few studies report the effects of bisphenol A (BPA) in these animals. However, the concentration of that substance in the environment increases with the technological and social advancement causing negative impacts on ecosystems and aquatic organisms. The aim of this study was to evaluate the effects of BPA, associated with other stressors (high density and environment drying) on the development of tadpoles of *Physalaemus cuvieri* that develop in lentic water bodies and temporary locations that may become illegal dumping in the cities. For this, we conducted one experiment in glass aquariums testing concentrations $0.005 \mu\text{g L}^{-1}$ and $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ of BPA combined with different initial densities of tadpoles in permanent and temporary environments. We evaluated five response variables: survival until metamorphosis, mean larval period, metamorphs snout-vent length, biomass production on metamorphosis, and proportion of metamorphic females. The presence of BPA in the water decreased the survival and the biomass, however did not affected the larval period, body size, and the sex ratio. Therefore, as in many places it have already been detected greater levels of bisphenol A than the tested concentrations used in this study, we expect that this contaminant may be affecting many amphibian populations, as many other animal species.

Key words: Amphibia, plastic contamination, density effects, hydroperiod effects.

INTRODUÇÃO

Os poluentes emergentes são aqueles que estão sendo introduzidos rapidamente no meio ambiente sem restrições ou estudos apropriados dos possíveis danos que possam causar (Filho *et al.* 2007). Dentre esses poluentes estão os disruptores endócrinos (*endocrine disruptores*, ED) que são agentes ou substâncias químicas presentes no meio ambiente que tendem a se acumular no solo e nos sedimentos dos rios. Os ED's mesmo em baixa concentração afetam as espécies aquáticas diminuindo a fertilidade, causando deformidades, masculinização e feminilização em muitos grupos de animais, dependendo da sensibilidade de cada espécie e do período de exposição ao contaminante (Ghisselli and Jardim 2007; Santamarta 2001). Exposições nos estágios iniciais de vida podem causar danos irreversíveis que podem levar muitas espécies até mesmo à extinção (Gascon *et al.* 2007).

O bisfenol A (BPA) é um desses poluentes que atua no sistema endócrino e está presente nos ecossistemas aquáticos. É matéria-prima para fabricação do plástico que quando em contato com um meio líquido pode ser liberado ao ambiente externo por lixiviação, reação esta acelerada com o aumento da temperatura (Raimundo 2007; Krishnan *et al.* 1993). Quando o BPA encontra-se biodisponível é potencialmente negativo ao desenvolvimento dos indivíduos, pois mimetiza o hormônio estrogênio e se liga aos seus receptores, se armazenando no tecido adiposo de muitos seres vivos, podendo causar uma série de efeitos negativos em muitas espécies (Santamarta 2001; FDA 2008). Dentre os principais efeitos do BPA temos redução da biomassa em algas (Alexander *et al.* 1988), malformação, feminilização e aumento do número de desovas e ovos por desova em moluscos (Oehlmann *et al.* 2006), diminuição da sobrevivência em crustáceos (Johnson *et al.* 2005), feminilização e malformações em anfíbios (Levy *et al.* 2004; Iwamuro *et al.* 2003), alterações na vitelogênese

e reprodução em peixes (Fenske *et al.* 2005) e redução da espermatogênese em aves (Furuya *et al.* 2006).

Os contaminantes ambientais contribuem para o declínio de populações de muitas espécies, porém ainda poucos estudos relatam os efeitos do BPA nos seres vivos. No entanto, a concentração desse ED aumenta no ambiente juntamente com o avanço tecnológico e social causando impactos negativos nos ecossistemas e organismos aquáticos (Sodré *et al.* 2007; Duarte 2008).

Os anfíbios anuros são um dos grupos de animais que potencialmente sofrem os impactos negativos do BPA no meio ambiente, apresentando-se como importantes bioindicadores da contaminação ambiental (Blaustein *et al.* 1995; Marcantonio 2005; Sanchez 2006). Eles são sensíveis às mudanças em seu ambiente externo por estarem em contato íntimo com muitos componentes do seu ambiente natural devido ao seu ciclo de vida duplo e a sua pele permeável (Gardner 2001).

Em alguns ecossistemas, os anfíbios são os vertebrados mais abundantes, e assim a sua ausência pode comprometer seriamente o funcionamento da comunidade ecológica (Blaustein *et al.* 1995). No entanto, nas últimas décadas tem-se observado em diferentes regiões do mundo o declínio de algumas populações de anfíbios que pode estar relacionado, além de outros fatores, à contaminação química dos ambientes por estressores que afetam os anuros tornando-os susceptíveis a predadores, afetando relações competitivas e reduzindo o sucesso reprodutivo dos indivíduos (Gascon *et al.* 2007).

As interações bióticas e abióticas atuam sobre a distribuição e abundância das espécies influenciando direta ou indiretamente no desenvolvimento dos anfíbios (e.g. Andrade 1995; Rogers and Chalcraft 2008). Dentre os fatores bióticos, o efeito da densidade de indivíduos age diretamente sobre o desenvolvimento larvário dos anuros aumentando o estresse, devido à

falta de espaço ou liberação de inibidores de crescimento (John and Fenster 1975; Steinwascher 1979) e aumenta a competição principalmente por alimento (Newman 1994). O hidroperíodo da lagoa também influencia o desenvolvimento dos girinos já que leva os indivíduos a metamorfosearem rapidamente, antes que a lagoa seque por completo (Rogers and Chalcraft 2008).

Portanto, fatores como a densidade de girinos, mudanças no hidroperíodo da lagoa e alterações no pH são conhecidos por influenciar negativamente a dinâmica da população e da comunidade de anfíbios, podendo influenciar na potência de um contaminante (Boone and Semlitsch 2002). Assim, esses fatores naturais somados à contaminação dos ambientes aquáticos podem ser responsáveis pelo rápido declínio de várias espécies de anfíbios, ressaltando a necessidade urgente de pesquisas e a implementação imediata de estratégias para aumentar os esforços para a conservação desses animais. Em regiões, como o nordeste do Brasil, onde existem poucos dados sobre diversidade, abundância e distribuição das espécies, muitas espécies já devem ter sido extintas antes de serem descobertas, algumas já estão ameaçadas de extinção e muitas outras em breve vão desaparecer, se não forem tomadas medidas de preservação e conservação dos ambientes (Haddad and Prado 2005).

Diante disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do BPA sobre o desenvolvimento de girinos de *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 (Anura: Leiuperidae) que se desenvolvem em corpos d'água lênticos e temporários, locais que podem se tornar depósito ilegal de lixo nas cidades e seus arredores. Essa espécie é conhecida vulgarmente como rã-cachorro, tem ampla distribuição no Brasil e comumente é encontrada próxima às habitações humanas (IUCN 2010; Andrade 1995). Os ovos, cerca de 400 por desova, são depositados em ninho de espuma e se desenvolvem em girinos raspadores (Barreto and Andrade 1995). Portanto, *P. cuvieri* pode servir de modelo para avaliarmos o efeito do bisfenol A sobre o

desenvolvimento de muitas espécies de anfíbios anuros ecologicamente similares. A hipótese central desse estudo foi que o BPA afeta negativamente a sobrevivência e o tamanho dos indivíduos na metamorfose e, portanto, a biomassa produzida, bem como prolonga o tempo para atingir a metamorfose e altera a razão sexual, aumentando a proporção de fêmeas, com maior efeito em pequenas poças temporárias com alta densidade devido ao aumento da temperatura somado aos efeitos de densidade.

MÉTODOS

As coletas de 13 desovas de *P. cuvieri* ocorreram na estação chuvosa de 2011 em poças temporárias no sudoeste da ilha do Maranhão (2°40'S; 44°15'O), município de São Luís, Maranhão, Brasil. Após a coleta, acomodamos as desovas em potes de vidro contendo a água da poça para transportar ao Laboratório de Herpetologia e Ecologia Aplicada à Conservação da Universidade Federal do Maranhão. Após o início do experimento, soltamos os girinos não utilizados no mesmo local da coleta.

Durante todo experimento evitamos o contato da água com qualquer tipo de recipiente plástico, evitando dessa forma que nos aquários controle houvesse presença do BPA advindo da lixiviação do contaminante presente nesses produtos, assim como alteração das concentrações testadas nos aquários com bisfenol A.

As desovas coletadas permaneceram em aquários no laboratório até a eclosão. Após dois dias, quando as larvas atingiram o estágio 25 (Gosner 1960), montamos o experimento em aquários de vidro alocados em uma varanda coberta, com iluminação natural e temperatura ambiente.

Visando comparações com os resultados de Ferreira (2011), que testou os efeitos do hormônio 17 α -etinilestradiol no desenvolvimento de girinos de *P. cuvieri*, utilizamos as

mesmas concentrações para o bisfenol A que as utilizadas para o hormônio: 0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$ (C1), 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (C2) e o controle, ausente (C0).

Utilizamos água de abastecimento urbano, decantada por três dias para eliminação do cloro, em baldes de alumínio. A cada troca de água, medimos o pH e temperatura da água decantada, repusemos as devidas concentrações em cada aquário de vidro e fizemos a permuta aleatória dos mesmos, através de sorteios, para reduzir ou excluir a influência das variações existentes no local do experimento, como temperatura e luminosidade.

Diariamente, avaliamos a mortalidade, retirando os indivíduos mortos dos recipientes e medimos a umidade do ar e a temperatura ambiente ($^{\circ}\text{C}$), máxima e mínima, com termômetro digital.

Realizamos um experimento fatorial $3 \times 2 \times 2$, onde avaliamos o efeito do fator BPA em concentrações alta (C2), baixa (C1) ou ausente (C0), e dos fatores densidade (dez girinos para densidade inicial baixa (d) e 100 para densidade inicial alta (D) e hidroperíodo permanente (P) e temporário (T). Utilizamos quatro réplicas de cada tratamento, dezesseis aquários para cada concentração de BPA, totalizando 48 aquários (6 x 20 x 12 cm). Seleccionamos 2640 girinos de tamanhos semelhantes, excluindo os indivíduos muito pequenos. Cada tratamento e repetição recebeu o mesmo número de girinos das diferentes desovas, para garantir uma maior variabilidade genética.

Mantivemos a aeração dos aquários durante 12 horas por dia (das 19:00 às 7:00h) para que nos aquários com grande densidade não houvesse competição por oxigênio. A troca de água foi feita a cada cinco dias para reposição da concentração do contaminante e retirada de fezes e de restos de alimento.

Para o hidroperíodo permanente, mantivemos os aquários com o mesmo nível de água do início do experimento (2,5 l) e para o temporário retiramos gradativamente a água, de acordo com Andrade (1995). A partir do 15º dia, a cada troca de água, reduzimos o volume de água para 66%, 50%, 33% e 16%. Este último nível permaneceu até o fim do experimento, pois um grande número de girinos ainda não havia metamorfoseado.

Utilizamos diariamente ração em flocos para peixes herbívoros (marca Alcon Vegetal), inicialmente na proporção de 0,1 g /10 indivíduos, proporcionalmente aumentada com o crescimento dos girinos. À medida que foram crescendo, adicionávamos ração duas vezes ao dia para sobrar alimento nos aquários, evitando a competição pelo mesmo.

Antes de iniciarmos o experimento pesamos 100 girinos com 2 dias de eclosão, selecionados com o mesmo critério dos introduzidos nos aquários, em balança analítica com precisão de 0.0001 g, para obtenção da massa média inicial de cada girino. Para o cálculo da razão da biomassa produzida em cada tratamento utilizamos a soma da massa dos indivíduos recém-metamorfoseados (*in vivo*), m_f , dividida pela soma da massa média inicial dos girinos introduzidos, m_i : $B = \sum m_f / \sum m_i$.

À medida que os indivíduos começaram a metamorfosear (estágio 42, Gosner 1960), os retiramos dos aquários, pesamos, medimos o comprimento rostro-cloacal (CRC) com paquímetro digital (0,01 mm precisão) e fixamos em álcool a 70%. Também fixamos em álcool 70% os girinos que não metamorfosearam até o fim do experimento.

Não foi possível fazer a diferenciação sexual por caracteres secundários, por isso todos os indivíduos metamorfoseados foram dissecados para determinação do sexo. Para visualização das gônadas, abrimos a região ventral e analisamos as estruturas masculinas e femininas com auxílio de microscópio estereoscópico.

Análise estatística

As médias de temperatura e pH da água dos aquários simulando ambientes permanentes e temporários foram comparadas através do teste U de Mann-Whitney.

Avaliamos cinco variáveis-resposta: 1 - sobrevivência dos indivíduos de *P. cuvieri* até a metamorfose, em porcentagem para não sofrer influência das densidades iniciais; 2 - tempo de desenvolvimento médio (em dias); 3 - tamanho dos jovens recém-metamorfoseados (Comprimento rostro-cloacal - CRC), em mm; 4 - razão da biomassa produzida e 5- proporção de fêmeas metamorfoseando.

Para checar a distribuição normal dos dados realizamos o teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias com o teste de Levene. Transformamos os dados de sobrevivência (%) e porcentagem de fêmeas em arco-seno da raiz quadrada, de tempo até a metamorfose e CRC em logaritmo natural e de razão de biomassa em raiz quadrada, visando normalizar a distribuição e homogeneizar as variâncias dos resíduos (Sokal and Rohlf 1995). Os dados de CRC e proporção de fêmeas não normalizaram, por isso optamos por preencher os dados ausentes de repetições onde não ocorreram sobreviventes utilizando a média do tratamento, que é um procedimento conservativo com a vantagem de manter o desenho original balanceado (Tabachnick and Fidell 1989).

Analisamos os efeitos dos tratamentos (BPA, hidroperíodo e densidade inicial) e suas interações sobre as variáveis-resposta através de análise de variância de três fatores (ANOVA) ($P < 0,05$). Para análise da feminilização realizamos uma análise de variância unifatorial (BPA), uma vez que não havia razão para considerar que a densidade ou o hidroperíodo alterariam a proporção de fêmeas metamorfoseando, o que foi confirmado através de uma anova fatorial prévia comparando apenas os tratamentos sem BPA.

Para as variáveis-resposta sobrevivência até a metamorfose, tempo médio de desenvolvimento e CRC na metamorfose realizamos uma análise de variância multivariada (MANOVA) ($P < 0,05$), para obter um teste ajustado para o erro do tipo I devido às múltiplas ANOVAs. Utilizamos para análises estatísticas o programa SYSTAT versão 12.0.

RESULTADOS

Temperatura e pH

A temperatura ambiente média foi $28,7 \pm 2^\circ\text{C}$, com mínima de 26 e máxima de 32°C . A umidade do ar média foi 80%, com mínima de 56% e máxima de 90%. A temperatura média da água decantada para troca da água dos aquários foi $27,5 \pm 0,7^\circ\text{C}$ e o pH $4,9 \pm 0,1$.

A água dos aquários apresentou valor médio de temperatura $26,2 \pm 0,02^\circ\text{C}$ e de pH $4,9 \pm 0,02$. A média da temperatura em $^\circ\text{C}$ da água foi significativamente maior ($U=199$, $p=0,022$, $N=24$) nos ambientes temporários ($26,239 \pm 0,0018$; mínimo= $26,220$; máximo= $26,290$) do que nos permanentes ($26,227 \pm 0,010$; mínimo= $26,210$; máximo= $26,250$). Mas essa diferença foi em uma escala de temperatura muito pequena, menor do que $0,5^\circ\text{C}$. O pH não diferiu significativamente ($U=290$, $p=0,958$, $N=24$) entre os ambientes permanentes ($4,931 \pm 0,015$; mínimo= $4,890$; máximo= $4,940$) e temporários ($4,927 \pm 0,025$; mínimo= $4,850$; máximo= $4,940$).

Efeito dos Tratamentos

A análise multivariada mostrou que os fatores isolados e suas interações tiveram efeito significativo sobre a sobrevivência até a metamorfose, tamanho na metamorfose e a biomassa produzida, exceto a interação do contaminante com a densidade inicial de girinos (Tabela 1).

Sobrevivência até a metamorfose

Obtivemos 160 sobreviventes (6%), destes 111 (4.2%) atingiram a metamorfose e 49 indivíduos se mantiveram na fase larval até o término do experimento. Os girinos que sobreviveram se mantiveram no estágio 39 (Gosner 1960) até o fim do experimento, com o maior número de larvas remanescentes, 23, na maior concentração (C2), seguida de 19 girinos na concentração baixa e 7 no controle.

Em cinco réplicas não obtivemos sobreviventes, duas do tratamento C1 (0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$)/permanente/densidade alta (C1PD), duas do C1/temporário/densidade alta (C1TD), e uma da concentração C2 (2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$)/permanente/densidade alta (C2PD).

A presença de bisfenol A na água, a densidade inicial dos girinos e o ambiente temporário ou permanente influenciaram significativamente na sobrevivência até a metamorfose dos girinos de *P. cuvieri*, havendo interação entre densidade e ambiente (Tabela 2). A maior sobrevivência ocorreu na ausência de bisfenol A (Tukey, C0xC1: $p=0,001$; C0xC2: $p=0,002$), na baixa densidade e no ambiente temporário (FIGURA 1). O efeito foi maior nos ambientes temporários de baixa densidade (FIGURA 2). A sobrevivência máxima dos indivíduos ocorreu até o décimo dia de experimento, quando a maioria dos girinos ainda estava no estágio 25 e 26, a partir desse marco a mortalidade aumentou nos três tratamentos (C0, C1 e C2), apresentando-se maior no tratamento C1PD e C1TD (FIGURA 3, Tabela 3).

Tempo de desenvolvimento

O experimento ocorreu durante 81 dias, período em que a maioria dos girinos havia alcançado a metamorfose. O tempo mínimo de desenvolvimento individual ocorreu no controle, 19 dias, e o máximo de 80 dias, no C2.

A média geral de tempo de desenvolvimento dos indivíduos durante todo o experimento foi 33 dias. Os girinos que se desenvolveram em ambientes sem BPA (C0) apresentaram menor variação e médias mais baixas de período larvário, exceto em relação aos tratamentos C1 e C2 em ambientes permanentes com densidade baixa (Tabela 2). As diferenças entre os tratamentos não foram significativas (Tabela 3).

Tamanho na metamorfose

Os indivíduos de *P. cuvieri* que chegaram à metamorfose obtiveram a média geral de 8,19 mm de comprimento rostro cloacal, sendo que o menor tamanho individual na metamorfose foi 6,28mm em C1PD, e o maior foi 9,64mm em C0Pd.

A média do tratamento C1PD foi menor do que a dos outros tratamentos (Tabela 2), mas baseada em apenas um girino que metamorfoseou. Este resultado influenciou o resultado da análise, que mostrou a interação entre os três fatores (BPA x ambientes x densidade) altamente significativa (Tabela 4), mas nas comparações a posteriori, apenas as que envolveram o tratamento C1PD foram significativas (Tukey, $p \leq 0,003$).

Biomassa

O peso inicial médio individual dos girinos de *P. cuvieri* foi 0.0044 mg (N=100; s = 0.001).

A biomassa produzida variou entre os tratamentos (Tabela 2). Os fatores tiveram efeitos significativos, mas não apresentaram interação significativa (Tabela 5). O BPA diminuiu a biomassa produzida (FIGURA 4; Tukey, C0xC1:p=0,000, C0xC2:p=0,001), não diferindo em efeito entre as concentrações (FIGURA4;Tukey, C1xC2:p=0,522). A biomassa produzida foi maior nos ambientes temporários e nas baixas densidades (FIGURA 4).

Razão sexual

Na ausência do BPA a razão sexual foi a mais próxima de 50%, em C1 houve uma menor proporção de fêmeas (47%) e em C2, a maior proporção de fêmeas (62%), mas houve grande variação dentro dos tratamentos (FIGURA 5) e essas diferenças não foram significativas (ANOVA: $F_{2,45} = 0,078$, $p = 0,925$). Portanto, em girinos de *P. cuvieri* expostos às concentrações de BPA deste estudo não observamos feminilização.

DISCUSSÃO

Temperatura e pH

Os ambientes temporários e permanentes apresentaram diferenças significativa nas temperaturas, como era esperado. A elevação da temperatura dos ambientes temporários pode influenciar na duração da metamorfose dos anfíbios anuros, levando os indivíduos a metamorfosearem mais rapidamente (Leips *et al.* 2000).

No entanto, a diferença de temperatura foi muito pequena para ter afetado o desenvolvimento. De qualquer modo, o nosso desenho experimental não pretendia diferenciar efeitos de temperatura de outros efeitos esperados em ambientes temporários, como a diminuição do espaço e o estresse.

O pH obtido nos aquários deste experimento está abaixo da faixa de variação encontrada por Leal (2007) de 5,56 a 8,77, que foram medidas em poças naturais localizadas em áreas abertas do município de São Luís, onde *P. cuvieri* se reproduz. O valor do pH da água pode influenciar no comportamento do contaminante, pois o BPA possui valor de pKa elevado indicando ser um ácido muito fraco, mas apesar da ionização dessa substância ocorrer em pH básico, não é improvável que seja sensível à ionização em níveis ambientais de pH igual a 7 ou menor (Cousins *et al.* 2002), como o observado no presente experimento.

Sobrevivência até a metamorfose

Alguns experimentos com anfíbios anuros demonstram aumento da mortalidade quando associados à presença do BPA (Kloas *et al.* 1999; Iwamuro *et al.* 2003; Levy *et al.* 2004; Goto *et al.* 2006; Ohnuma *et al.* 2006; Fini *et al.* 2007).

Obtivemos neste experimento 6% de sobreviventes nos tratamentos controle (C0), o que está de acordo com a taxa de sobrevivência de populações naturais dos girinos que é em torno de 5%, devido às diversas pressões seletivas que sofrem durante seu desenvolvimento larvário nos ambientes naturais (Semlitsch 1987).

Levy e colaboradores (2004) em experimentos com *Xenopus laevis* observaram que em tanques contendo 40 girinos, em concentrações de 2,3, 23 e 230 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BPA, a mortalidade foi em torno de 10 a 20%. No entanto, nossos resultados evidenciam 96% de mortalidade para *P. cuvieri* em tratamento com BPA. Mesmo nos tratamentos com baixa densidade, a mortalidade foi elevada, e a maior concentração utilizada neste trabalho foi similar à menor utilizada por Levy *et al.* (2004). Em outro estudo, Koponen e Kukkonen (2002) também observaram diminuição da sobrevivência (10% de mortalidade) de larvas de *Rana temporaria* dispostas em pratos pyrex, com 30 indivíduos por prato, contendo concentrações de BPA bem mais elevadas (1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$) do que as testadas no nosso trabalho. A diferença na taxa de mortalidade observada pode ter ocorrido devido às diferenças ecológicas dessas espécies, *X. laevis* e *R. temporaria* são espécies filtradoras enquanto *P. cuvieri* é uma espécie raspadora. Como a maior concentração de BPA é encontrada nos sedimentos (FDA 2008), é esperado que esse contaminante possa afetar mais as espécies que vivem no fundo dos corpos d'água, como *P. cuvieri*.

No entanto, é importante avaliar a resposta de espécies ecologicamente distintas e de regiões geográficas diferentes ao BPA, como essas duas espécies.

O maior número de metamorfos nos ambientes temporários pode ser explicado pela adaptação dessa espécie a esses ambientes, que apresentam risco de dessecação. Girinos que se desenvolvem em lagoas temporárias devem ajustar o desenvolvimento em resposta ao hidroperíodo, garantindo a sobrevivência e realização da metamorfose rapidamente (Leips *et al.* 2000).

O resultado obtido neste estudo é semelhante ao observado por Ferreira (2011), onde a mortalidade foi maior nos tratamentos com alta densidade, devido possivelmente à competição intraespecífica, principalmente por espaço, o que leva ao aumento do estresse. No entanto, o experimento apresentou alta mortalidade nos primeiros dez dias, independente dos tratamentos, o que provavelmente ocorre também em condições naturais.

Tempo de desenvolvimento

O tempo médio de desenvolvimento de *P. cuvieri* é 45 dias (Barreto and Andrade 1995), no entanto neste estudo o tempo de desenvolvimento foi menor. Nos ambientes experimentais, mesmo na ausência de predadores, a baixa densidade e a temperatura podem ter contribuído para a diminuição da média geral do período larvário.

Pickford *et al.* (2003) nos seus experimentos com larvas de *X. laevis* expostas ao BPA (concentrações 10, 23, 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) também não obtiveram diferenças significativas no tempo de metamorfose, quando comparados ao controle.

Era esperado que o ambiente temporário interferisse no tempo da metamorfose fazendo com que os girinos metamorfoseassem mais rápido pela diminuição da área e consequente aumento da densidade populacional, reduzindo assim o risco de morte por dessecação e a competição (Wilbur and Collins 1973). Ao contrário do esperado, em alguns ambientes permanentes de baixa densidade o desenvolvimento larvário foi mais curto. Talvez o início da

secagem dos aquários após o período de maior mortalidade das larvas tenha influenciado esse resultado, diminuindo os efeitos de densidade esperados. No entanto, Maciel and Juncá (2009) observaram em experimentos com baixa densidade de girinos de *Pleurodema diplolister*, também pertencente a família Leiuperidae, que a redução do volume de água, em 26°C, não influenciou no tempo de metamorfose dos indivíduos, assim como o resultado obtido no nosso estudo.

Por outro lado, como a água foi mantida no nível mínimo nos aquários temporários, foi possível que os girinos se mantivessem por mais tempo no estágio larval.

Tamanho na metamorfose

Andrade (1995) observou que o aumento da densidade de girinos de *P. cuvieri* causou diminuição da sobrevivência e biomassa das populações em poças artificiais, assim como diminuição do tamanho dos metamorfos.

Pickford *et al.* (2003) nos seus experimentos com larvas de *X. laevis* expostas ao BPA (concentrações 10, 23, 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) não obtiveram diferenças significativas no CRC.

Embora a presença do contaminante nas concentrações testadas tenha mostrado um efeito significativo sobre *P. cuvieri*, com diminuição do tamanho no tratamento C1PD, esse resultado é questionável, pois resulta de um único metamorfo, podendo se tratar de uma variação individual. No geral, a maior concentração de BPA tende a levar a um maior CRC dos metamorfoseados, sendo possível que o bisfenol A cause ação desregulatória endócrina sobre esses organismos. Levy *et al.* (2004) demonstraram aumento do tamanho e peso corporal dos indivíduos *X. laevis* nas 3 concentrações de BPA testadas (2,3, 23 e 230 $\mu\text{g L}^{-1}$), com uma tendência de pesos maiores na concentração mais baixa, que é semelhante a usada no nosso estudo.

A relação dose resposta é um tema ainda discutível (Fontenele *et al.* 2010). São necessários outros experimentos, com mais repetições e utilizando uma variação maior de concentrações de BPA, para esclarecer melhor esta questão.

Biomassa

Os resultados mostraram que o BPA afeta negativamente a biomassa produzida, como era esperado. Esse resultado está associado diretamente à maior sobrevivência, uma vez que não houve variação no tamanho dos metamorfos. A biomassa foi maior nos ambientes temporários e também nas baixas densidades iniciais. Andrade (1995) também constatou em poças artificiais a diminuição de biomassa em altas densidades de girinos de *P. cuvieri*.

Razão sexual

Kloas *et al.* (1999) mostraram em experimentos com *Xenopus laevis* um aumento significativo do número de fêmeas na maior concentração de BPA ($23 \mu\text{g L}^{-1}$) quando comparada ao controle. Pickford *et al.* (2003), em experimentos com larvas dessa mesma espécie expostas ao BPA (concentrações 10, 23, 100 e $500 \mu\text{g L}^{-1}$), não obtiveram diferenças significativas na razão sexual (50:50). Levy *et al.* (2004) realizaram dois experimentos, também com larvas de *X. laevis* expostas a BPA, e observaram diferenças significativas na razão sexual em concentrações de $23 \mu\text{g L}^{-1}$, com maior proporção de fêmeas em ambos experimentos (69% e 70%, respectivamente). Os diferentes resultados desses autores podem ter ocorrido pelas diferenças no desenho experimental dos estudos (FDA 2008), com regimes de exposição semi-estático, renovação periódica da solução de BPA (Levy *et al.* 2004; Kloas *et al.* 1999) e com sistema de fluxo contínuo das diluições contendo BPA durante todo o experimento (Pickford *et al.* 2003).

No entanto, a concentração testada em todos esses estudos foi muito maior do que as utilizadas no presente estudo, onde não evidenciamos efeito do BPA na razão sexual de *P. cuvieri*, quando presente na concentração de 0,005 e de 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Diferentes espécies podem apresentar diferentes respostas aos contaminantes ambientais, mas é necessário testar as mesmas concentrações para avaliar se o efeito é o mesmo ou não.

O BPA é um estrógeno não estereóide que interfere na ligação 17 β -estradiol ao seu receptor nos tecidos-alvo. Os esteróides sexuais agem nos primeiros estágios da metamorfose, na formação e diferenciação das gônadas, e a presença de um mimetizador do estrogênio nessa fase pode causar mudança de sexo (Goto *et al.* 2006; Hogan *et al.* 2008; Mackenzie *et al.* 2003; Park and Kidd 2005), no entanto essa modificação depende da dose desse xenoestrogênio presente na água.

Nosso estudo apresentou resultados semelhantes aos de Ferreira (2011) que testou as mesmas concentrações deste estudo para etinilestradiol em *P. cuvieri*, que assim como o BPA, pode causar mudança no sexo dos indivíduos, no entanto não houve mudança na razão sexual dos metamorfos. A explicação para esse resultado, assim como o do nosso estudo, foi que as concentrações a que os girinos foram submetidos não foram suficientes para causar feminilização e mudanças na razão sexual.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo permite concluir que a presença do contaminante juntamente com a alta densidade e o hidroperíodo das lagoas podem influenciar negativamente na sobrevivência dos girinos e na biomassa produzida de *P. cuvieri*. No entanto, o tempo até a metamorfose, o tamanho dos metamorfos e a razão sexual não foram afetados, havendo a necessidade de mais estudos para testar maiores variações de concentração de BPA e para avaliar o efeito em espécies ecologicamente distintas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação para o Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos recursos disponibilizados ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão; ao Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) por nos fornecer a licença para coleta e ao Comitê de Ética no Uso de Animais pela aprovação do projeto; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro (CNPq/Casadinho 620163/2008 9; CNPq/SISBIOTA 563075/2010-4) e bolsa concedida à GVA (CNPq); à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP/SISBIOTA 10/52321-7), pelo apoio financeiro; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA) pela bolsa de auxílio técnico concedida e pelo auxílio para publicação deste artigo.

LITERATURA CITADA

- Alexander, H.C., Dill, D. C., Smith, L.W., Guiney, P. D. and Dorn, P. 1988. Bisphenol-A: Acute aquatic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* **7**: 19-26.
- Andrade, G.V. 1995. A história de vida de *Physalaemus Cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) em um ambiente temporário. Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Estadual de Campinas, Tese de Doutorado.
- Barreto, L. N.; Andrade, G. V. 1995. Aspects of the Reproductive Biology of *Physalaemus cuvieri* (Anura:Leptodactylidae) in northeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*, **16**: 67-76.
- Blaustein, J. D., Tetel, M. J., Meredith, J. M. 1995. Neurobiological regulation of hormonal response by progestin and estrogen receptors. Neurobiological effects of sex steroid hormones. Micevych P.E., Hammer R.P.J., editors. Cambridge: Cambridge University Press:324 – 349.

- Boone, M.D. and Semlitsch R. D. 2002. Interaction of an insecticide with competition and pond drying in amphibian communities. *Ecol. Appl.* **12**: 307 -316.
- Cousins, I.T., Staples C. A., Klečka G. M., Mackay D. 2002. A multimedia assessment of the environmental fate of bisphenol A. *Human and Ecological Risk Assessment (HERA)*. **8**: 1107-1136.
- Duarte, P. A. F. 2008. Novos poluentes: Principais impactos de compostos desreguladores endócrinos na saúde pública. Dissertação de Mestrado da Universidade Nova de Lisboa, Portugal.
- FDA - Food and Drug Administration. 2008. Draft Screening Assessment for Phenol, 4,4'-(1-methylethylidene)bis- (80-05-7). Disponível em:
http://www.ewg.org/files/BPA_091208.pdf Acesso em: 2 de abril de 2012.
- Fenske, M., Maack, G., Schäfers, C. and Segner, H. 2005. An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*. *Environmental Toxicology and chemistry* **24**: 1088-1098.
- Ferreira, A. P. 2011. Interações entre estressores naturais e etinilestradiol no desenvolvimento larval de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae). Dissertação de mestrado da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil.
- Filho, R. W. R., Luvizotto-Santos, R., Vieira, E. M. 2007 Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, **2**: 283-288.
- Fini, J. B., Le Mevel, S., Turque, N., Palmier, K., Zalko, D., Cravedi, J. P. & Demeneix, B. 2007 An in vivo multiwell- based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environ. Sci. Technol.* **41**: 5908–5914.

- Fontenele, E. P.; Martins, M. A.; Quidute, A. R. P. e Montenegro Junior, R. M. 2010. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. *Arq Bras Endocrinol Metab*, **54**: 6-16.
- Furuya, M., Adachi, K., Kuwahara, S., Ogawa, K. and Tsukamoto, Y. 2006. Inhibition of male chick phenotypes and spermatogenesis by Bisphenol-A. *Life Sciences*, **78**: 1767-1776.
- Gardner, T. 2001. Declining amphibian populations: a global phenomenon in conservation biology. *Animal Biodiversity and Conservation*. **24**: 25–44.
- Gascon, C., Collins; J. P., Moore; R. D., Church; D. R., McKay; J. E. and Mendelson, J. R. 2007. Amphibian Conservation Action Plan. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Ghisselli, G.; Jardim, W. F. 2007. Interferentes endócrinos no ambiente. *Quim. Nova*, **30**: 695-706.
- Gosner, K. L. 1960. A simplified table for tagging anurans embryos and larvae with notes on identification. *Herpetol*, **16**: 183-190.
- Goto, Y., Kitamura, S., Kashiwagi, K., Oofusa, K., Tooi, O., Yoshizato, K., Sato, J., Ohta, S., Kashiwagi, A. 2006. Suppression of amphibian metamorphosis by bisphenol A and related chemical substances. *J Health Sci*, **52**:160-168.
- Haddad, C.F.B.; Prado, C. P. A. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *Bioscience*, **55**:207–217.
- Hogan, A.N.S., Duarte, P., Wadeb, M.G., Lean, D.R.S., Trudeau, V.L. 2008. Estrogenic exposure affects metamorphosis and alters sex ratios in the northern leopard frog (*Rana*

pipiens): Identifying critically vulnerable periods of development. Gen Comp Endocrinol, **156**: 515-523.

IUCN. Conservation International and Nature serve. 2010. Global Amphibian Assentment: eletronic database. Disponível em: <http://www.globalamphibians.org>. Acesso em 10 de maio de 2010.

Iwamuro, S., Sakakibara, M., Terao, M., Ozawa, A., Kurobe, C., Shigeura, T., Kato, M., Kikuyama, S. 2003. Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*. Gen Comp Endocrinol, **133**:189–198.

John, K. R. and D. Fenster. 1975. The effects of partitions on the growth rate of crowded *Rana pipiens* tadpoles. Am. Midl. Nat., **93**: 123-130.

Johnson, I., Weeks, J. M. and Kille, P. 2005. Endocrine Disruption in Aquatic and Terrestrial Invertebrates – Final Report. WRc-NSF Ltd, Report No UC 4906/6 for the Department of the Environment, Food and Rural Affairs.

Kloas, Werner; Lutz, Ilka and Einspanier. 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. The Science of The Total Environment, **225** :59-68.

Koponen, P. S. and Kukkonen, J, V. K. 2002. Effectes of bisphenol A and artificial UVB radiation on the early development of *Rana temporaria*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part. A. **65**: 947 – 959.

Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L., Feldman, D. 1993 Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonateflasks during autoclaving. Endocrinology, **132**: 2279-86.

- Leal, C. B. 2007. Efeitos da alteração da quantidade de alimento no crescimento e desenvolvimento de girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae). Dissertação de mestrado do Programa de pós-graduação de Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão.
- Leips, J., McManus, M. G., Travis, J. 2000. Response of treefrog larvae to drying ponds: Comparing Temporary and Permanent Pond Breeders. *Ecology*, **81**: 2997-3008.
- Levy, G.; Lutz, I.; Krüger, A.; Kloas, W. 2004. Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environ Res* **94**:102-111.
- Maciel, T. A. and Juncá, F. A. 2009. Effects of temperature and volume of water on the growth and development of tadpoles of *Pleurodema dipolister* and *Rhinella granulose* (Amphibia: Anura). *Zoologia*, **26**: 413–418.
- Mackenzie, C.A., Berrill, M., Metcalfe, C., Pauli, B.D. 2003. Gonadal differentiation in frogs exposed to estrogenic and antiestrogenic compounds. *Environ Toxicol Chem*, **22**: 2466-2475.
- Marcantonio, A. S. 2005. Toxicidade do Sulfato de cobre e do sulfato de zinco para a Rã-touto *Rana catesbeiana* Shaw, 1802: Toxicidade aguda e crônica. Tese de doutorado programa de pós- graduação em Aqüicultura de Águas Continentais, Jaboticabal, São Paulo.
- Newman, R. A. 1994. Genetic variation for phenotypic plasticity in the larval life history of spadefoot toads (*Scaphiopus couchii*). *Evolution*, **48**: 1773–1785.
- NTP, National Toxicology Program (US). 2007. NTP-CERHR Expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol-A. Research Triangle Park (NC):

US Department of Health and Human Services, Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction, National Toxicology Program.

Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Bachmann J, Oetken M, Lutz I, Kloas W. 2006. Bisphenol A induces super-feminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda: Prosobranchia) at environmentally relevant concentrations. *Environ Health Perspect*, **114**:127–133.

Ohnuma, A., Conlon, J. M., Kawasaki, H. & Iwamuro, S. 2006. Developmental and triiodothyronine-induced expression of genes encoding preprotemporins in the skin of Tago's brown frog *Rana tagoi*. *Gen. Comp. Endocrinol*, **146**: 242–250.

Park, B. J. and Kidd, K. A. 2005. Effects of the synthetic estrogen ethynylestradiol on early life states of mink frogs and green frogs in the wild and *in situ*. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**: 2027-2036.

Pickford, D. B., Hetheridge, M. J., Caunter, J. E., Hall, A. T., Hutchinson, T. H. 2003. Assessing chronic toxicity of bisphenol A to larvae of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) in a flow-through exposure system. *Chemosphere* **53**: 223–235.

Raimundo, C. C. M. 2007. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia. Dissertação de mestrado da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

Rogers, T. N.; Chalcraft, David. R. 2008. Pond hydroperiod alters the effect of density-dependent processes on larval anurans. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **65**: 2761-2768

- Sanchez, D. C. O. 2006. Desreguladores endócrinos na indução da vitelogenina em peixes nativos. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná.
- Santamarta, J. 2001. A ameaça dos disruptores endócrinos. Revista Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável, Porto Alegre, **2**: 18-29.
- Semlitsch , R.D. 1987. Relationship of pond drying to the reproductive success of salamander *Anlbystoma talpoidrum*. Copeia, **1987**: 61-69.
- Sodré, F.F., Montagner, C.C., Logatelli, M.A.F., Jardim, W.F. 2007. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil). J Braz Soc Ecotoxicol **2**:187-196.
- Sokal, R. R. and Rohlf, F. J. 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3rd edition. W. H. Freeman, New York.
- Steinwascher, K. 1979. Interference and exploitation competition among tadpoles of *Rana utricularia*. Ecology **59**: 1039 -1046.
- Wilbur, H. M., J. P. Collins. 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis. Science, **182**:1305-1314.

Tabela 1. MANOVA dos efeitos dos fatores BPA (ausente, C1=0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$ e C2 =2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), tipo de ambiente (temporário e permanente) e densidade inicial (alta e baixa) sobre a sobrevivência até a metamorfose (arcsen V%), razão de biomassa produzida (V) e comprimento rostro-cloacal na metamorfose (ln) dos girinos de *Physalaemus cuvieri* em aquários.

Efeito	Wilks'λ	F	gl	p
BPA	0,399	6.605	6, 68	<0,001
Ambiente	0.585	8.052	3, 34	<0,001
Densidade	0.117	85.367	3, 34	<0,001
BPA*Ambiente	0.677	2.445	6, 68	0,034
BPA*Densidade	0.777	1.524	6, 68	0,184
Ambiente*Densidade	0.651	6.071	3, 34	0,002
BPA* Ambiente*Densidade	0.506	4.598	6, 68	0,001

Tabela 2. ANOVA dos efeitos de BPA (ausente, 0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$ ou 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), densidade inicial alta ou baixa e ambientes permanentes ou temporários sobre a porcentagem de girinos de *Physalaemus cuvieri* que alcançaram a metamorfose (transformada em arcseno V% metamorfos).

Fatores	SQ	gl	QM	F	p
BPA	0.240	2	0.120	10.029	<0.0001
Ambientes	0.156	1	0.156	13.038	0.001
Densidade	2.984	1	2.984	249.615	<0.0001
Ambientes*BPA	0.010	2	0.005	0.432	0.652
Densidade*BPA	0.071	2	0.036	2.988	0.063
Densidade*Ambientes	0.057	1	0.057	4.734	0.036
Densidade*Ambientes*BPA	0.003	2	0.001	0.119	0.888
Erro	0.430	36	0.012	10.029	

Tabela 3. Resposta de *Physalaemus cuvieri* aos tratamentos concentração de BPA

(C0=ausente, C1=0.005 $\mu\text{g L}^{-1}$, C2=2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$), ambientes permanentes (P) ou temporários (T) e densidade inicial de girinos baixa (d) ou alta (D). Os dados de cada tratamento são as médias seguidas do desvio padrão.

Tratamentos	N	Porcentagem metamorfos	Porcentagem de girinos remanescentes	Tempo até metamorfose (d)	CRC na metamorfose (mm)	Razão de Biomassa Produzida
C0Pd	4	41 ± 5	2.5 ± 5	30.5 ± 3.5	8.0 ± 0.9	5.5 ± 2.3
C0PD	4	1.7 ± 0.5	0.2 ± 0.5	34.0 ± 4.6	8.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1
C0Td	4	35 ± 30	5 ± 8.3	32.1 ± 7.0	8.5 ± 0.4	8.9 ± 2.8
C0TD	4	2.2 ± 1.4	0.4 ± 0.9	33.4 ± 9.9	8.3 ± 0.5	0.4 ± 0.2
C1Pd	4	20 ± 14	10 ± 8.1	29.2 ± 4.1	8.1 ± 0.8	2.9 ± 2.1
C1PD	4	0.3 ± 0.5	0.8 ± 0.9	41.0 ± 0	6.2 ± 0	7.1 ± 1.1
C1Td	4	35 ± 12	20 ± 11	37.5 ± 5.3	7.6 ± 0.2	4.1 ± 1.6
C1TD	4	0.3 ± 0.5	1 ± 2	35.0 ± 0	8.8 ± 0	0.03 ± 0
C2Pd	4	15 ± 5	5 ± 5	28.7 ± 6.9	8.5 ± 0.6	2.3 ± 0.6
C2PD	4	0.5 ± 0.5	0.5 ± 1	37.5 ± 12.0	8.5 ± 0.1	0.07 ± 0.08
C2Td	4	32 ± 9	12 ± 9	38.3 ± 7.4	8.1 ± 0.2	4.4 ± 1.5
C2TD	4	3 ± 2	3 ± 1	37.2 ± 11.3	8.5 ± 0.4	0.5 ± 0.4

Tabela 4. ANOVA dos efeitos de BPA (ausente, 0.005 $\mu\text{g L}^{-1}$ ou 2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$), densidade inicial alta ou baixa e ambientes permanentes ou temporários sobre o tempo médio até a metamorfose de girinos de *Physalaemus cuvieri* (transformado em logaritmo natural do tempo até a metamorfose).

Fatores	SQ	gl	QM	F	p
BPA	0,058	2	0,029	0,607	0,552
Ambientes	0,028	1	0,028	0,591	0,449
Densidade	0,081	1	0,081	1,718	0,201
Ambientes*BPA	0,035	2	0,017	0,367	0,696
Densidade*BPA	0,007	2	0,004	0,076	0,927
Densidade*Ambientes	0,133	1	0,133	2,798	0,106
Densidade*Ambientes*BPA	0,041	2	0,021	0,435	0,652
Erro	1,280	27	0,047		

Tabela 5. ANOVA dos efeitos de BPA (ausente, 0.005 $\mu\text{g L}^{-1}$ ou 2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$), densidade inicial alta ou baixa e ambientes permanentes ou temporários sobre o tamanho médio dos metamorfoseados de *Physalaemus cuvieri* (transformado em logaritmo natural do comprimento rostro cloacal dos metamorfos).

Fatores	SQ	gl	QM	F	p
BPA	0,077	2	0,038	10,006	<0,0001
Ambientes	0,037	1	0,037	9,734	0,004
Densidade	0.001	1	0.001	0.312	0.580
Ambientes*BPA	0.052	2	0.026	6.724	0.003
Densidade*BPA	0.014	2	0.007	1.778	0.184
Densidade*Ambientes	0.048	1	0,048	12,525	0,001
Densidade*Ambientes*BPA	0,114	2	0,057	14,839	<0,0001
Erro	0,138	36	0,004		

Tabela 6. ANOVA dos efeitos de BPA (ausente, 0.005 $\mu\text{g L}^{-1}$ ou 2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$), densidade inicial alta ou baixa e ambientes permanentes ou temporários sobre a biomassa produzida de *Physalaemus cuvieri* (transformada em raiz quadrada da biomassa produzida).

Fatores	SQ	gl	QM	F	p
BPA	3,643	2	1,822	13,359	<0,0001
Ambientes	1,635	1	1,635	11,993	0,001
Densidade	35,949	1	35,949	263,639	<0,0001
Ambientes*BPA	0,191	2	0,096	0,701	0,503
Densidade*BPA	0,871	2	0,436	3,196	0,053
Densidade*Ambientes	0,350	1	0,350	2,568	0,118
Densidade*Ambientes*BPA	0,059	2	0,030	0,218	0,805
Erro	4,909	36	0,136		

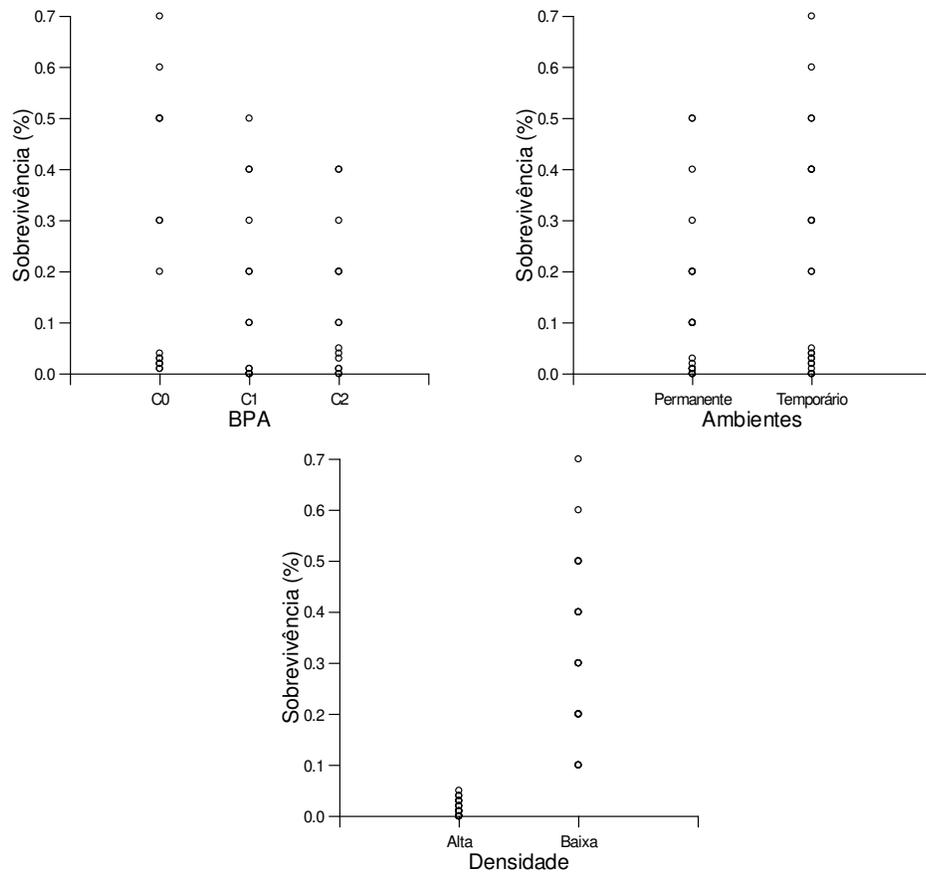


FIGURA 1. Efeito das concentrações de BPA, dos ambientes permanentes ou temporários e da densidade inicial de girinos de *Physalaemus cuvieri* na sobrevivência até a metamorfose (%). C0 (0 $\mu\text{g L}^{-1}$), C1 (0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$) e C2 (2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$).

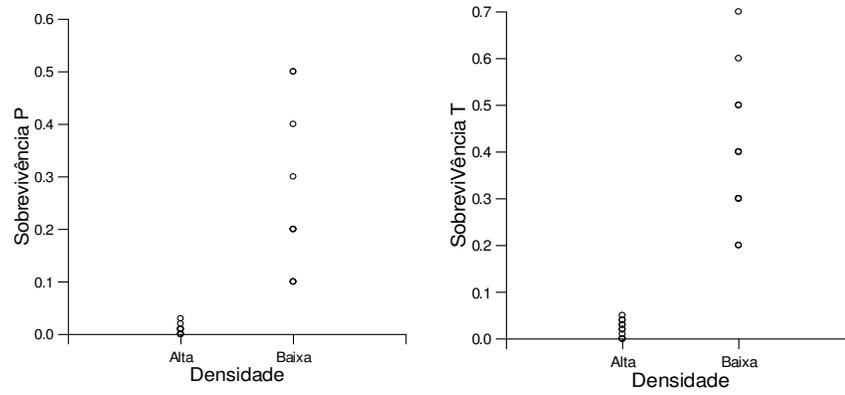


FIG 2. Efeito da interação dos ambientes permanentes (P) ou temporários (T) e da densidade inicial de girinos de *Physalaemus cuvieri* na sobrevivência (%) até a metamorfose.

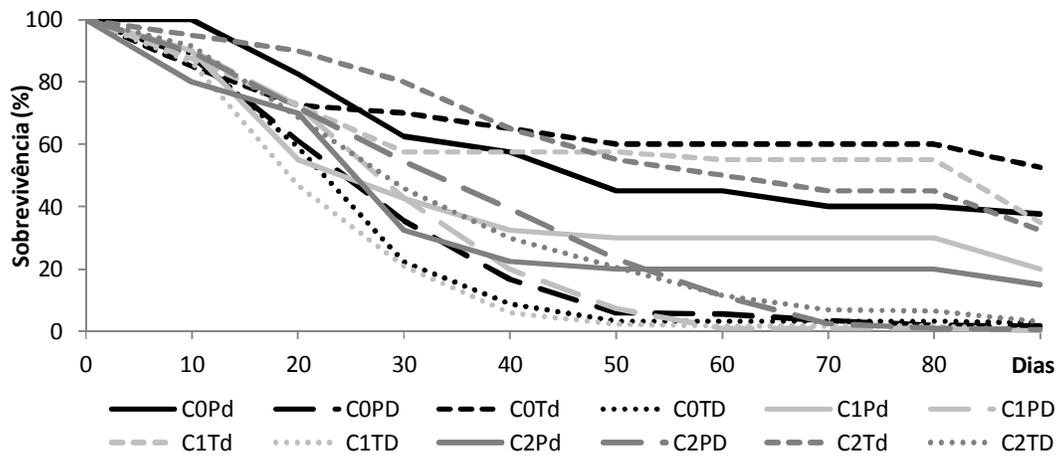


FIGURA 3. Sobrevivência dos indivíduos de *Physalaemus cuvieri* nos tratamentos com BPA ao longo do tempo (dias). (C0=ausente, C1=0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$, C2=2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), ambientes permanentes (P) ou temporários (T) e densidade inicial de girinos baixa (d) ou alta (D).

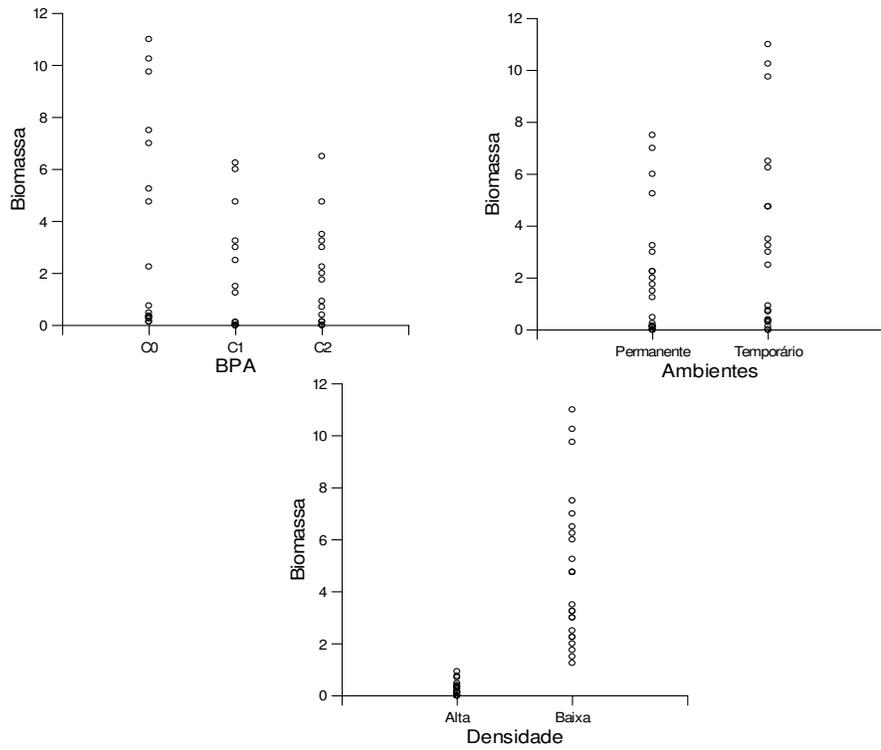


FIGURA 4. Efeito das concentrações de BPA, dos ambientes permanentes ou temporários e da densidade inicial de girinos de *Physalaemus cuvieri* sobre a biomassa produzida (g). C0 ($0 \mu\text{g L}^{-1}$), C1 ($0,005 \mu\text{g L}^{-1}$) e C2 ($2,5 \mu\text{g L}^{-1}$).

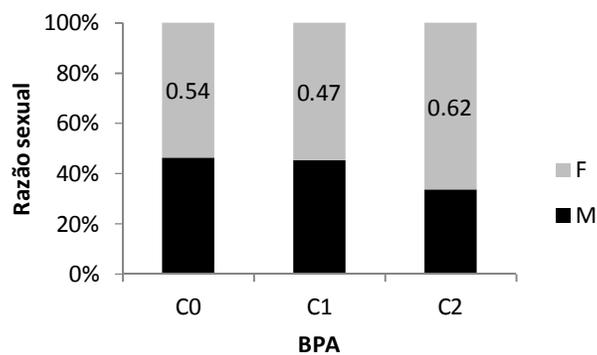
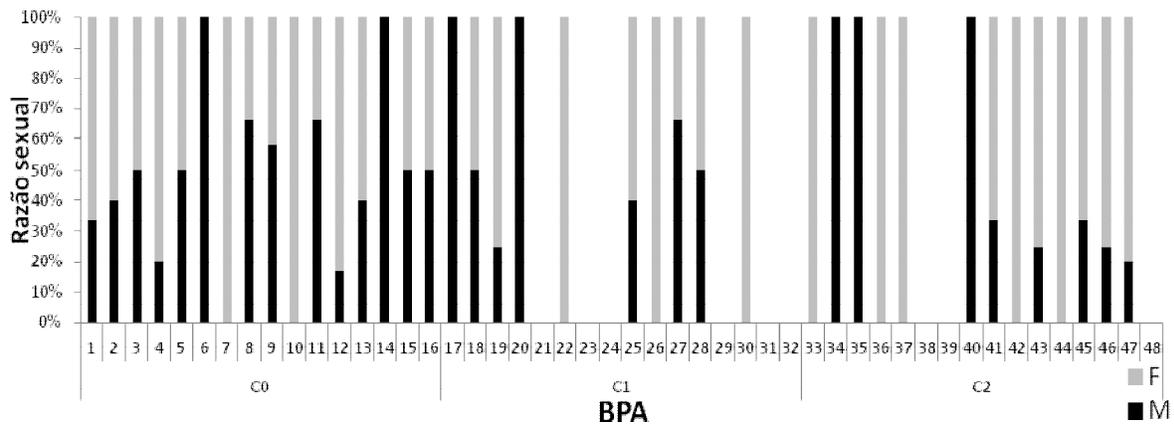


FIGURA 5. Efeito das concentrações de BPA sobre a razão sexual dos indivíduos metamorfoseados de *Physalaemus cuvieri*. C0 ($0 \mu\text{g L}^{-1}$), C1 ($0,005 \mu\text{g L}^{-1}$) e C2 ($2,5 \mu\text{g L}^{-1}$).

F = fêmea e M = macho.

NORMAS DA REVISTA

Instructions for Authors

Ecology, Ecological Applications, Ecological Monographs

Submission Instructions:

- [Specify journal and manuscript type](#)
- [Requirements for submission](#)
 - [Original submission](#)
 - [Resubmission policy](#)
 - [ESA's code of ethics](#)
 - [Data Policy](#)
 - [Include computer code](#)
 - [Help for authors whose native language is not English](#)
 - [Agreement to pay page charges](#)

[Formatting your manuscript](#)

- [Minimum formatting requirements](#)
- [Allowable file formats](#)
- [Importance of Concision and Use of Ecological Archives](#)

[The Mechanics](#)

- [EcoTrack](#)
- [Author profiles](#)
- [The submission process](#)
- [Checking the manuscript status](#)
- [Manuscript correspondence](#)
- [Getting help](#)

[Instructions for Authors of Accepted Manuscripts](#)

- [Preparation of the final manuscript](#)
- [Processing - What to expect](#)
- [Preprints](#)
- [Reprints](#)
- [Availability of data](#)
- [Transfer of copyright](#)
- [Permission to use previously published material](#)
- [Advance publicity: ESA's embargo policy](#)

Submission Instructions:

Specify journal and manuscript type

Click on the journal title in the table below for information on the mission and scope of each journal. Specify the manuscript type. Check the length limits for each type by clicking on the links. **Note particularly that length limits for *Ecology* have become more stringent. Too many manuscripts submitted to *Ecology* are rejected without review for being overly long. Length limits include the entire manuscript meant for ink (including Literature Cited, tables and figures).**

<i>Ecology</i>	<i>Ecological Applications</i>	<i>Ecological Monographs</i>
Article	Article	Article
Report	Communication	
Note		
Concepts		Concepts
		Review
Comment/Reply	Letter to the Editor	
Data Paper		
Perspectives		

Requirements for submission

Original submission. Provide information describing the extent to which data or text in the manuscript have been used in other works that are published, in press, submitted, or soon to be submitted elsewhere.

Resubmission policy. If the manuscript (or a previous version of the manuscript) has been previously submitted to the same or another ESA journal, provide the previous

manuscript number; explain how the current version differs from the previously submitted version and why it should be considered now for this journal. There are no guarantees it will be reviewed by the newly targeted journal.

ESA Code of Ethics. Authors must adhere to the ESA Code of Ethics.

Data Policy. The editors and publisher expect authors to make the data underlying published articles available. Authors of manuscripts submitted to *Ecological Monographs* as of January 1, 2011 are required to adhere to the new [Data Policy](#).

Include computer code. Authors must disclose software and statistical procedures used in the manuscript and provide any novel computer code used for models, simulations, or statistical analyses.

English. Authors whose native language is not English are encouraged to enlist the aid of a native English-speaking colleague to go over the manuscript for correct usage and clarity prior to submission. You may also search the [ESA Author Help Directory](#) to find a volunteer. No guarantees are associated with the use of this volunteer database.

Agreement to pay page charges. Authors must agree to pay page charges, or must obtain an ESA page-charge grant. Page charges will only be incurred for manuscripts accepted for publication.

Formatting your manuscript: Minimum formatting requirements

Consult recent issues for examples of journal style. For purposes of review, submitted manuscripts need not adhere to journal style in every detail; however, preparation of final revisions of manuscripts accepted for publication will be easier if [ESA style](#) is followed from the outset. But be sure to abide by the following minimum formatting requirements for submitted manuscripts:

* The entire manuscript must be double-spaced (text, quotations, figure legends, literature cited) at three lines per inch (12 lines/10 cm) with a 12-point font, Times New Roman. Choose the "double-spacing" option for line spacing. Leave a 1 inch (2.54-cm) margin on all sides of each page. Page size should be Letter 8 ½" by 11". Do not justify the right margin.

* Assemble the parts of the manuscript in this order: title page, abstract, key words, text, acknowledgments, literature cited, tables (one table per page), figure legends (on separate page preceding the first figure), figures (one figure per page; label each figure, i.e., Figure 1, Figure 2, etc.). Appendices for *Ecological Archives* should be in a separate file.

* Number all pages (including tables, and figures), starting with the title page.

* All pages of text should have line numbers as well.

Allowable file formats:

- **Manuscript files** in Word (.doc or .docx), WordPerfect (.wpd), Rich-text format (.rtf) or LaTeX (.TEX) format. (See [ESA-LaTeX](#) for some tips on getting your TEX document to conform to ESA style.)
- **Tables** in doc, xls, tds, or csv format (or Tables may be included in the manuscript file)
- **Figures/Images** in doc, jpeg, tif, gif, eps, ps, or ppt format (or Figures may be included in the manuscript file)
- **Appendices** for Ecological Archives in doc or html format. Video appendices in mpeg format.
- **Supplements** for Ecological Archives can include, but are not limited to, original and derived data sets, source code for simulation models, and details of and software for unusual statistical analyses.

Appendices and Supplements for Ecological Archives should be in files separate from the article (and not merged with the article file). Zipped files can be submitted for appendices and supplements if necessary. In that case, choose Zipped File as the file type, so that the system does not attempt a pdf conversion.

Tables and figures may be in a separate file or in one file together with the manuscript text. If figures are in a separate file, please provide a separate file with all the figure legends (or include it in the manuscript file). It is not necessary to provide a figure caption on the screen when uploading your figures. (Please be aware that a lower resolution figure may look fine on a computer screen, but that does not mean it will look good if a reviewer or editor prints it out.)

Ecological Archives. Authors should strive to make their manuscripts as concise as possible with the judicious use of *Ecological Archives*. [[Other tips to make your manuscript more concise.](#)]

Designate material for digital appendices or supplements in [Ecological Archives](#). Upload the appendices and supplements in Word or HTML in a file or files separate from the manuscript. Not until the manuscript is accepted do we require HTML formatting of appendices from you. Please see [Ecological Archives](#) for additional information and to view examples of digital appendices.

The Mechanics: Once your manuscript is ready:

Log-in to *EcoTrack* to submit your manuscript.

If you don't know your password, see if you are already in our database by clicking on "Unknown/Forgotten password" to enter your name. Even if you have never registered, you might still be in there. Verify that we have your correct e-mail address, and your login name and password will be e-mailed to you within minutes. If the e-mail address shown is not current, please notify esa_pubs@cornell.edu and you will be provided with login information. If you get a message that there is more than one entry for your name in the database, you can put in your e-mail address. If you are not in the database, you will then be offered the option to register as a new author. Please do not register as a new author if you are already in the database. Do not share your login information with others (such as co-authors) as this could violate your confidentiality.

Author profiles. Authors are responsible for modifying their profile to keep the editors and staff informed of changes in their contact information. The corresponding author will be notified of receipt of the manuscript. Before submitting a manuscript, please be sure your profile information is current. (Click "modify profile" from your homepage.) Please notify your co-authors to update theirs as well. Do not put in a co-author's email address (or that of another colleague) as your secondary email address. It is all right to put in an assistant's email address as your secondary email, so long as that person is not going to ever co-author a manuscript, review a manuscript, or serve as an editor.

The submission process

You can save and exit at any time during the process, and come back later to where you left off. The manuscript submission process is broken into a series of 5 screens that gather detailed information about your manuscript and allow you to upload the pertinent files. The sequence of screens are as follows:

1. A long form asking for author information, title, abstract, key words, [journal](#), [manuscript type](#), [adherence to ESA policies](#), and file quantities. You can paste in the title and abstract from your manuscript. You may indicate your suggestions for Subject-matter Editor, who oversees your manuscript during the peer review process. In addition, authors are invited to suggest names of individuals who might be appropriate peer reviewers. Suggested editors and reviewers should not have any conflict-of-interest in evaluating the paper.

(You can also name Editors and reviewers you would prefer to be excluded. It's advisable to include a justification in the note field and possibly your cover letter as well.)

- **Searching the database for co-authors and suggested reviewers.** We already have an extensive database of many potential authors. Before entering your contributing authors' information, try first to use "find person" to see if your contributing author is already in the system. Just type in the complete last name and click "find Person". If the right name comes up, click on it and close the name window. The person's information will copy into the form. Do the same thing for suggested reviewers.
- Only the person's name, institution, and city will be visible on the form. Other fields will be redacted to prevent unauthorized users from taking advantage of the database. Do not attempt to update or correct any of the information. Continue with your manuscript submission, but please notify the contributing author to come into the system to modify and update his or her profile; or notify the [staff](#). Do not add a new record for someone in the database, even if the record is out-of-date.

A screen asking for the actual file locations on your computer (via an open file dialog). After completing this screen, your files will be uploaded to our server.

A screen requesting the order files should appear in the system-generated merged PDF. All files (except Supplements for Ecological Archives) will then be converted by EcoTrack to PDFs. This process generally takes about 10 minutes. You can come back later to see if it is complete. If it does not occur within an hour, you can contact the [staff](#) for assistance.

A completion screen that will provide you with a specific manuscript number for your manuscript.

An approval screen that will allow you to verify that your manuscript was uploaded and converted correctly. You need to view each pdf and approve it. You are able to replace, add, and delete files on this page. When you are satisfied that your submission is complete, click "confirm approved converted files." **Do not approve your submission if there are any issues about which you need to contact the staff.** Instead contact esa_pubs@cornell.edu for assistance. Please do not send already uploaded files to staff or Editor-in-chief by e-mail.

- Parsed citation file: Please note that once you upload an article file, EcoTrack will convert the article to pdf and make a parsed citation file. You do not need to view or approve this file. It may be used by the editors and reviewers during the peer review process. If your paper is selected for publication, you may be asked to resolve any issues with citations that are formatted incorrectly.

- What is in a parsed citation file: Many correctly formatted citations will contain external links to those papers on Cross Ref and Pub Med. A link to search Google Scholar will also appear for each citation. Citations which are incorrectly formatted will appear in red.

Once you approve your submission, you no longer have access to modify files or the information about your manuscript. The manuscript will enter the submission queue, and our staff will check it over for completeness and adherence to our guidelines. If there are any issues, you will be contacted by e-mail. Otherwise you will receive an acknowledgement and the submission will be sent on to the editor-in-chief for consideration.

Checking the manuscript status After you approve your manuscript, you are finished with the submission process. You can access the status of your manuscript at any time by:

1. Logging into EcoTrack with your password.
2. Clicking on Live Manuscripts and then Check Status.
3. If you scroll down below your manuscript summary, you can see the significant events since your manuscript submission.

Manuscript correspondence. You are encouraged to use the "Send Manuscript Correspondence" feature for all correspondence to editors and staff regarding your manuscript. **Please do not use it for sending copies of the files you have uploaded to the editors or staff.** This option is located in "Manuscript Tasks" below the manuscript summary table.

Getting help. If you need additional help, you can click on the help signs spread throughout the system. A help dialog will pop up with context-sensitive help. Please contact the staff at <esa_pubs@cornell.edu> if you need additional assistance.