

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

**INTERAÇÕES ENTRE ESTRESSORES NATURAIS E ETINILESTRADIOL NO
DESENVOLVIMENTO LARVAL DE *PHYSALAEMUS CUVIERI* (ANURA:
LEIUPERIDAE)**

ANDERSON PIRES FERREIRA

SÃO LUÍS
2011

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

**INTERAÇÕES ENTRE ESTRESSORES NATURAIS E ETINILESTRADIOL NO
DESENVOLVIMENTO LARVAL DE *PHYSALAEMUS CUVIERI* (ANURA:
LEIUPERIDAE)**

ANDERSON PIRES FERREIRA

Orientadores: Dra. Gilda Vasconcellos de Andrade
Dra. Natilene Mesquita Brito

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico –
CNPq/Casadinho (proc. 620163/2008 9)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

SÃO LUÍS
2011

Ferreira, Anderson Pires

Interações entre estressores naturais e etinilestradiol no desenvolvimento larval de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae)/Anderson Pires Ferreira – São Luís, 2011.

65 f.

Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação) – Universidade Federal do Maranhão, 2011.

1. Ecotoxicologia 2. Sapo 3. Contraceptivo I. Título

CDU 574:615.9

Anderson Pires Ferreira

**INTERAÇÕES ENTRE ESTRESSORES NATURAIS E ETINILESTRADIOL NO
DESENVOLVIMENTO LARVAL DE *PHYSALAEMUS CUVIERI* (ANURA:
LEIUPERIDAE)**

A Comissão julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em/...../....., considera o candidato

Profa. Dra. Gilda Vasconcelos de Andrade
Orientadora

Profa. Dra. Natilene Mesquita Brito
Co-Orientadora

Prof. Dr. Luis Cesar Schiesari

Prof. Dr. Nivaldo Magalhães Piorski

Aos meus pais Nilva e Lázaro.

Aos meus irmãos Mario e Alexandra.

A Deranilde.

“O único lugar onde o sucesso
vem antes do trabalho
é no dicionário.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me ajudaram durante todas as etapas do trabalho e em especial:

Aos meus pais, Lázaro e Nilva, pela educação, carinho e apoio durante a minha formação.

Aos meus irmãos, Alexsandra e Mario pelo incentivo e apoio na minha escolha profissional e a amizade que rende momentos de muita felicidade.

A Deranilde Santana pelo companheirismo, incentivo e a ajuda essencial para a elaboração do trabalho, principalmente, nas suas etapas mais difíceis e importantes.

A Alexandre Azevedo pela amizade e grande ajuda nas análises estatísticas.

Aos companheiros do Laboratório de Herpetologia e de turma: Clarenice Santos, Hamanda Soares e Rodrigo Matavelli pelos bons momentos e ajuda durante o trabalho.

A Antônio Fernando, Daniel Brito e Jonhny Sousa pela amizade e a grande ajuda no campo e laboratório durante os experimentos.

A Clarenice Santos, Deranilde Santana, Antonio Fernando, Naiara Valle, Zairon Garcês e Hamanda Soares pela ajuda na árdua tarefa de limpeza dos tanques.

A Ana Lúcia pela amizade, atenção e excelente trabalho na secretaria do Mestrado.

A Prof.^a Gilda Andrade pela amizade, conselhos e orientação durante o Mestrado. Além disso, pelo apoio logístico para realização de todo o trabalho.

A Prof.^a. Natilene Brito pela orientação, empréstimo de materiais e pelas sugestões dadas ao trabalho.

A Suzyéth Melo pela ajuda na elaboração do delineamento experimental, preparação das soluções e sugestões.

Aos Professores: Luís Schiesari, Nivaldo Piorski, Ozelito Amarante Jr. e Teresa Cristina Franco pelas valiosas sugestões feitas.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade ICMBio/RAN pela concessão da Licença de Pesquisa (Licença nº 21133-1).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa concedida durante o Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq / Casadinho (Processo nº 620163/2008 9) pela ajuda no financiamento das pesquisas.

A Universidade Federal do Maranhão – UFMA pela formação e acolhida.

Sumário

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Biologia, diversidade e declínio de anfíbios.....	01
1.2 Desreguladores endócrinos.....	02
1.3 Efeitos dos desreguladores endócrinos em anfíbios.....	04
1.4 Hormônios estrogênicos.....	05
1.5 Contaminação de ecossistemas aquáticos por estrogênicos.....	07
1.6 Efeitos de estrogênicos em anfíbios.....	07
1.6.117 α -Ethinilestradiol.....	08
2. JUSTIFICATIVA	09
3. OBJETIVO	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 Espécie estudada.....	11
4.2 Hormônio utilizado.....	14
4.3 Sala de experimentação.....	15
4.4 Manutenção dos espécimes.....	15
4.5 Delineamento experimental.....	17
4.6 Sexagem e medição dos juvenis.....	18
4.7 Análise estatística.....	19
5. RESULTADOS	20
5.1 pH.....	20
5.2 Sobrevivência até a metamorfose.....	20
5.2.1 Sobrevivência dos girinos não metamorfoseados.....	23
5.3 Malformações.....	26
5.4 Tempo de desenvolvimento.....	29
5.5 Tamanho na metamorfose.....	32
5.6 Razão Sexual.....	33
6. DISCUSSÃO	34
6.1 Alterações no pH.....	34
6.2 Sobrevivência.....	34
6.3 Malformações.....	36
6.4 Tempo de desenvolvimento.....	38
6.5 Tamanho na metamorfose.....	39
6.6 Razão sexual.....	40
7. CONCLUSÕES	41
8. REFERÊNCIAS	42

RESUMO

FERREIRA, A. P. **Interações entre estressores naturais e etinilestradiol no desenvolvimento larval de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae)**. 2011. 55f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2011.

Existem populações de anfíbios declinando em várias partes do mundo, decorrentes de alterações ambientais causadas pelo homem. A contaminação aquática por desreguladores endócrinos, que agem interferindo na fisiologia dos animais e alteram as funções do sistema endócrino, pode ser um dos fatores que está contribuindo para esse declínio. Dentre os desreguladores, os hormônios oferecem perigo, pois podem agir durante o desenvolvimento larval dos anfíbios, que é um período crítico para a sobrevivência e o sucesso reprodutivo dos indivíduos. Esse perigo pode aumentar se existirem interações do hormônio com os estressores naturais que mantêm o equilíbrio das populações. O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da contaminação pelo hormônio 17α -etinilestradiol e sua interação com estressores naturais em girinos, utilizando como modelo a espécie *Physalaemus cuvieri*. Para isso, foi montado um experimento fatorial para avaliar os efeitos do etinilestradiol em diferentes concentrações (0, 0,005 ou 2,5 $\mu\text{g/L}$) e suas interações com densidade (alta ou baixa) e predador (presente ou ausente). Para avaliar os efeitos dos tratamentos, foram utilizadas, como variáveis resposta, a sobrevivência até a metamorfose, sobrevivência dos girinos não metamorfoseados, presença de malformações, tamanho na metamorfose, tempo de desenvolvimento e razão sexual. Foi constatada a diminuição da sobrevivência na maior concentração e em densidade alta, sendo mais evidente nos 30 primeiros dias, indicando um efeito agudo do hormônio e um estresse causado pela maior densidade. A maioria dos girinos que completaram a metamorfose, estavam expostos as concentrações 0 e 0,005 $\mu\text{g/L}$ dos tratamentos com densidade baixa e ausência do predador, o que reflete a ação do etinilestradiol na concentração de 2,5 $\mu\text{g/L}$ e em densidade alta. Foram encontrados indivíduos com malformações (localizadas principalmente nos membros), no qual tiveram maior ocorrência nos tratamentos expostos a 0,005 $\mu\text{g/L}$ de etinilestradiol e densidade baixa, o que pode estar ligado as menores taxas de sobrevivência e seleção de indivíduos mais fortes nos tratamentos com maior concentração e densidade, além de um possível efeito crônico sobre os girinos expostos a menor concentração. Existe a hipótese que o etinilestradiol age sobre os mecanismos hormonais reguladores da metamorfose, através da inibição da tireóide, fato que explicaria o desenvolvimento mais lento dos girinos nos tratamentos com 0,005 e 2,5 $\mu\text{g/L}$ e o predador, que também pode diminuir o metabolismo dos girinos. O tamanho na metamorfose foi maior nos tratamentos na presença de 2,5 $\mu\text{g/L}$ e predador, fato ligado ao maior tempo de desenvolvimento e possível estimulação da produção de Prolactina e Hormônio do Crescimento pelo etinilestradiol. Não houve mudança na razão sexual dos tratamentos expostos ao etinilestradiol, quando comparados ao controle. Este estudo indica que a exposição de girinos de *P. cuvieri* ao estrogênio 17α -etinilestradiol junto com estressores presentes em comunidades naturais, altera o seu desenvolvimento normal de diferentes formas.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. Sapo. Contraceptivo. Poluição. Estrogênio. Brasil.

ABSTRACT

FERREIRA, A. P. **Interactions between natural stressors and ethinylestradiol on larval development of *Physalaemus cuvieri* (Anura:Leiuperidae)**. 2011. 55f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2011.

There are amphibian populations declining in many parts of the world, due to environmental changes caused by humans. The aquatic contamination by endocrine disruptors, which act by interfering with the physiology of animals and alter the functions of the endocrine system may be one factor that is contributing to this decline. Among the disruptors, hormones pose a danger because it can act during larval development of amphibians, a critical period for survival and reproductive success of individuals. This risk may increase if there are interactions of the hormone with the stressors that maintain the natural balance of populations. The objective of this study was to assess the effects of contamination by the hormone 17 α -ethinylestradiol and its interaction with natural stressors in tadpoles, using as model the specie *Physalaemus cuvieri*. For this, a factorial experiment was set up to evaluate the effects of ethinylestradiol in different concentrations (0, 0.005 or 2.5 $\mu\text{g/L}$) and their interactions with density (high or low) and predator (present or absent). To evaluate the effects of treatments were used, as response variables, survival to metamorphosis, survival of tadpoles not metamorphosed, malformations, size at metamorphosis, development time and sex ratio. It has been found to decrease survival in the higher concentration and at high density, being more evident in the first 30 days, indicating an acute effect of hormone and stress caused by a higher density. Most of the tadpoles that completed metamorphosis were exposed to concentrations of 0 and 0.005 $\mu\text{g/L}$ on treatments with low density and absence of the predator, which reflects the action of ethinylestradiol at a concentration of 2.5 $\mu\text{g/L}$ and at high density. Individuals were found with malformations (mainly located in the limbs), which have a higher occurrence in the treatments exposed to 0.005 $\mu\text{g/L}$ of ethinylestradiol and low density, which is connected can lower rates of survival and selection of stronger individuals in treatments with higher concentration and density, and a possible chronic effect on the tadpoles exposed to lower concentration. There is the hypothesis that ethinylestradiol acts on the hormonal mechanisms regulating the metamorphosis by inhibiting the thyroid, which could explain the slower development of tadpoles in treatments with 0.005 and 2.5 $\mu\text{g/L}$ and the predator, that can also decrease the metabolism of tadpoles. The size at metamorphosis was higher in treatments in the presence of 2.5 $\mu\text{g/L}$ and predator, a fact associated to increased development time and possible stimulation of Prolactin and Growth Hormone by ethinylestradiol. There was no change in sex ratio of the treatments exposed to ethinylestradiol, when compared to control. This study indicates that exposure of tadpoles *P. cuvieri* to the estrogen 17 α -ethinylestradiol together with stressors in natural communities, alters the normal development of different forms.

Keywords: Ecotoxicology. Frog. Contraceptive. Pollution. Estrogen. Brazil.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biologia, Diversidade e Declínio de Anfíbios

Os anfíbios são animais que representam a transição entre vertebrados estritamente aquáticos (os peixes) e os vertebrados amniotas terrestres. O sucesso da saída da água e colonização do ambiente terrestre promoveu uma grande radiação adaptativa, e conseqüentemente, variedade de hábitos de vida e diversificação dos grupos viventes (DUELLMAN; TRUEB, 1994). Atualmente, a classe Amphibia é formada por três ordens: Anura (Sapos, Rãs e Pererecas), Caudata (Salamandras) e Gymnophiona (Cecílias), que juntas somam 6771 espécies, sendo a maioria da ordem Anura, com 5966 espécies (FROST, 2011). Muitas espécies apresentam um estágio larval aquático livre nadante, que na ordem Anura são conhecidos como girinos e diferem dos adultos em vários aspectos da sua morfologia, fisiologia, alimentação e modos de vida, sofrendo, portanto, diferentes pressões ambientais (DUELLMAN; TRUEB, 1994; MCDIARMID; ALTIG, 1999).

O Brasil possui a maior diversidade de anfíbios do mundo, com 877 espécies (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA, 2011), o que corresponde a 13,1% da diversidade global, sendo 821 espécies de anuros. Essa alta diversidade, principalmente nas florestas tropicais, torna os anfíbios importantes membros no equilíbrio desses biomas, pois funcionam como predadores e presas de várias espécies de vertebrados e invertebrados (GARDNER, 2001). Logo, a extinção de espécies ou declínio nas populações, principalmente de anuros, podem levar ao desequilíbrio nas cadeias tróficas, comprometendo os mecanismos naturais de controle dos recursos e consumidores (BEGON, 2006; GARDNER, 2001).

Em 1989, durante o Primeiro Congresso Internacional de Herpetologia, a comunidade científica iniciou as primeiras discussões sobre o declínio e extinção mundial de populações de anfíbios (BEEBEE; GRIFFITHS, 2005). Em duas décadas, a produção científica abordando esse tema aumentou bastante, sendo constatado que de 6260 espécies de anfíbios avaliadas, 2030 espécies (32,4%) estão extintas ou ameaçadas de extinção, de acordo com a International Union for Conservation of Nature (IUCN) - Red List (2008), o que corresponde ao segundo grupo de animais mais ameaçados de extinção, perdendo apenas para os peixes.

Dentre as alterações globais do meio ambiente decorrentes de atividades humanas, as pesquisas apontam vários estressores biológicos, físicos e químicos, dentre eles: A destruição de habitats, poluentes químicos, irradiação UV-B, doenças e introdução de espécies, como os principais impactos que atuam no declínio e extinção de espécies de anfíbios (BEEBEE; GRIFFITHS, 2005; GARDNER, 2001; GASCON et al., 2007). Pesticidas, fármacos, fertilizantes e metais pesados têm sido os mais estudados dentre os contaminantes químicos, que podem possuir ação sobre o sistema endócrino e nervoso (BOONE et al., 2007b).

1.2 Desreguladores endócrinos

Com o advento da indústria química e farmacêutica, milhares de novas substâncias foram disponibilizadas no mercado, acarretando sérios problemas para a sociedade (REIS FILHO; LUVIZOTTO-SANTOS; VIEIRA, 2007). Produtos químicos, tais como cosméticos, fármacos e hormônios reprodutivos biogênicos, são descartados diretamente no ambiente através do lixo e sistemas de tratamento de esgoto, que não são projetados para remover esses efluentes (HAMER; MCDONNELL, 2008). Mesmo em pequenas concentrações ($<0,001\mu\text{g/L}$), esses contaminantes são capazes de provocar efeitos deletérios em organismos aquáticos (KOLPIN et al., 2002).

Dentre as milhões de substâncias químicas que são conhecidas atualmente, menos de 45% tiveram um estudo toxicológico básico em organismos vivos, o que representa alto risco para as espécies viventes, pois podem agir como desreguladores endócrinos, causando efeitos letais, subletais ou acumulativos (BIANCO et al., 2010; MELLO-DA-SILVA; FRUCHTENGARTEN, 2005; MORAES ET AL., 2008).

Desreguladores ou perturbadores endócrinos são substâncias exógenas, naturais ou sintéticas, que podem agir interferindo na fisiologia dos animais e alterando as funções hormonais do sistema endócrino (Figura 1). Esse sistema é formado por uma complexa rede de sinais e mensagens químicas chamadas de hormônios, que são liberados através de glândulas (KLOAS; LUTZ, 2006). O sistema endócrino controla funções e reações em vertebrados e alguns invertebrados através da produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação ou ação de hormônios naturais, que agem diretamente no sistema nervoso (KLOAS; LUTZ, 2006; MEYER; SARCINELLI; MORREIRA, 1999; REIS FILHO; LUVIZOTTO-SANTOS; VIEIRA, 2007). Logo, esses contaminantes podem levar a quebra da homeostase e

alterações no desenvolvimento e comportamento do organismo, acarretando problemas ambientais ao nível de indivíduo ou populações (BIANCO et al., 2010; MORAES et al., 2008).

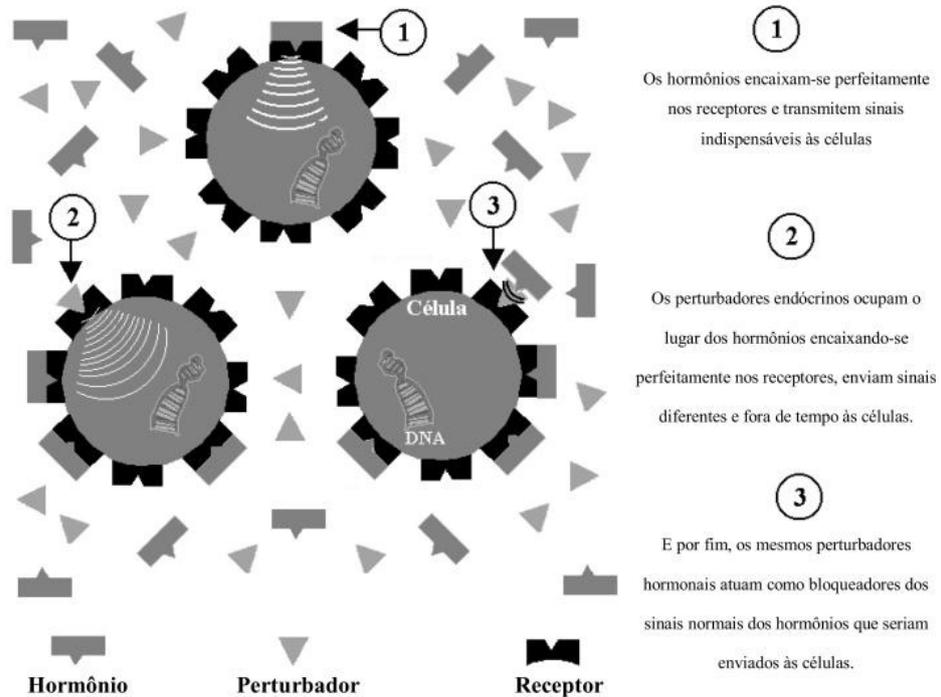


Figura 1 - Efeitos dos dereguladores endócrinos na comunicação celular (BILA, 2005).

Na década de 80, iniciou-se a preocupação com os contaminantes químicos agindo como desreguladores endócrinos em ecossistemas aquáticos. A observação de alterações em animais expostos ao DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) na América do Norte, como por exemplo, machos de aves marinhas com características femininas, jacarés machos com mudanças nos órgãos reprodutivos (Lago Appoka) e peixes e outros organismos aquáticos com sintomas parecidos (Grandes Lagos), levaram os pesquisadores a dar maior foco para a poluição química aquática (SOCIETY OF ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY, 2000). Apesar desses relatos, apenas na década de 90 houve maior preocupação com os perturbadores endócrinos e intensificou-se as pesquisas para apurar e buscar soluções aos resíduos de substâncias (REIS FILHO; LUVIZOTTO-SANTOS; VIEIRA, 2007).

O sistema endócrino de um animal adulto tem maior capacidade de suportar a presença de uma substância química exógena, porém, a sua exposição em estágio larval e de desenvolvimento, pode levar a morte ou a danos quando estiver adulto, além de poder passar

por bioacumulação às próximas gerações (REIS FILHO; LUVIZOTTO-SANTOS; VIEIRA, 2007). Essas diferentes reações, devem-se aos efeitos desses contaminantes químicos poderem ser crônicos ou agudos, ou ambos, no qual os efeitos crônicos são de mais difícil percepção, pois são resultado à exposição por um longo período a um contaminante em baixas concentrações, que, em muitas vezes, é de difícil detecção. Já os agudos, levam a danos em menor tempo de exposição e são resultados de maiores concentrações (DUFFUS, 2006; MORAES, et al., 2008).

No ambiente, a análise química dos desreguladores endócrinos é geralmente incapaz de detectar a sua presença, assim como determinar o seu potencial maléfico (PETROVIC, et al., 2004), devido às baixíssimas concentrações.

1.3 Efeitos dos desreguladores endócrinos em anfíbios

As larvas e adultos de anfíbios são considerados “esponjas ambientais”, devido à sua pele semipermeável que permite fácil absorção de toxinas presentes no ambiente em que vivem, principalmente os girinos, que passam todo o seu desenvolvimento em contato direto com a água e consomem grande quantidade de alimentos potencialmente contaminados (HOFER; LACKNER; LOBEER, 2005). Portanto, em todas as fases da sua vida (ovos, larvas e adultos) os anfíbios são extremamente vulneráveis a desreguladores endócrinos (DUELLMAN; TRUEB, 1994).

O período de metamorfose do girino, até se tornar um juvenil, é um período crítico na organização e ativação de muitos processos fisiológicos, essenciais para o desenvolvimento das larvas (HOGAN et al., 2008). A exposição aos desreguladores endócrinos, no período de desenvolvimento larval de anfíbios, pode alterar os processos hormonais, de acordo com a fisiologia da espécie, levando à mortalidade, interferência na metamorfose, efeitos sobre a ontogenia do sistema reprodutivo, características sexuais secundárias ou causar mudanças comportamentais (BOONE; JAMES, 2003; BOONE; SEMLITISCH, 2002, 2003; BRANDE-LAVRIDSEN; CHRISTENSEN-DALSGAARD; KORSGAARD, 2008; RELYEA 2003, 2005).

Para compreender os efeitos de um contaminante químico na natureza, muitos pesquisadores avaliam apenas uma espécie, que representa apenas o nível de população, não testando os efeitos e a interação com outros organismos que compõem a sua cadeia alimentar,

que representa o nível de comunidade (BOONE; SEMLITISCH, 2002, 2003). Logo, o contaminante pode afetar diretamente a fisiologia de uma espécie, mas também pode estar atuando indiretamente nos seus predadores, competidores e na disponibilidade de recursos (BOONE; SEMLITISCH, 2002, 2003).

Devido à grande diversidade de hábitos e relações ecológicas que os anuros possuem, algumas espécies podem chegar a se beneficiar e ter ganhos populacionais com a presença de um contaminante, principalmente quando esse é letal para seus predadores e/ou competidores e sub-letal (causando efeitos diretos mínimos) no anuro (BOONE; SEMLITISCH, 2002, 2003).

Estudos demonstram que contaminantes químicos, como os pesticidas, podem diminuir a sobrevivência quando combinados com fatores abióticos, como variação de pH, temperatura, hidroperíodo da poça e luz UV-B (BOONE; BRIDGES, 1999; BOONE; SEMLITISCH, 2003; CHEN; HATHAWAY; FOT, 2004; LOHNER; FISCHER, 1990; ZAGA et al., 1998) e fatores bióticos que formam a cadeia alimentar ou causam estresse no ambiente, como presença de predadores, relações de competição e quantidade de alimento disponível (BOONE et al., 2007a, 2007b; BOONE; JAMES, 2003; BOONE; SEMLITISCH, 2002, 2003; RELYEA, 2003, 2005, 2006; RELYEA; SCHOEPPNER; HOVERMAN, 2005).

A presença de hormônio feminino na água, que tem seus impactos comprovados em experimentos de laboratório (HOGAN et al., 2008; LUTZ et al., 2008; MACKENZIE et al., 2003; PETTERSSON, 2006), aliados a fatores naturais, também podem vir a causar efeitos semelhantes no nível de comunidade. Apesar disso, poucos estudos abordam os efeitos de hormônios naturais e sintéticos em anfíbios no mundo e pouca ou nenhuma informação existe sobre os efeitos de hormônios em espécies brasileiras. No entanto, os hormônios vêm sendo despejados junto com os esgotos em águas superficiais de todo o país há muitos anos (MELO et al., 2009; SODRÉ et al., 2007), o que, junto com o problema da perda de hábitat e agrotóxicos, pode estar alterando a sustentabilidade de populações de anuros e levando-as a um declínio.

1.4 Hormônios estrogênicos

Os hormônios naturais ou artificiais (oriundos da indústria química e farmacêutica) em concentrações acima do necessário e do tolerado pelos organismos, agem como

desreguladores endócrinos, distorcendo os níveis de atividade do sistema endócrino e provocando um mau-funcionamento dos mecanismos hormonais (BILA; DEZOTTI, 2007; MEYER; SARCINELLI; MORREIRA, 1999), o que pode gerar efeitos comportamentais, desenvolvimentais e reprodutivos (BARONTI et al., 2000; CHAKRABORT; BURMEISTER, 2009).

Os estrogênios são um conjunto de esteróides (Figura 2) reconhecidos pelo grupo químico que os compõem e pela sua atividade no ciclo estral dos animais (GABET et al., 2007). São hidrofóbicos, o que permite a sua acumulação no sedimento e no solo, que, conseqüentemente, podem agir como reservatórios de poluição para o ecossistema contaminado (GABET et.al, 2007) e lipofílicos, sendo solúveis em gorduras e excretados geralmente inalterados ou, principalmente, como glicuronatos polares hidrossolúveis inativos e conjugados de sulfatos (NOPPE et al., 2005). A degradação no ambiente pode levar poucos dias em condições ótimas ou pode ser muito lenta em condições que não permitam uma alta fotocatalise, como em pouca incidência de luz UV (BENOTTI et al., 2009; NOPPE et al., 2005).

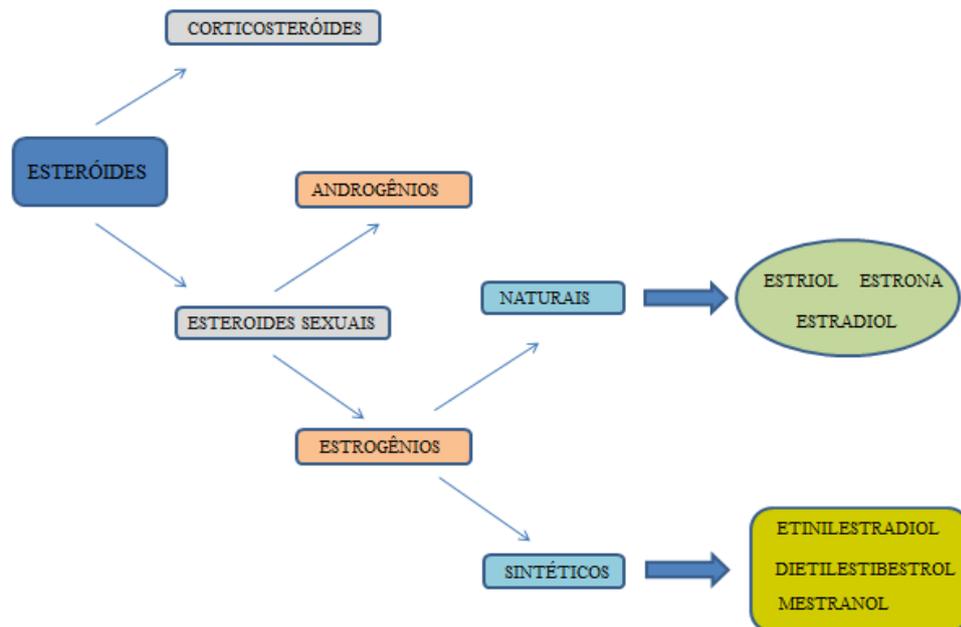


Figura 2 - Classificação dos hormônios esteróides.

A atividade estrogênica de substâncias químicas presentes no ambiente vem sendo descrita na literatura há quase 40 anos, mas este tema despertou maior atenção a partir do século 21, uma vez que somente recentemente os estudos científicos têm comprovado a seriedade e a diversidade dos problemas que podem advir da exposição a estes compostos,

principalmente de organismos aquáticos (GABET et al., 2007; SILVA; MELO; OLIVEIRA, 2007).

1.5 Contaminação de ecossistemas aquáticos por estrogênios

Naturalmente, o corpo excreta quantidades diárias de hormônios pela urina, ou em menor quantidade pelas fezes, que chegam à rede de esgoto (GOMES; SCRIMSHAW; NESTER, 2003; KOLPIN et al., 2002; TERNES et al., 1999). A maior parte desse esgoto em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, onde as condições de saneamento são precárias, acaba sendo despejado sem nenhum tratamento em águas superficiais (SODRÉ et al., 2007), como é o caso do Brasil, onde somente 20,2% dos municípios coletam e tratam o esgoto doméstico (MELO et al., 2009). Em países desenvolvidos, o esgoto é tratado, só que muitas das estações de tratamento são inadequadas para remover hormônios, que acabam indo diretamente ao ambiente (KOLPIN et al., 2002; SODRÉ et al., 2007).

As mulheres podem excretar diariamente, em seu ciclo normal, entre 10 e 100 µg de estrogênios naturais (que chegam até a 30mg durante a gravidez) como o 17β-estradiol, estrona e estriol (BARONTI, et al., 2009; BELFROID et al., 1999). O uso intensivo de fármacos contraceptivos e reguladores hormonais à base do hormônio etinilestradiol pelas mulheres nas últimas décadas (PEDRO, 2003) tem acarretado o aumento das concentrações desse hormônio sintético no esgoto doméstico e conseqüentemente nos ecossistemas aquáticos. Em laboratório e microcosmos, vários estudos comprovam que estrogênios sintéticos foram capazes de causar anormalidades em zooplâncton e fitoplâncton (HENSE et al., 2004), peixes (BACHMANN CHRISTIANSEN; WINTHER-NIELSEN; HELWEG et al., 2002; ÖRN et al., 2003; ROBINSON et al., 2003; VAN DEN BELT et al., 2002) e anfíbios (BRANDE-LAVRIDSEN; CHRISTENSEN-DALSGAARD; KORSGAARD, 2008; HOGAN et al., 2008; KLOAS; LUTZ; EINSPANIER, 1999; MACKENZIE et al., 2003; PARK; KIDD, 2005; PETTERSSON et al., 2006; PETTERSON; BERG, 2007).

1.6 Efeitos de estrogênios em anfíbios

O efeito mais esperado da exposição a esteroides sexuais é a feminilização quando há exposição a estrogênios e masculinização quando os indivíduos são expostos a andrógenos

(BOGI et al., 2002; KLOAS, 2002; MACKEZINE et al., 2003). Nos anfíbios, a exposição na fase de desenvolvimento e diferenciação sexual, pode alterar o sexo definido geneticamente. A diversidade de formas de diferenciação sexuais presentes nas espécies de anfíbios, desde aqueles que têm as gônadas diferenciadas na metamorfose aos que se diferenciam meses depois, faz com que o hormônio atue diferentemente dependendo da espécie, concentração e do tempo de exposição (BRANDE-LAVRIDSEN; CHRISTENSEN-DALSGAARD; KORSGAARD, 2008; HAYES, 1998).

A determinação do sexo em anfíbios durante a fase larval, por exemplo, pode ser alterada pelo uso de benzoato de estradiol (hormônio feminino), que induz machos (XY ou ZZ) a se diferenciarem em neofêmeas funcionais, ou propionato de testosterona (hormônio masculino) que realiza o processo contrário nas fêmeas (XX ou ZW) (OHTA, 1987).

O uso de estrogênios é uma prática comum em ranários, onde concentrações menores que 30 µg/L são capazes de mudar o sexo de todos os indivíduos (AGOSTINHO; SILVA; TORRES, 1991). Um número crescente de estudos feitos na natureza, microcosmos ou laboratório tem demonstrado que a exposição de anfíbios a hormônios sintéticos, como o etinilestradiol, nos estágios de desenvolvimento, pode causar a reversão parcial ou total do sexo, gônadas intersexuais (BRANDE-LAVRIDSEN; CHRISTENSEN-DALSGAARD; KORSGAARD, 2008; HAYES et al., 2002; KLOAS; LUTZ; EINSPANIER, 1999; MACKENZIE et al., 2003; PARK; KIDD, 2005), alterações no comportamento sexual (CHAKRABORT; BURMEISTER, 2009) e na metamorfose (HOGAN et al., 2008) e dentre outras anormalidades (MACKENZIE et al., 2003; TAVERA-MENDOZA et al., 2002), que na natureza, podem ser cruciais para o sucesso reprodutivo de uma população.

1.6.1 17 α -etinilestradiol

O 17 α -etinilestradiol (Figura 3) é um estrogênio sintético, consumido por milhões de mulheres, estando presente em pílulas contraceptivas e outros fármacos utilizados em terapia hormonal durante a menopausa ou no tratamento de disfunções hormonais, como a síndrome do ovário policístico (EDUARDO, 2009). Assim como os demais hormônios, parte do que é ingerido (cerca de 26%) é excretado pelo organismo, indo parar nas estações de tratamento de efluentes em concentrações de até 273 ng/l na Europa e América do Norte (BRANDE-LAVRIDSEN; CHRISTENSEN-DALSGAARD; KORSGAARD, 2008; KOLPIN et al. 2002)

e também, em águas superficiais (DESBROW et al., 1998; TERNES et al., 1999; YIN; KOOKANA; RU, 2002). O efeito do 17α -etinilestradiol pode ser tão forte, que uma pequena concentração de 0,1 ng/L pode causar a feminilização de algumas espécies de peixes selvagens (BARONTI et al., 2009; GOMES; SCRIMSHAW; NESTER, 2003). Em anfíbios, estudos mostram que os seus efeitos tem atuado na feminilização, diferenciação e anormalidades de gônadas e em malformações de girinos durante o período de metamorfose (HOGAN et al., 2008; MACKENZIE et al., 2003; PARK; KIDD, 2005; PETTERSSON, 2006).

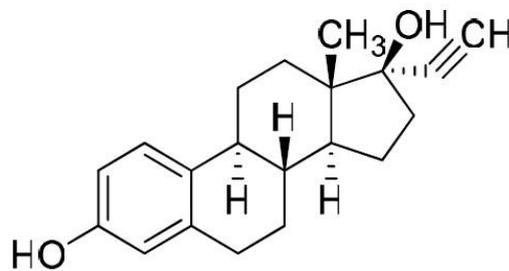


Figura 3 - Fórmula do 17α -etinilestradiol ($C_{20}H_{24}O_2$) (EDUARDO, 2009).

Predação, competição e hidroperíodo da poça são conhecidos como reguladores de comunidades aquáticas de anfíbios e a presença desses estressores resulta em uma taxa de sobrevivência dos girinos de pouco mais de 5% durante a metamorfose (SEMLITISCH, 1987; SEMLITISCH et al., 1996). Então, a adição de um estressor antropogênico, como o hormônio estrogênico 17α -etinilestradiol, pode diminuir a probabilidade de sobrevivência das populações a níveis críticos.

2. JUSTIFICATIVA

Existem populações de anfíbios em declínio em todo o mundo e as principais causas apontadas são decorrentes de impactos humanos sobre o meio ambiente. Os anuros podem apresentar malformações, diminuição do crescimento durante a metamorfose, distúrbios na reprodução quando adulto, aumento da taxa de mortalidade (KHANGAROT; RAY; CHANDRA, 1985; POLLIO, 2005; PUKY; OERTEL, 1997), redução da capacidade natatória (BURKHART et al., 1998; HOPKINS; CONGDON; RAY, 2000), maiores níveis de predação

(BROOMHALL, 2002), aumento do metabolismo (KARASOV et al., 2005), maior susceptibilidade a doenças (JOHNSON et al., 2002) e menor taxa de eclosão de ovos (ROWE; SADINSKI; DUNSON, 1998) quando expostos a contaminantes químicos.

Nesse mundo de diversos tipos de destruição e impactos conhecidos, surgiu uma nova modalidade de poluição ambiental: Os hormônios. Os hormônios naturais ou artificiais (oriundos da indústria química e farmacêutica) em concentrações acima do tolerado por determinado organismo, agem como desreguladores endócrinos, distorcendo os níveis de atividade do sistema endócrino e provocando um mau-funcionamento dos mecanismos hormonais (BILA; DEZOTTI, 2007; MEYER; SARCINELLI; MORREIRA, 1999).

Os efeitos de hormônios femininos a base de estradiol, proveniente principalmente de resíduos dos fármacos anticoncepcionais e reguladores de hormônios que são lançados no esgoto e chegam aos ecossistemas aquáticos, podem ser apontados como um grave problema emergente aos anfíbios, pois os estudos que testaram os seus efeitos, em experimentos controlados, comprovam a sua ação sobre processos fisiológicos ligados a reprodução, definição do sexo e desenvolvimento de anfíbios. Além disso, hormônios à base de estradiol são utilizados em criações de rãs para provocar a feminilização de machos, demonstrando que os impactos podem ser diretos, mesmo em baixas concentrações.

No Brasil, até o presente estudo, não foram encontradas informações sobre os efeitos desses hormônios em anfíbios nativos. Portanto, o Brasil sendo detentor da maior diversidade de anfíbios do mundo e por enfrentar problemas com a degradação de ecossistemas aquáticos e terrestres, necessita com urgência de estudos que avaliem os impactos de hormônios naturais e sintéticos sobre as suas espécies de anfíbios.

O presente estudo pode ser enquadrado dentro dos propósitos do Plano de Ação para a Conservação dos Anfíbios (GASCON et al., 2007), que foi criado pela IUCN (União para a Conservação Mundial) com o objetivo de fornecer diretrizes de urgência que tentem reverter o atual declínio de anfíbios no mundo.

A espécie em estudo é de ampla distribuição no Brasil (FROST, 2011), possui alta abundância no Maranhão e responde bem às condições de estudos laboratoriais (ANDRADE, 1995; LEAL, 2007). Estudos que avaliaram a exposição de girinos a contaminantes químicos demonstram que os efeitos diretos e indiretos podem alterar a taxa de sobrevivência, o tamanho e o tempo de metamorfose e causar malformações (BOONE; JAMES, 2003; BOONE; SEMLITISCH, 2002, 2003; RELYEA, 2003, 2005, 2006; RELYEA;

SCHOEPPNER; HOVERMAN, 2005; BOONE et al., 2007), portanto, estas são as variáveis que iremos testar.

Os resultados deste trabalho fornecerão informações pioneiras sobre os efeitos de um hormônio, encontrado em águas superficiais de vários lugares do mundo, em girinos de uma espécie brasileira, investigando os possíveis impactos desse contaminante em populações de anfíbios e que ajudem na construção de políticas de manejo e conservação desses animais no Brasil e no mundo.

3. OBJETIVO

Verificar os efeitos da exposição ao hormônio estrogênio sintético 17α -etinilestradiol e sua interação com estressores naturais (densidade e predador) em girinos da espécie *Physalaemus cuvieri*, analisando as seguintes variáveis:

- a) *Sobrevivência;*
- b) *Malformações;*
- c) *Tempo de desenvolvimento;*
- d) *Tamanho na metamorfose;*
- e) *Mudança de sexo;*

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Espécie estudada

Foram utilizados nos experimentos, girinos da espécie *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae) (Figura 4b e 4d), que possui ampla distribuição pelo Brasil, habitando vários habitats (FROST, 2011; MIJARES; RODRIGUES; BALDO, 2011). No Maranhão, dois estudos apresentam informações biológicas sobre *P. cuvieri* no campo (BARRETO; ANDRADE, 1995; ANDRADE, 1995) e um estudo em laboratório (LEAL, 2007), que podem ser complementadas com trabalhos realizados no sudeste do país (ANDRADE, 1987; BOKERMANN, 1962; CARDOSO, 1981;). Esses estudos demonstram que o período reprodutivo de *P. cuvieri* é restrito à estação chuvosa e que ele utiliza ambientes aquáticos permanentes ou temporários para desovar. Os ovos são depositados na superfície da água e

envoltos por uma espuma branca (Figura 4a). A eclosão ocorre em até 72 horas após a desova e o período de metamorfose até o estágio 45 (GOSNER, 1960) (Figura 4c) pode se dar em menos de 30 dias. Dados sobre a criação das larvas de *P. cuvieri* em laboratório foram obtidos a partir de observações pessoais e de acordo com o trabalho de Leal (2007).

No período de 19 a 20\05\2010 foram coletadas 15 desovas em três poças independentes de dois municípios da Ilha do Maranhão: São Luís e Raposa (Figura 5). Após a coleta, as desovas foram colocadas em sacos plásticos com água da poça e transportadas para o Laboratório de Herpetologia e Ecologia Aplicada a Conservação\DEBIO\UFMA. O transporte foi feito imediatamente e com o máximo de cuidado, evitando elevadas temperaturas e choques mecânicos, que poderiam levar a morte dos embriões.

No laboratório, as desovas foram acondicionadas individualmente em aquários de vidro com água filtrada, até a eclosão dos ovos. Durante o período de manutenção dos ovos, a água foi trocada duas vezes ao dia, para evitar a eutrofização da água decorrente da degradação da espuma da desova e para a retirada de ovos de predadores. Após a eclosão dos ovos, foi retirada toda a espuma da desova, a água foi trocada e os girinos divididos em proporções semelhantes em dois ou três aquários, para diminuir o estresse da densidade sobre os animais. Em cerca de dois dias, os girinos atingiram o estágio 25 (GOSNER, 1960), estando prontos para utilização no experimento. O estágio 25 foi escolhido devido ao início da alimentação independente, o que é marcante no ciclo de desenvolvimento dos girinos (GOSNER, 1960).

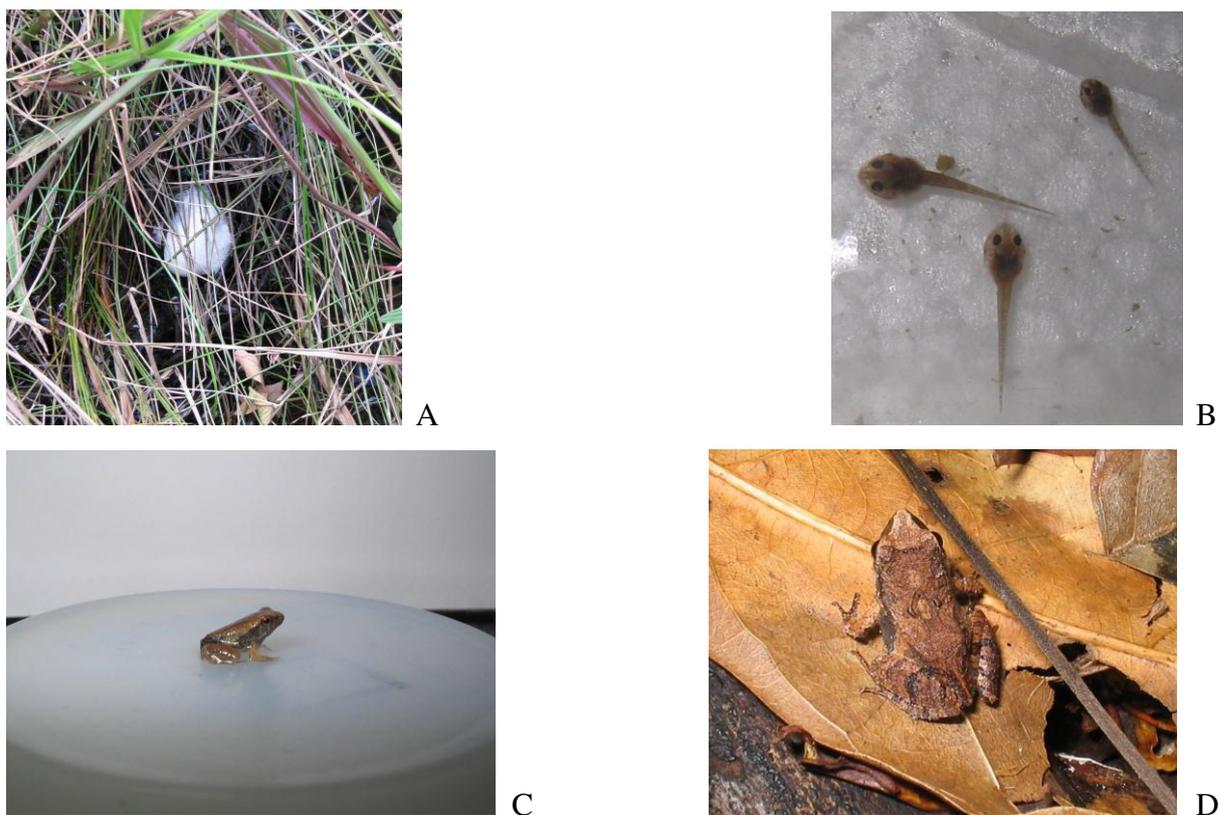


Figura 4 - Estágios do desenvolvimento de *P. cuvieri*. A - Desova em ambiente natural, B - Girinos, C - Juvenil recém metamorfoseado, D - Indivíduo adulto. Fotos: Anderson Pires Ferreira.

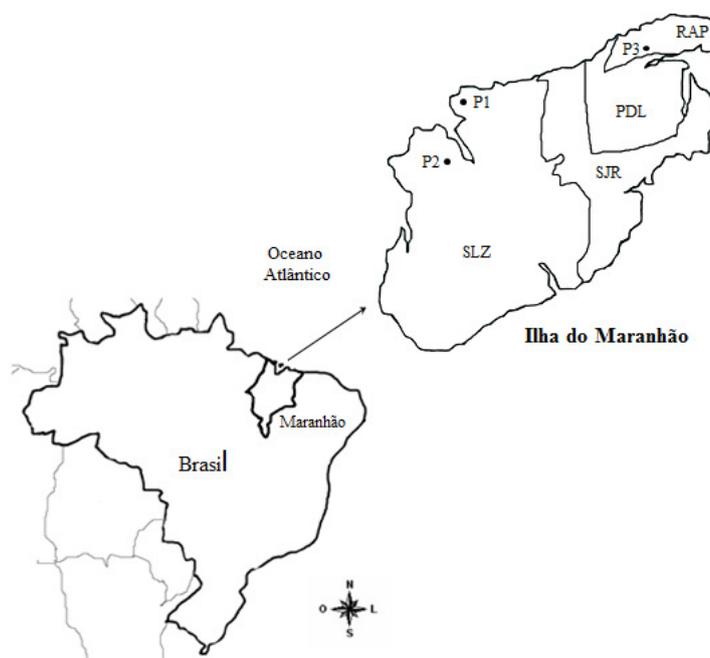


Figura 5 - Localização da Ilha do Maranhão e os pontos de coleta das desovas. SLZ – São Luís, SJR – São José de Ribamar, PDL – Paço do Lumiar, RAP – Raposa, P1 – Poça Jaracati, P2 – Poça UFMA e P3 – Poça Raposa.

Os girinos foram alimentados diariamente com ração para tartarugas jovens, trituradas na proporção de 16mg para 10 girinos no início do experimento e sendo proporcionalmente aumentada de acordo com o crescimento dos girinos, chegando a 22 mg aos 18 dias, e 26 mg de 40 dias até o final do experimento. Essa quantidade foi o suficiente para sempre ficarem sobras de ração nos aquários, não havendo falta de alimento para as larvas durante o experimento.

A coleta, transporte e manutenção dos animais estão de acordo com a Licença do Instituto Chico Mendes de Biodiversidade e Conservação - ICMBio/MMA de número 21133-1.

4.2 Hormônio utilizado

O hormônio sintético utilizado no experimento é o 17α -etinilestradiol, que está presente em pílulas contraceptivas dos produtos mais comuns e vendidos do mercado na sua categoria (HOGAN et al., 2008), com concentrações geralmente entre 20 e 30 μg . Foi preparada uma solução mãe de 200 mL com concentração de 89 mg/L de 17α -etinilestradiol padrão dissolvido em acetonitrila para servir de fonte para as concentrações utilizadas.

As concentrações utilizadas no estudo foram escolhidas com base nos trabalhos de Ternes et al. (1999), que encontraram 0,005 $\mu\text{g/L}$ de 17α -etinilestradiol em uma estação de tratamento de esgoto no Rio de Janeiro, chamada aqui de concentração um (C1) e Sodr e et al. (2007) que relatam a ocorrência de 17β -estradiol na concentração de 2,5 $\mu\text{g/L}$ para o Ribeirão Anhumas no estado de São Paulo, chamada aqui de concentra o dois (C2). Utilizou-se a concentra o C2 baseada em outro hormônio devido os efeitos semelhantes aos causados pelo 17α -etinilestradiol (a partir de agora denominado apenas como etinilestradiol) em organismos aquáticos e por não ser encontrado um estudo que detectou uma concentra o de etinilestradiol em águas superficiais no Brasil.

Para atingir a C1, foi feita uma soluço de 10 mL a 1 mg/L a partir da soluço mãe e foram pipetados 25 μL desta em 2,5 L de  gua. Já em C2, foram pipetados 70 μL direto da soluço mãe e adicionados em 2,5 L de  gua (Figura 6).

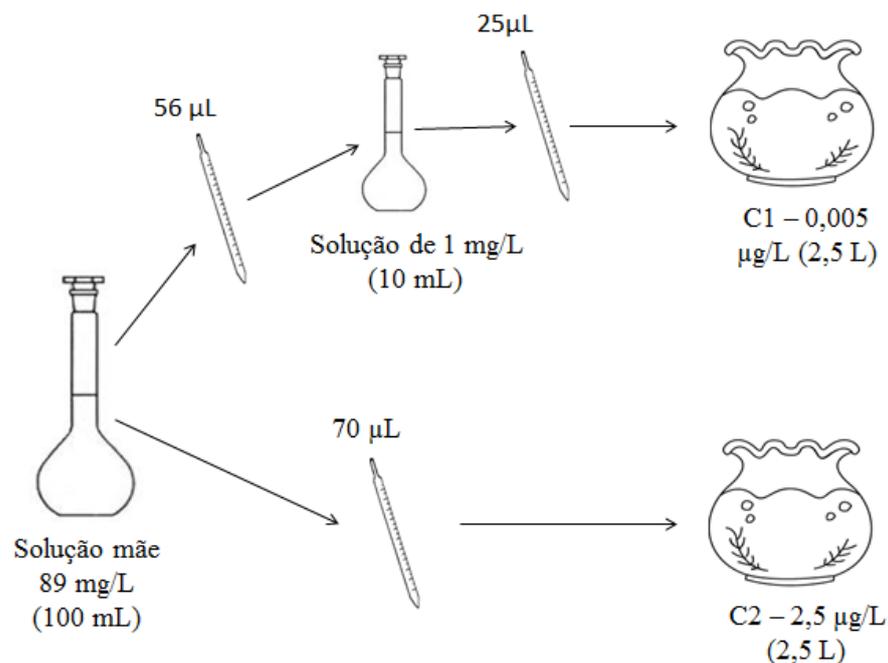


Figura 6 - Esquema da preparação das soluções de 17 α -etinilestradiol utilizadas no experimento.

4.3 Sala de Experimentação

O local de experimentação foi uma sala fechada, com boa iluminação natural e artificial, sem passagens (exceto a porta e janelas que ficaram fechadas) em que animais de fora possam entrar ou que os espécimes criados saiam. A sala foi climatizada de forma constante por condicionador de ar, tendo sua temperatura controlada e variando diariamente entre 26 e 28°C, assim como a umidade relativa, que variou entre 81 e 91%.

4.4 Manutenção dos espécimes

Os experimentos foram realizados em aquários de vidro transparente medindo 12 cm de altura, 15 cm de largura e 20 cm de comprimento (Figura 7). Eles foram cheios com água limpa, filtrada e decantada (durante dois dias) até atingirem a marca de 9 cm, o que corresponde a 2,5 L. A troca da água e reposição das concentrações de etinilestradiol foram feitas a cada quatro dias, após a limpeza dos aquários. Durante a limpeza, os girinos foram removidos com uma peneira e colocados em outro recipiente com água limpa, sempre lavando a peneira em água corrente e trocando a água do recipiente temporário a cada aquário.

A temperatura da água nos aquários foi controlada, variando entre 25 e 26°C e o pH foi medido em todos eles diariamente. A limpeza foi feita utilizando água corrente e uma esponja, não utilizando nenhum tipo de produto químico.

As ninfas de libélula, da espécie *Pantala flavescens* (Odonata: Libellulidae) (Figura 8), foram acondicionadas em gaiolas feitas com tela de nylon que mediam 15 cm de comprimento e 6 cm de largura e altura. Um lado da gaiola era apenas amarrado com linha de algodão para permitir a abertura e introdução dos girinos para alimentação.



Figura 7 - Aquários utilizados no experimento montados na prateleira. Foto: Anderson Pires Ferreira.



Figura 8 - Ninfa de *P. flavescens* (Odonata: Libellulidae) utilizada no experimento. Foto: Anderson Pires Ferreira.

A alimentação das larvas nas gaiolas foi feita a cada três dias com 10 girinos de *Leptodactylus macrosternum* (Anura: Leptodactylidae) durante os primeiros 42 dias e com 10 girinos de *P. cuvieri* durante o restante do experimento. A troca foi realizada devido à dificuldade de se obter girinos de *L. macrosternum*. Os girinos eram rapidamente predados pelas larvas de libélula. As gaiolas foram inseridas dentro de cada aquário, de forma que os girinos de *P. cuvieri* percebessem a sua presença, mas não fossem predados ou molestados (Figura 9). Nos tratamentos com ausência de predador, foi colocada uma gaiola vazia.



Figura 9 - Gaiola com a ninfa de libélula (seta à esquerda) montada dentro do aquário com os girinos (seta à direita). Foto: Anderson Pires Ferreira.

4.5 Delineamento experimental

No dia 22\05\2010 foram utilizadas quatro desovas de P1 e P3 e duas desovas de P2 para montar um experimento fatorial 3x2x2 (Tabela 1) e avaliar os efeitos do hormônio 17 α -etinilestradiol (fator 1) nas concentrações ausente (C0), C1 e C2 aliados aos estressores naturais: densidade de girinos (fator 2 – dez para densidade baixa (DB) e cem girinos para densidade alta (DA) por tratamento) e presença (PP) ou ausência de predadores (PA) (fator 3), em que foram utilizadas uma ou nenhuma ninfa de libélula por tratamento (Tabela 1). Para cada réplica, foi retirado o mesmo número de girinos de cada desova, a fim de aumentar a variabilidade genética.

Foram 12 tratamentos, com cinco réplicas cada, totalizando 60 aquários experimentais (Figura 7) que foram trocados de posição diariamente nas prateleiras, de forma que cada réplica passasse por todas as posições. Durante os 145 dias de experimento, os girinos foram acompanhados do estágio 25 até a metamorfose, no estágio 46 (Gosner, 1960), quando foram sacrificados e tombados na Coleção de Herpetologia do Departamento de Biologia da UFMA como testemunho e para posterior análise das gônadas e medição.

Tabela 1 - Siglas utilizadas para nomear os tratamentos utilizados no experimento.

	Predador Presente (PP) + Densidade Alta (DA)	Predador Presente (PP) + Densidade Baixa (DB)	Predador Ausente (PA) + Densidade Alta (DA)	Predador Ausente (PA) + Densidade Baixa (DB)
Concentração Ausente (C0)	C0PPDA	C0PPDB	C0PADA	C0PADB
Concentração 0,005 µg/L (C1)	C1PPDA	C1PPDB	C1PADA	C1PADB
Concentração 2,5 µg/L (C2)	C2PPDA	C2PPDB	C2PADA	C2PADB

4.6 Sexagem e medição dos juvenis

Para a sexagem dos juvenis recém-metamorfoseados (estágio 46), os exemplares tombados foram abertos em laboratório através de corte na região ventral e análise visual das gônadas em lupa. Os machos foram identificados quando os indivíduos apresentaram as gônadas com formato ovóide de cor marrom escura, caracterizando os testículos (Figura 10a) (OLIVEIRA et al., 2003) e as fêmeas, aqueles com as gônadas esbranquiçadas e de formato longo ou oblongo, caracterizando o ovário (Figura 10b). Os exemplares que apresentaram ambas as gônadas, foram chamados de intersexo (Figura 10c).

Para tirar a medida do tamanho corporal dos juvenis usamos o Comprimento rostro-cloacal (CRC), que foi medido após a fixação, com um paquímetro digital de precisão 0,02 mm.

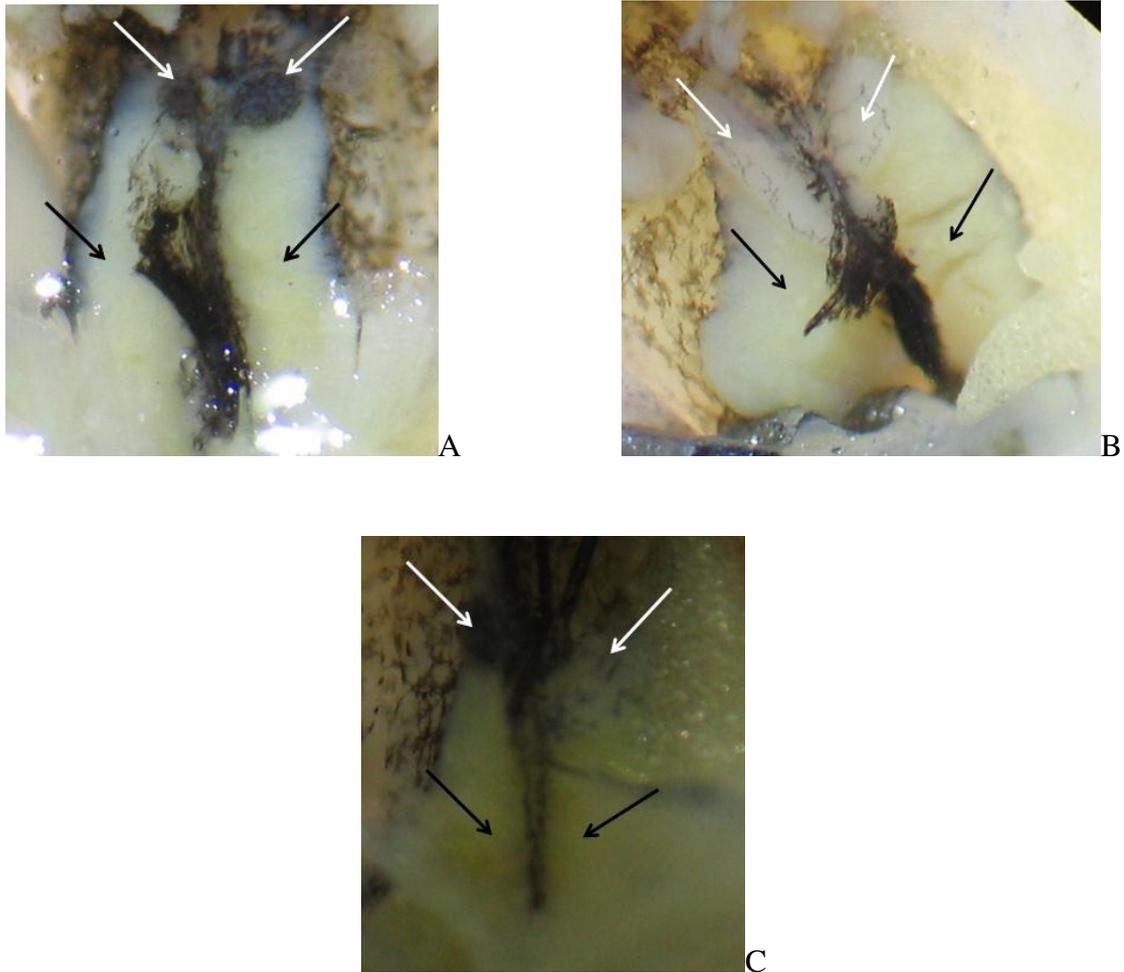


Figura 10 - Gônadas dos juvenis que alcançaram o estágio 46. A- As setas brancas indicam os testículos e as pretas os rins dos machos. B – As setas brancas indicam os ovários e as pretas os rins das fêmeas. C- A seta branca a esquerda é um testículo pouco desenvolvido e a seta a direita indica um ovário, as setas pretas são os rins de um indivíduo intersexo. Fotos: Anderson Pires Ferreira.

4.7 Análise estatística

Para avaliar os efeitos dos tratamentos, foram utilizadas seis variáveis resposta: 1 – sobrevivência de girinos até a metamorfose, medida em porcentagem para não sofrer influência devido às diferentes densidades; 2 – Sobrevivência dos girinos não metamorfoseados, em porcentagem; 3 - Tempo de desenvolvimento médio (em dias), para cada réplica, que os girinos levaram para metamorfosear; 4 – Tamanho na metamorfose, medido através do CRC médio para cada réplica ao final da metamorfose; 5 - Presença de malformações nos girinos ao longo do experimento, em porcentagem; 6 – Razão sexual dos juvenis.

Para analisar os efeitos dos tratamentos e suas interações sobre as taxas de metamorfose e malformações, foi utilizada uma Análise de Variância Multivariada (MANOVA) ($P < 0.05$), seguida por ANOVAS unifatoriais ($P < 0.05$). Nas variáveis que tiveram efeitos multivariados significantes, foram realizadas ANOVAS Fatoriais seguidas de comparações pareadas com o *post hoc* de Tukey ($P < 0.05$), assim como para o tamanho na metamorfose e tempo médio de desenvolvimento. Foi checada a distribuição normal dos dados com o teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias com o teste de Levene. Para os dados de sobrevivência até a metamorfose e malformações foi necessário transformar as porcentagens para o arco seno da raiz quadrada e o tempo médio de desenvolvimento para raiz quadrada, a fim de obter a normalização dos dados e homogeneização das variâncias.

A análise da variação média do pH entre os tratamentos foi feita através de uma ANOVA unifatorial ($P < 0.05$).

Para analisar se houve feminilização nos tratamentos com etinilestradiol, foi usado o Qui-quadrado de Pearson utilizando a razão sexual dos tratamentos controle como frequência esperada e o número de machos e fêmeas encontrados como frequência observada.

5. RESULTADOS

5.1 pH

Os valores médios de pH não apresentaram diferença significativa ($F = 1.915$, $P = 0.060$) entre os tratamentos. Como não houve significância, o pH não foi utilizado como covariável nas ANOVAS para as variáveis resposta.

O menor valor de pH registrado nas réplicas foi 7.0 e o maior 8.9, sendo que esse intervalo de diferença foi comum, correspondendo, respectivamente, ao dia em que a água era trocada e os dias que antecederam a troca.

5.2 Sobrevivência até a Metamorfose

No total, 206 girinos chegaram até o final da metamorfose durante o experimento. A análise multivariada mostra que os efeitos isolados e as interações entre os tratamentos para sobrevivência até a metamorfose e malformações são altamente significativos ($F = 6.265$, $P <$

0,001, Wilk's Lambda = 0.164). As ANOVAS também são significantes para as duas variáveis (F = 15.151, P < 0.001; F = 4.812; P < 0.001, respectivamente), existindo diferenças nos efeitos entre os tratamentos.

Dez réplicas não tiveram sobreviventes, sendo cinco no tratamento C2PADB, que foi utilizado apenas para sobrevivência até a metamorfose e malformações e assim como as outras réplicas, excluídas das análises de tamanho na metamorfose e tempo médio de desenvolvimento.

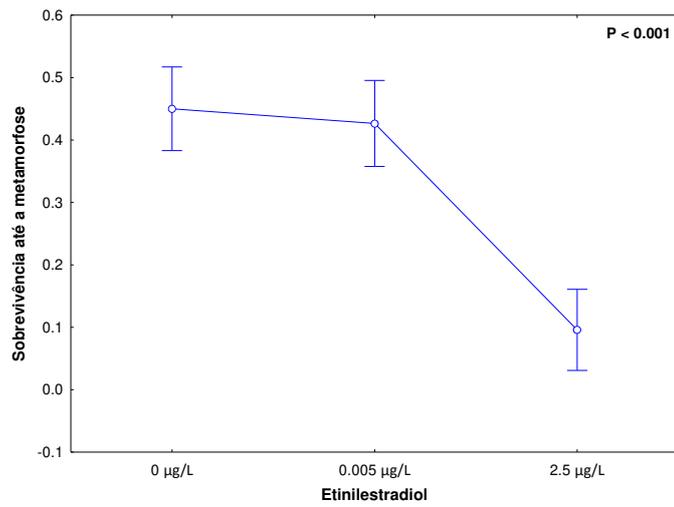
A maior concentração do etinilestradiol causou um efeito negativo sobre a porcentagem de girinos que completaram a metamorfose nos tratamentos (F = 36.616, P < 0.001) (Figura 11a), assim como em densidade alta (F = 43.031, P < 0.001) (Figura 11b) e, conseqüentemente, para a interação entre esses fatores (F = 18.456, P < 0.001) (Figura 11c; Tabela 2 e 3). Não houve efeito significativo para o fator predador e suas interações com outros fatores (Tabela 3).

Tabela 2 – ANOVAs dos efeitos do etinilestradiol, densidade e predador sobre a porcentagem de girinos de *Physalaemus cuvieri* que alcançaram o final da metamorfose.

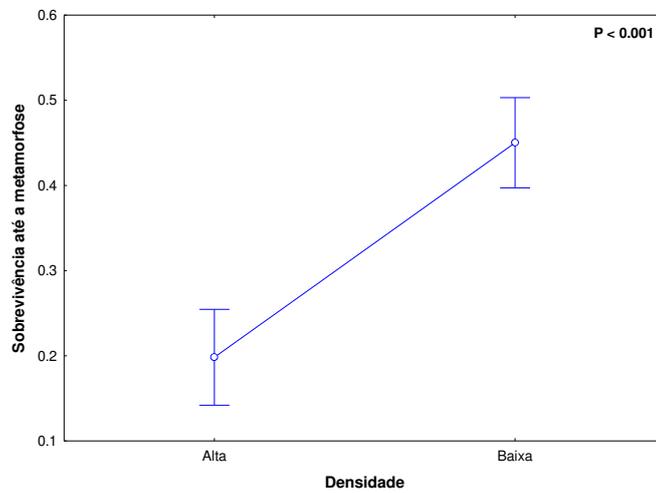
Fatores	Valor de F	Valor de P
Etinilestradiol	36.616	< 0.001
Densidade	43.031	< 0.001
Predador	0.026	0.87
Etinilestradiol x Densidade	18.456	< 0.001
Etinilestradiol x Predador	1.251	0.295
Densidade x Predador	0.023	0.88
Etinilestradiol x Densidade x Predador	0.721	0.491

Tabela 3 - Valores de P para as comparações pareadas com o *post hoc* de Tukey para os efeitos do etinilestradiol e da densidade no número de indivíduos de *Physalaemus cuvieri* que alcançaram o final da metamorfose.

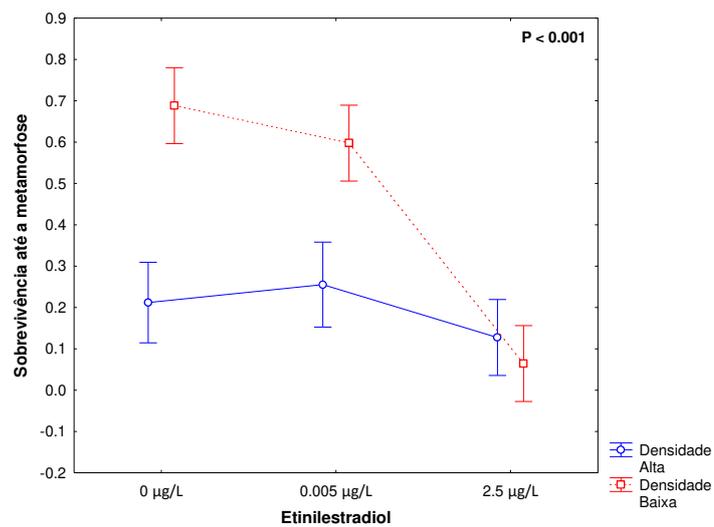
	Etinilestradiol	Densidade	1	2	3	4	5	6
1	0 µg/L	Alta	1.000	< 0.001	0.987	< 0.001	0.812	0.260
2	0 µg/L	Baixa	< 0.001	1.000	< 0.001	0.723	< 0.001	< 0.001
3	0,005 µg/L	Alta	0.987	< 0.001	1.000	< 0.001	0.433	0.078
4	0,005 µg/L	Baixa	< 0.001	0.723	< 0.001	1.000	< 0.001	< 0.001
5	2,5 µg/L	Alta	0.812	< 0.001	0.433	< 0.001	1.000	0.923
6	2,5 µg/L	Baixa	0.260	< 0.001	0.078	< 0.001	0.923	1.000



A



B



C

Figura 11. Efeitos do etinilestradiol, densidade e a interação entre eles sobre a porcentagem (arcoseno da raiz) de girinos de *Physalaemus cuvieri* que alcançaram o final da metamorfose. A – Efeito do etinilestradiol, B – Efeito de densidade e C – Efeito da interação entre etinilestradiol e densidade.

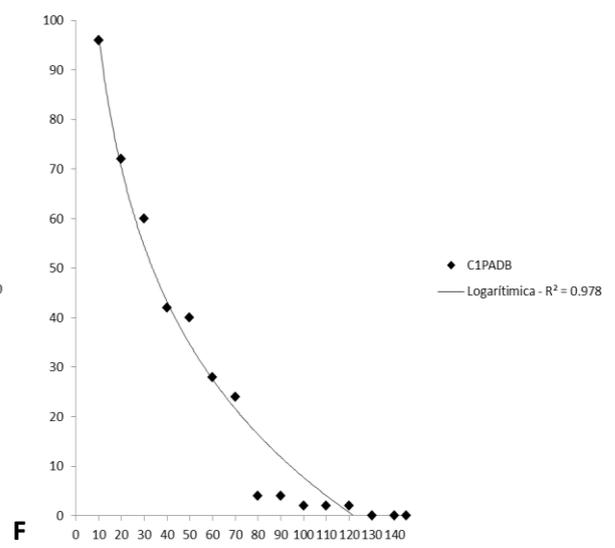
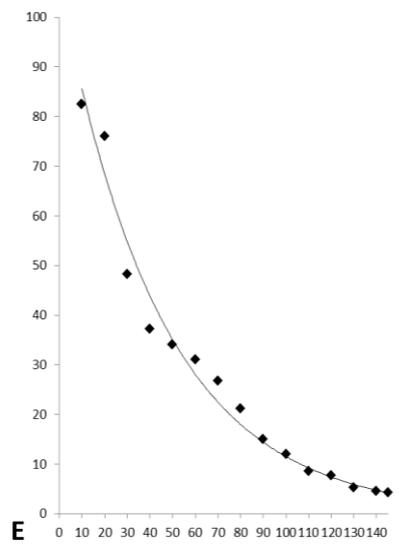
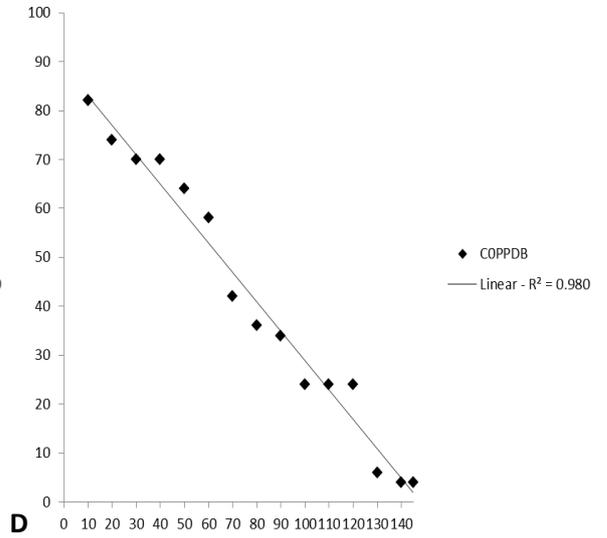
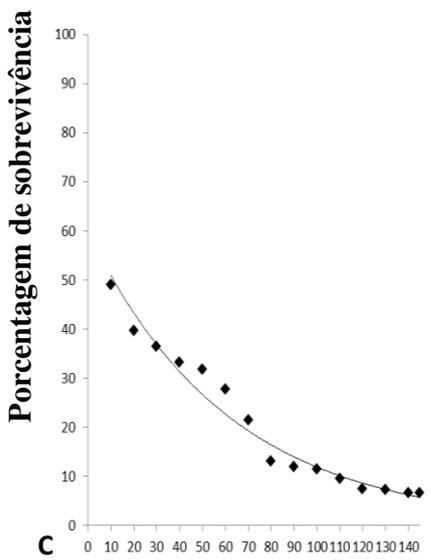
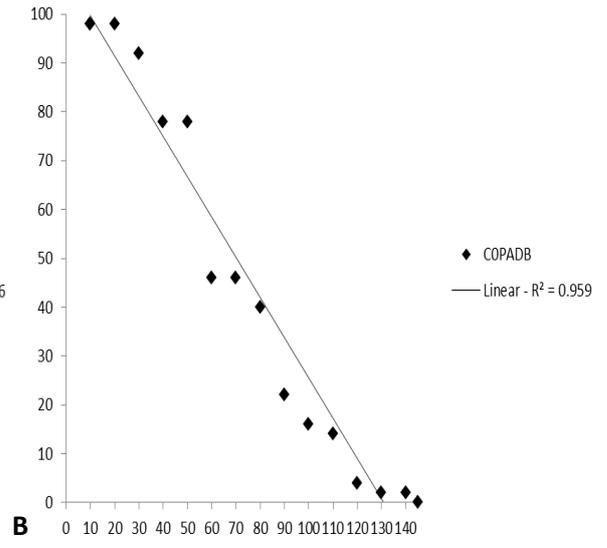
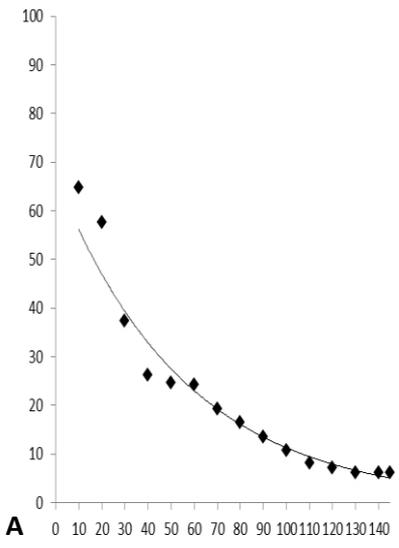
5.2.1 Sobrevivência dos girinos não metamorfoseados

A porcentagem de sobrevivência dos girinos foi diminuindo ao longo do experimento, como mostram as linhas de tendências da Figura 12, sendo mais intensa durante os primeiros 30 dias do experimento, principalmente naqueles submetidos a maior concentração de etinilestradiol e densidade alta. Para o controle, as linhas de tendência são exponenciais em densidade alta (Figura 12a e 12c) e lineares (Figura 12b e 12d) em densidade baixa, independente do fator predador, indicando um maior efeito de densidade. Já para os tratamentos com etinilestradiol, na maior concentração, aparecem tendências logarítmicas para densidade alta (Figura 12L) e baixa (Figuras 12J e 12M), mostrando efeito do contaminante sobre a sobrevivência.

Os girinos no estágio 25 apresentaram a maior mortalidade, seguido do estágio 26, como visto na Tabela 4. Os tratamentos com densidade alta foram os únicos que apresentaram sobreviventes ao final do experimento e a maior concentração de etinilestradiol teve as menores taxas de sobrevivência.

Tabela 4 - Número de girinos mortos por estágio de desenvolvimento ao longo do experimento

	Est. 25	Est. 26	Est. 27	Est. 28	Est. 29	Est. 30	Est. 31	Est. 32	Est. 33	Est. 34	Est. 35	Est. 36	Est. 37	Est. 38	Est. 39	Est. 40	Est. 41	Est. 42	Est. 43	Est. 44
C0PADA	270	95	26	12	1	3	0	1	0	0	16	1	0	1	1	3	3	0	2	3
C0PADB	9	3	2	0	1	1	0	0	1	0	2	1	0	2	0	1	1	2	0	2
C0PPDA	267	37	30	3	2	4	2	1	0	0	0	1	1	0	2	2	5	0	2	4
C0PPDB	19	0	1	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	4
C1PADA	239	65	16	5	2	8	0	1	5	0	0	1	0	0	2	1	2	1	3	6
C1PADB	17	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	9
C1PPDA	278	36	3	3	4	2	1	3	0	0	0	4	1	0	1	3	2	1	2	9
C1PPDB	21	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	8
C2PADA	419	26	3	4	1	3	2	3	2	5	0	5	0	0	0	3	1	1	3	6
C2PADB	34	1	2	1	0	0	2	2	2	0	1	1	0	1	0	2	1	0	0	0
C2PPDA	436	22	8	1	3	5	0	2	0	0	0	0	0	3	1	2	0	0	0	2
C2PPDB	41	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1



Dias

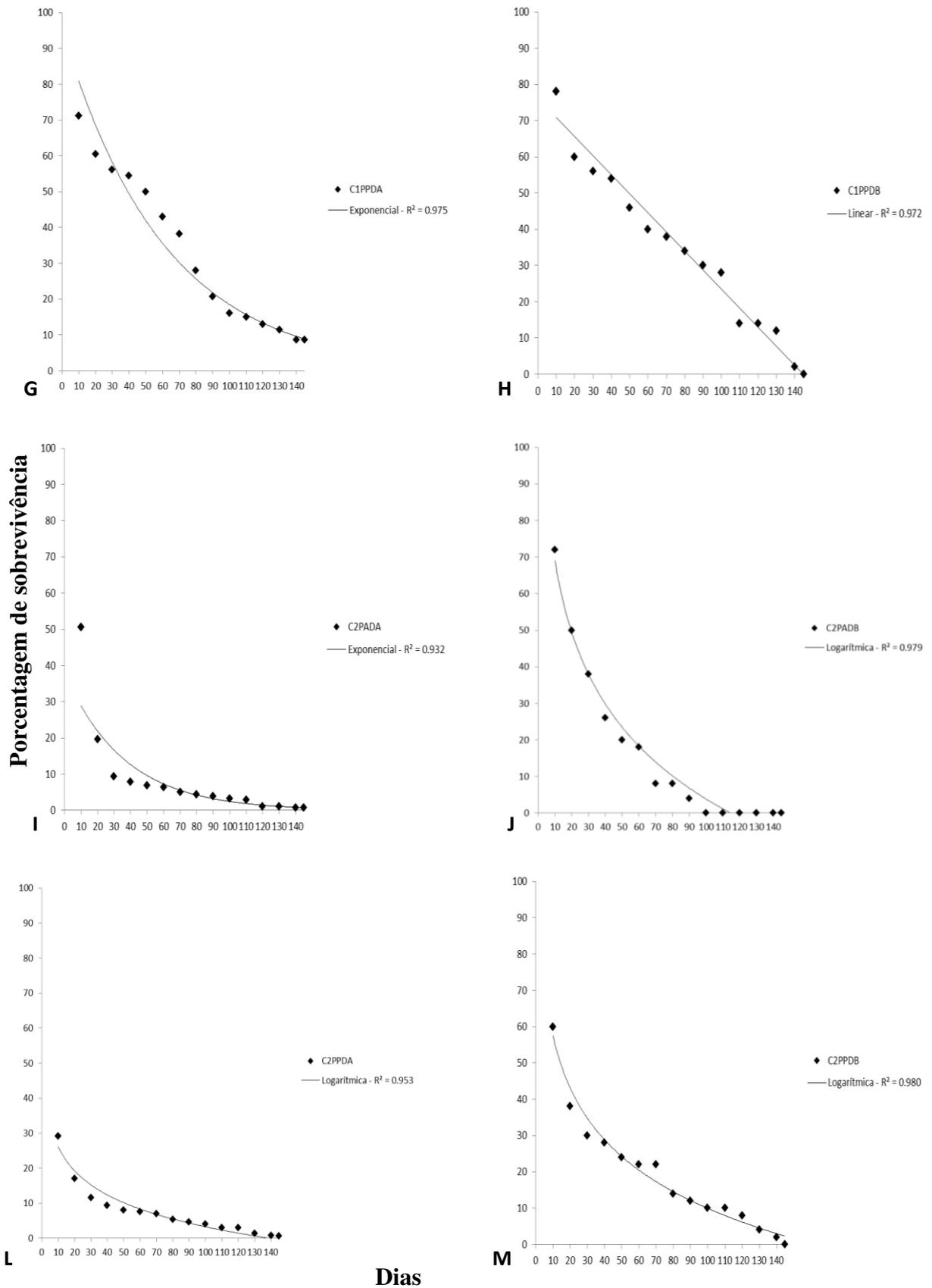


Figura 12. Linhas de tendência para a porcentagem de sobrevivência dos girinos de *P. cuvieri*, em cada tratamento, ao longo dos dias do experimento.

5.3 Malformações

Foram encontrados 70 indivíduos com malformações nos tratamentos, sendo que apenas C2PADB não apresentou nenhum girino malformado. As malformações foram diretamente influenciadas pelo etinilestradiol ($F = 7.957$, $P < 0,001$) (Figura 13a) e densidade ($F = 15.295$, $P < 0.001$) (Figura 13b; Tabela 5), havendo interação entre esses dois fatores, que agiram na diminuição das malformações nos girinos para menor concentração em densidade alta e na maior concentração em densidade alta e baixa (Figura 13c; Tabela 6). Não houve efeito significativo para o efeito isolado do predador e suas interações (Tabela 5).

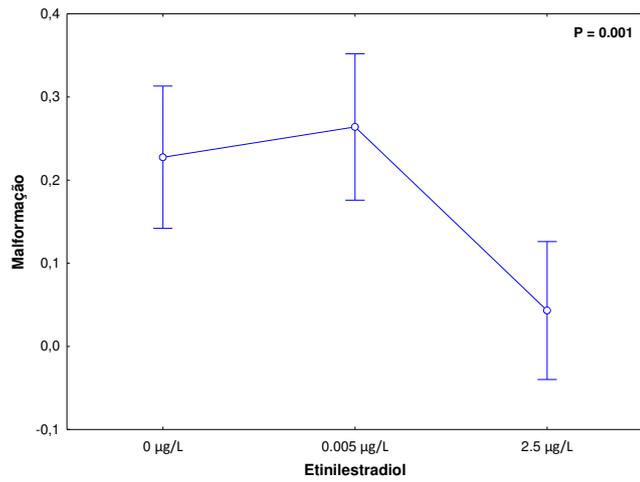
As malformações foram diferenciadas (ver LANNON, 2009 e METEYER, 2000) quanto ao tipo e sua localização, ou ambos, em: Rotação de Membros (RM), Inchaço (IN), Cauda Sinuosa (CS) e Amelia (AM), todas apresentadas na Figura 14. Os indivíduos com RM e AM apresentaram dificuldade na locomoção, sustentação e natação a partir do período final da metamorfose. Já o IN geralmente levou à morte do indivíduo entre os estágios 43 e 45. A porcentagem de cada tipo de malformação por tratamento está representada na Tabela 7.

Tabela 5 - ANOVAS dos efeitos do etinilestradiol, densidade e predador sobre a porcentagem (arcoseno da raiz quadrada) de indivíduos malformados de *Physalaemus cuvieri*.

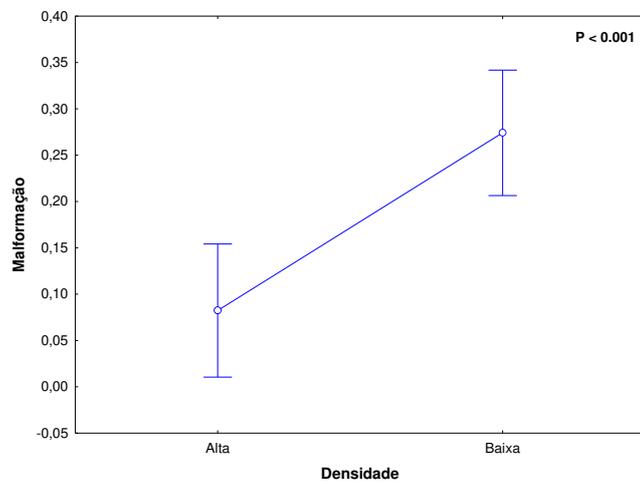
Fatores	Valor de F	Valor de P
Etinilestradiol	7.957	< 0.001
Densidade	15.295	< 0.001
Predador	1.86	0.179
Etinilestradiol x Densidade	5.673	0.006
Etinilestradiol x Predador	0.521	0.597
Densidade x Predador	1.283	0.263
Etinilestradiol x Densidade x Predador	0.003	0.968

Tabela 6 – Valores de P para as comparações pareadas com o *post hoc* de Tukey para os efeitos do etinilestradiol e da densidade no número de indivíduos de *Physalaemus cuvieri* malformados.

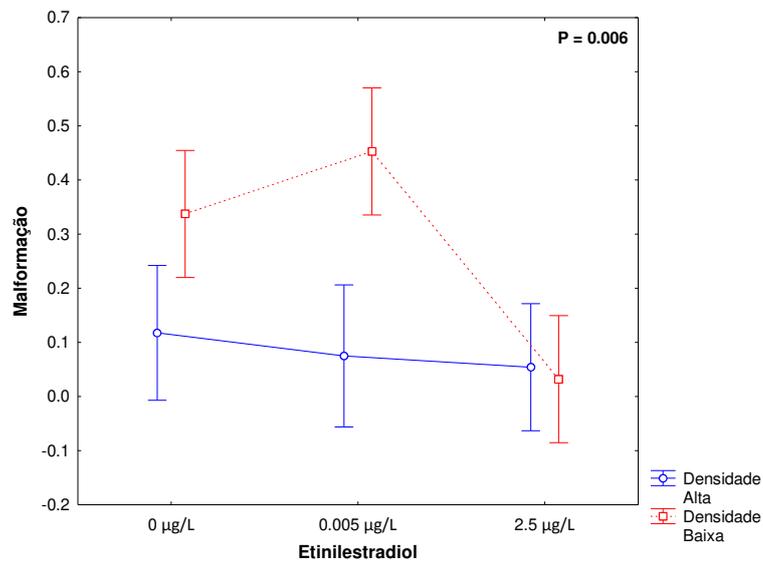
	Etinilestradiol	Densidade	1	2	3	4	5	6
1	0 µg/L	Alta	1.000	0.111	0.998	0.003	0.979	0.923
2	0 µg/L	Baixa	0.111	1.000	0.047	0.726	0.015	0.007
3	0.005 µg/L	Alta	0.998	0.047	1.000	0.001	0.999	0.996
4	0.005 µg/L	Baixa	0.003	0.726	0.001	1.000	< 0.001	< 0.001
5	2.5 µg/L	Alta	0.979	0.015	0.999	< 0.001	1.000	0.999
6	2.5 µg/L	Baixa	0.923	0.007	0.996	< 0.001	0.999	1.000



A



B



C

Figura 13 – Efeitos do etinilestradiol, densidade e a interação entre eles sobre a porcentagem (arcoseno da raiz) de indivíduos malformados de *Physalaemus cuvieri*. A – Efeito do etinilestradiol, B – Efeito de densidade e C – Efeito da interação entre etinilestradiol e densidade.

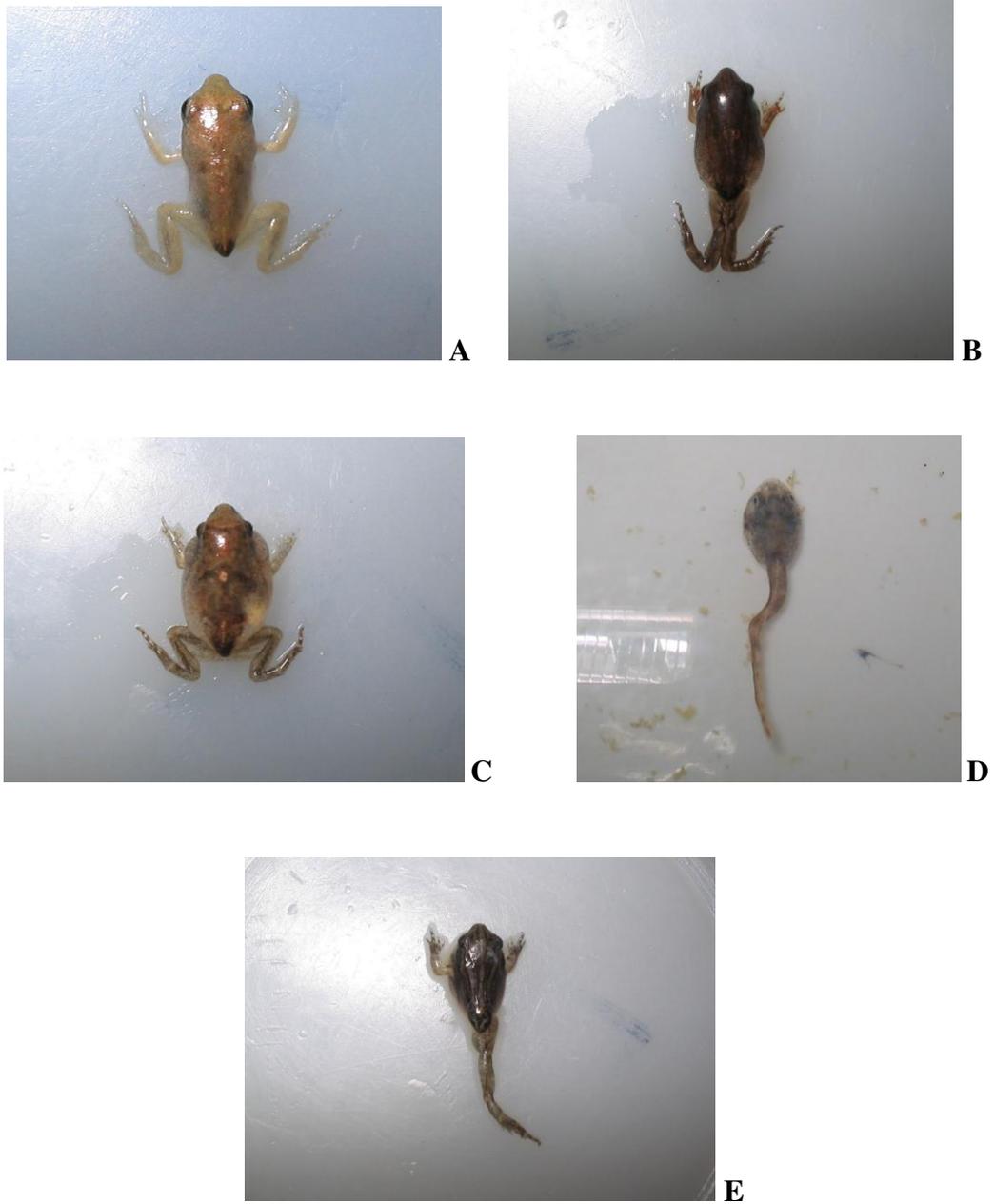


Figura 14 - Tipos de malformações encontradas em indivíduos de *P. cuvieri* utilizados no experimento. A – Indivíduo normal, B – Rotação de Membros (RM), C – Inchaço (IN), D – Cauda Sinuosa (CS) e E – Amelia (AM). Fotos: Anderson Pires Ferreira.

Tabela 7 - Porcentagem dos tipos de malformações encontradas por tratamento nos girinos de *P. cuvieri* durante o experimento.

	Rotação de Membros (RM)	Inchaço (IN)	Cauda (CA)	Amelia (AM)
C0PADA	8.6%	0%	0%	1.4%
C0PADB	7.1%	1.4%	0%	0%
C0PPDA	11.4%	1.4%	0%	0%
C0PPDB	11.4%	0%	0%	0%
C1PADA	1.4%	0%	1.4%	0%
C1PADB	14.2%	0%	0%	0%
C1PPDA	4.3%	1.4%	0%	0%
C1PPDB	20%	0%	0%	2.9%
C2PADA	5.7%	1.4%	0%	0%
C2PADB	0%	0%	0%	0%
C2PPDB	1.4%	0%	0%	0%
C2PPDA	2.9%	0%	0%	0%
Total	88,4%	5.6%	1.4%	4.3%

5.4 Tempo de desenvolvimento

O tempo mínimo de desenvolvimento foi de 25 dias e o máximo de 145 dias. Ocorreu um aumento significativo do tempo médio de desenvolvimento relacionado aos fatores: Predador ($F = 16.011$, $P < 0.001$) (Figura 15a) e densidade ($F = 14.688$, $P = 0.001$) (Figura 15b), sendo que a interação desses fatores provoca diminuição do tempo de desenvolvimento na ausência do predador e menor densidade ($F=23.559$, $P < 0.001$) (Figura 15c; Tabela 8 e 9). Também houve interação entre o etinilestradiol e predador ($F = 6.957$, $P = 0.012$), onde ocorreu o retardamento do tempo de metamorfose com o aumento da concentração do hormônio na presença do predador (Figura 15d; Tabela 8 e 9). Não ocorreu interação entre etinilestradiol, predador e densidade (Tabela 8).

Tabela 8 - ANOVAs dos efeitos do etinilestradiol, densidade e predador sobre o tempo de desenvolvimento médio até a metamorfose de girinos de *Physalaemus cuvieri*.

Fatores	Valor de F	Valor de P
Etinilestradiol	0.067	0.797
Densidade	14.688	0.001
Predador	16.011	< 0.001
Etinilestradiol x Densidade	1.536	0.224
Etinilestradiol x Predador	6.957	0.001
Densidade x Predador	23.559	< 0.001
Etinilestradiol x Densidade x Predador	3.484	0.07

Tabela 9 - Valores de P para as comparações pareadas com o *post hoc* de Tukey para os efeitos do etinilestradiol e do predador no tempo de desenvolvimento médio dos girinos de *Physalaemus cuvieri* que alcançaram o final da metamorfose.

	Etinilestradiol	Predador	1	2	3	4	5	6
1	0 µg/L	Presente	1.000	0.900	0.702	0.127	0.051	0.805
2	0 µg/L	Ausente	0.900	1.000	0.157	0.636	0.005	0.946
3	0.005 µg/L	Presente	0.702	0.157	1.000	0.004	0.505	0.464
4	0.005 µg/L	Ausente	0.127	0.636	0.004	1.000	< 0.001	1.000
5	2.5 µg/L	Presente	0.051	< 0.001	0.505	< 0.001	1.000	0.130
6	2.5 µg/L	Ausente	0.805	0.946	0.464	1.000	0.130	1.000

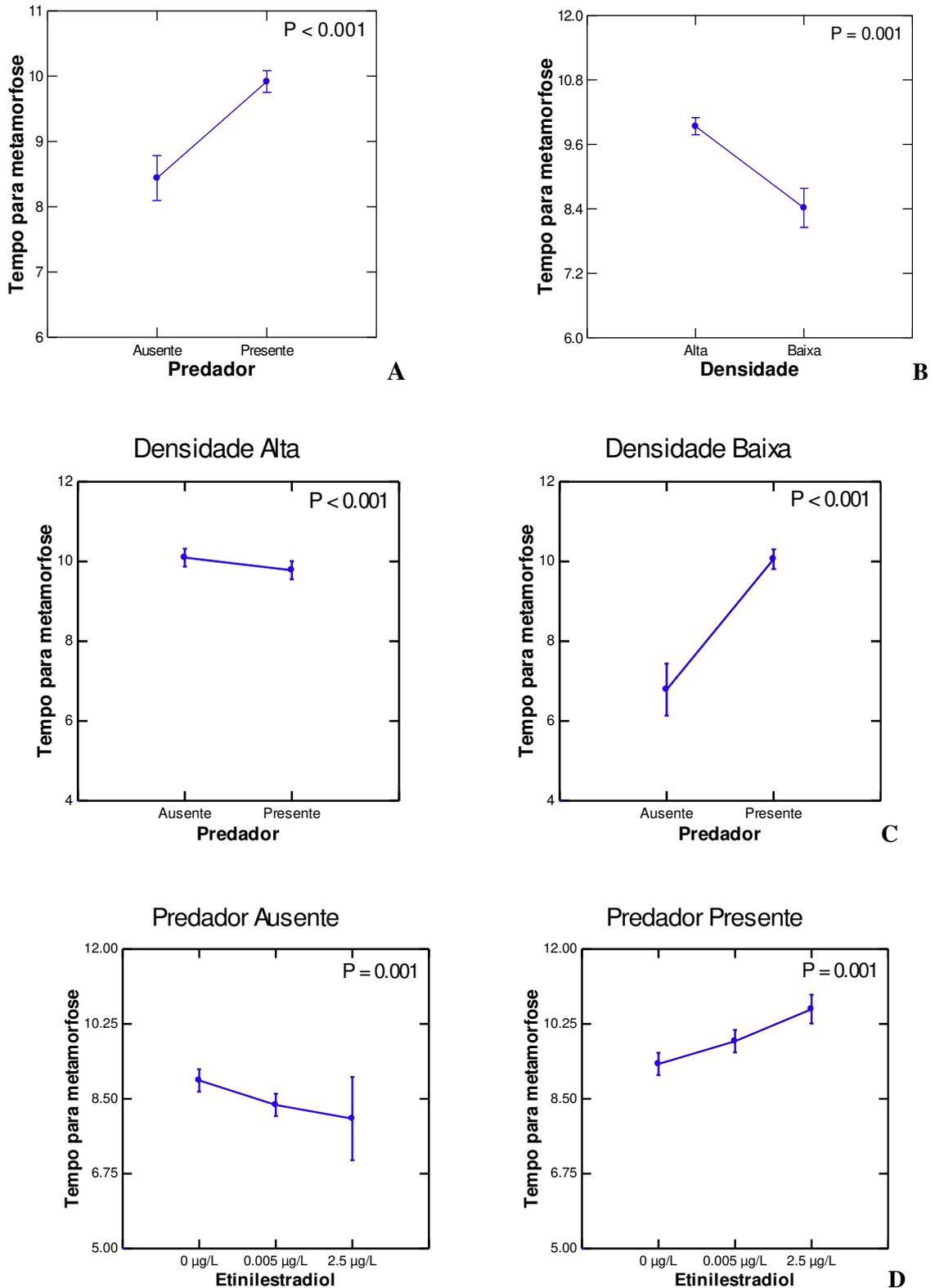


Figura 15 - Efeitos do etinilestradiol, predador e densidade e a interação entre eles sobre o tempo de desenvolvimento médio até a metamorfose dos girinos de *Physalaemus cuvieri*. A – Efeito do predador, B – Efeito de densidade, C – Efeito da interação entre predador e densidade e D – Efeito da interação entre etinilestradiol e predador.

5.5 Tamanho na metamorfose

A presença do etinilestradiol causou uma tendência ao aumento do tamanho dos juvenis ao final da metamorfose, mas com baixa significância ($F = 4.161$, $P = 0.049$) (Figura 16a). Também houve efeito do predador ($F = 4.961$, $P = 0.032$) e interação significativa com a densidade ($F = 6.935$, $P = 0.012$), que causou aumento do tamanho para densidade baixa na presença do predador (Figura 16b). Não houve interação significativa entre o hormônio e os estressores naturais (Tabela 10).

Tabela 10 - ANOVAs dos efeitos do etinilestradiol, densidade e predador e suas interações sobre o tamanho médio na metamorfose de girinos de *Physalaemus cuvieiri*.

Tratamentos	Valor de F	Valor de P
Etinilestradiol	4.169	0.049
Densidade	0.173	0.680
Predador	4.961	0.032
Etinilestradiol x Densidade	0.059	0.809
Etinilestradiol x Predador	3.179	0.083
Densidade x Predador	6.935	0.012
Etinilestradiol x Densidade x Predador	3.600	0.066

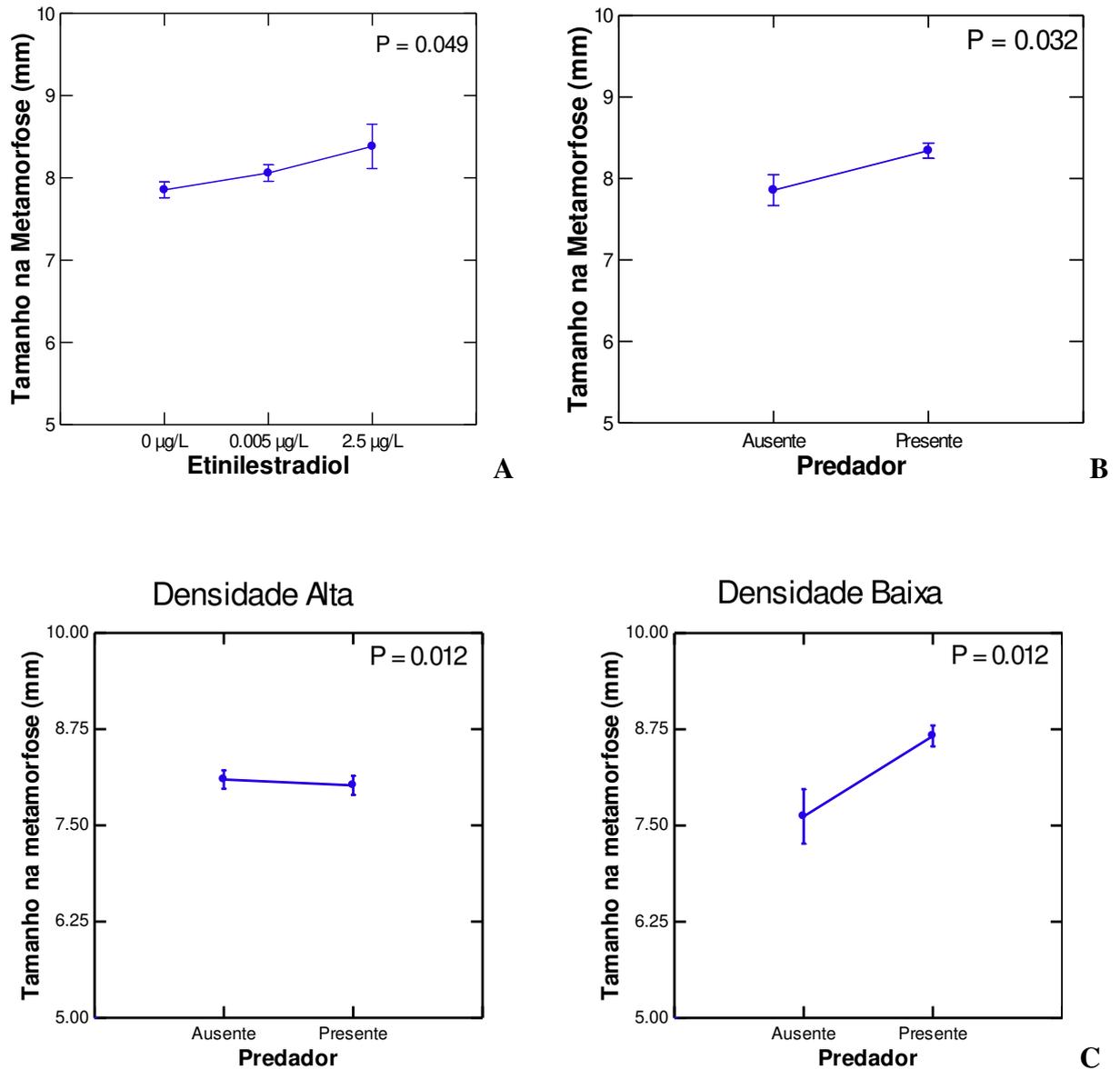


Figura 16. Efeitos do etinilestradiol, predador e a interação entre densidade e predador sobre o tamanho médio ao final da metamorfose dos girinos de *Physalaemus cuvieri*. A – Efeito do etinilestradiol, B – Efeito do predador, C – Efeito da interação entre predador e densidade.

5.6 Razão sexual

Não houve diferença significativa quanto a mudança da razão sexual para machos ($\chi^2=7.789$, $p=0.168$) e para fêmeas ($\chi^2=5.763$, $p=0.329$), não havendo, portanto, feminilização dos girinos expostos ao 17α -etinilestradiol. Foram encontrados somente 3 intersexos, pertencentes aos tratamentos C0PADA, C1PADA e C2PPDA.

6. DISCUSSÃO

6.1 Alterações no pH

O aumento do pH entre as trocas de água pode ser explicado pelo acúmulo de amônia (NH₃) na água, que é excreta nitrogenada dos girinos (ZUG; VITT; CALDWELL, 2001) e também pelas sobras da ração, que juntas alcalinizaram o meio.

6.2 Sobrevivência

Em populações naturais, os girinos apresentam altas taxas de mortalidade, devido a pressões ambientais a qual são submetidos, como densidade e predadores, podendo chegar a uma taxa de apenas 5% de sobrevivência até a metamorfose (SEMLITISCH, 1987; SEMLITISCH et al., 1996). No presente estudo, além dos estressores naturais, os girinos estavam expostos a outras variáveis, como a variabilidade genética entre os indivíduos de desovas diferentes, que pode afetar padrões de desenvolvimento (BLOUIN, 1992). Estes fatores podem explicar a diminuição da sobrevivência nos controles, principalmente quando expostos a densidade alta, fato já encontrado em outros estudos (LOMAN, 2001, 2004; WARNER; DUNSON; TRAVIS, 1991), pois a maior densidade aumenta o estresse e a competição intraespecífica.

Efeitos agudos tendem a aparecer rapidamente, e geram respostas mais rápidas, em tempo mais curto de exposição, ao contrário dos efeitos crônicos (ROBINSON; THORN, 2005). A diminuição acentuada da sobrevivência nos primeiros 30 dias nos tratamentos com a maior concentração de etinilestradiol deve-se ao fato de um efeito agudo que ocorreu durante os primeiros dias da exposição dos girinos. Esse fato é observado em outros estudos com desreguladores endócrinos, no qual maiores doses de pesticidas (BOONE; JAMES, 2003; RELYEA, 2005, 2006), 17 β -estradiol (TAKAHASHI, 1957a, 1957b) ou etinilestradiol (MACKENZIE et al., 2003), causaram queda na sobrevivência dos girinos. A interação com densidade alta, também acarretou na diminuição da sobrevivência.

O estágio 25 corresponde ao período de início da alimentação independente e as larvas ainda apresentam um tamanho bastante reduzido (GOSNER, 1960; MCDIARMID; ALTIG, 1999), podendo ser mais sensíveis à exposição a contaminantes (BERRIL et al., 1995;

PAULI; COULSON; BERRIL, 1999). Os girinos de *P. cuvieri* parecem ter essa maior sensibilidade ao etinilestradiol e aos agentes estressores a que foram submetidos nos estágios iniciais pós-embrião, o que pode ter contribuído para a diminuição da sobrevivência durante os estágios 25 e 26.

O menor número de girinos sobreviventes expostos a 2,5µg/L de etinilestradiol reflete o poder de letalidade deste desregulador endócrino em concentrações equiparadas a outros hormônios encontrados em águas superficiais no Brasil, como o 17β-estradiol (SODRÉ et al., 2007) e em concentrações menores do que as usadas em outros experimentos (TAKAHASHI, 1957a, 1957b, 1958). Apesar dos estudos encontrarem concentrações menores que 2,5µg/L de etinilestradiol em estações de tratamento ou águas superficiais (BELFROID et. al., 1999; BRANDE-LAVRIDSEN, 2008; KOLPIN et al., 2002), ainda pouco se conhece sobre o status atual desse contaminante em várias regiões do mundo, principalmente naquelas onde as condições da coleta e tratamento do esgoto são muito deficientes e o lixo e efluentes são despejados sem nenhum tratamento em corpos d'água (KOLPIN et al., 2002; SODRÉ et al., 2007). Esse fator, aliado ao constante aumento do consumo de pílulas contraceptivas (PEDRO, 2003) e conseqüente maior eliminação no ambiente, tendem a crescer as concentrações do etinilestradiol em águas superficiais, pois os métodos para o seu tratamento ainda são pouco eficientes (KOLPIN et al., 2002).

Hormônios esteroides podem possuir maior poder de transpassar as membranas celulares e se acumularem nos tecidos, devido a sua afinidade com lipídios (DUFFUS, 2006). A ninfa de libélula, por estar em contato direto com a água contaminada pelo etinilestradiol e ser um animal de porte bem maior que os girinos, pode ter absorvido uma parte do hormônio através dos seus tecidos, como nas brânquias retais, em que a água é passada constantemente para a absorção de oxigênio, fato já observado quando as ninfas são expostas a contaminação do meio com Cobre (SMITA; DUTTA; DUTTA, 2010). Isso provoca a diminuição do hormônio dissolvido na água e também pode ser uma das causas da tendência a menor quantidade de girinos sobreviventes nos tratamentos com ausência de predador e na maior concentração, que podem ter tido maiores concentrações hormonais, chegando a ter 0% de sobrevivência para o tratamento C2PADB, onde ocorreu maior absorção do etinilestradiol.

A diminuição da taxa natural de sobrevivência dos girinos acarreta o menor sucesso reprodutivo e conseqüente diminuição gradual da população (ROSE, 2005). Logo, em poças

menores, onde a densidade de girinos pode ser maior, a presença do etinilestradiol pode levar a menores taxas de sobrevivência do que poças com menor densidade.

6.3 Malformações

Populações naturais, que vivem em ambientes não contaminados, podem apresentar alguns tipos de malformações, mas que geralmente não ultrapassam a proporção de 5% do tamanho da população (BLAUSTEIN; JONHSON, 2003). Essas malformações são decorrentes de mutações ou erros no desenvolvimento, que, geralmente, acarretam perda de dígitos e membros (BLAUSTEIN; JONHSON, 2003). Portanto, a presença de girinos e juvenis malformados neste experimento é algo esperado, ainda mais, quando reforçado pelo fato de que as desovas coletadas eram amostras de populações diferentes. As taxas de malformações maiores que 5% nos tratamentos controle, também pode ter tido influência das condições artificiais de criação dos girinos, que podem sofrer maiores níveis de estresse e deficiência de nutrientes essenciais, que estão presentes em seu habitat natural (LANNOO, 2009).

Na literatura, vários estudos ligam a exposição à desreguladores endócrinos com a presença de anormalidades físicas em anfíbios (ALVAREZ; HONRUBIA; HERRAREZ, 1995; BURKHAT et al., 1998; CAMPBELL, 1999; COOKE, 1981; RZEHAK; MARYANSKA-NADACHOWSKA; JORDAN, 1977; SOWER; REED; BABBITT, 2000). Outros estudos confirmam a presença de malformações em rãs metamorfoseadas expostas ao hormônio estradiol na água em ambientes naturais (PARK; KIDD, 2005; SHAPPELL, 2006) ou em experimentos de laboratório (TAKAHASHI 1957a, 1957b, 1958), em concentrações bem superiores a 2,5µg/L. Apesar disso, no presente estudo temos uma diminuição das malformações na presença do etinilestradiol, principalmente na maior concentração, o que pode está ligada a diminuição da sobrevivência na presença do hormônio, principalmente durante os 30 primeiros dias do experimento. Este fato pode ter proporcionado à seleção de indivíduos mais resistentes, além de ter diminuído o número de indivíduos que sobreviveram por mais tempo expostos aos agentes estressores.

O maior tempo de exposição a baixas concentrações pode levar ao aparecimento de efeitos crônicos, que podem não ocorrer quando expostos a altas concentrações que provocam efeitos agudos (ROBINSON; THORN, 2005). Como a diferença entre as concentrações

utilizadas é bem grande, a ocorrência de um efeito crônico nos girinos expostos a 0,005 µg/L de etinilestradiol também pode explicar o aumento das malformações nesses tratamentos.

Quanto à densidade, o menor número de girinos em baixa densidade, pode ter levado a maior absorção do hormônio por esses na menor concentração, enquanto que para alta densidade, além da maior absorção, o maior número de indivíduos aumentou a competição e também diminuiu a sobrevivência, selecionando indivíduos mais fortes e resistentes, que pode ter sido decisivo na interação com os efeitos do etinilestradiol.

Diferentes tipos de malformações físicas causadas por desreguladores endócrinos são relatados para anfíbios (BLAUSTEIN; JOHNSON, 2003; CAMPBELL, 1999; METEYER, 2000) principalmente nos Estados Unidos, onde existe uma relação muito grande com a presença de pesticidas e indivíduos com anormalidades (METEYER, 2000). Quanto ao efeito de um estrogênio, a sensibilidade das células e tecidos está diretamente envolvida no processo de malformações (YAMUCHI; PRAPUNPOJI; RICHARDSON, 2000). Takahashi (1958) descreve os efeitos de 1,5 mg/L de 17β-estradiol em rãs da espécie *Rana temporaria*, que levou a atrofia, ausência de membros e dificuldade natatória, o que pode justificar a tendência a maior quantidade de malformações quando expostos a 0,05 µg/L de etinilestradiol. Essa atrofia é causada pelo mau desenvolvimento de ossos e pela ausência e fraqueza de músculos, que também podem ser causadas pela falta de algum nutriente essencial para o pleno desenvolvimento do girino (BLAUSTEIN; JOHNSON, 2003; LANNOO, 2009; TAKAHASHI, 1957b, 1958). A falta de nutrientes pode ter sido o principal fator causador das malformações, para todos os tratamentos.

A presença de taxas de malformações acima do normal durante o desenvolvimento de girinos, compromete a manutenção do tamanho populacional, pois geralmente, na natureza, a maioria desses indivíduos não atinge o final da metamorfose, sendo presas fáceis ou morrendo por conta das suas deficiências e, se sobreviver, provavelmente não irá se reproduzir ou atingir a maturidade sexual (BLAUSTEIN; JOHNSON, 2003; CAMPBELL, 1999; LANNOO, 2009). Portanto, a presença do 17α-etinilestradiol e sua interação com a densidade são fatores que podem vir a diminuir ainda mais a sobrevivência dos girinos em desenvolvimento, rompendo com o equilíbrio de populações e podendo levá-las a um declínio.

6.4 Tempo de desenvolvimento

O crescimento e desenvolvimento dos girinos estão estritamente ligados com as suas relações filogenéticas e evolutivas, que podem ser alteradas com as pressões seletivas a qual estão submetidos no ambiente (BUCHHOLZ; HAYES, 2002; KIKUYAMA et al., 1993). Fatores externos podem acarretar a aceleração ou retardamento da metamorfose e a ponderação desse tempo é um desafio muito grande aos girinos, como, por exemplo, o maior tempo na poça promove maior consumo de alimento e melhor vigor para metamorfose, mas em contrapartida, aumenta o risco de predação ou contaminação (ROSE, 2005). Estudos demonstram que a presença de predadores altera o comportamento de organismos aquáticos, como as larvas de anfíbios, que podem evitar o contato com o predador através de restrição espacial, levando-as a reduzir o forrageamento e as taxas metabólicas, aumentando o seu período larval (LAURILA; KUJASALO; RANTA, 1997; NICIEZA, 2000; WERNER et al., 1983; PEACOR, 2002), como visto nos tratamentos com ninfa de libélula do presente estudo.

A densidade de girinos em uma poça natural é de relevante importância no equilíbrio das taxas de competição, como por exemplo, a disputa por recursos alimentares limitados (GRIFFITHS; DENTON; WANG, 1993; ROSE, 2005), mas apesar da competição por alimento ter sido equilibrada no presente experimento, outros fatores de competição e dependentes de densidade como: quantidade de oxigênio dissolvido, quantidade de químicos oriundos das excretas, disputa por espaço e aumento de choques físicos (LANNON, 2009), sendo que em densidade alta tínhamos dez vezes mais girinos, também são essenciais para o desenvolvimento dos girinos, estando estritamente ligado com o aumento do tempo de desenvolvimento nesses tratamentos.

Fisiologicamente, o crescimento está ligado com os produtos de redes complexas de hormônios, enzimas, fatores de crescimento e fatores de transcrição, que regulam a expressão do gene de diferenciação celular (BROWN; FRYE, 1969; HOGAN et al., 2008; KIKUYAMA et al., 1993). Ainda não há um consenso sobre a influencia de hormônios sexuais sobre o desenvolvimento de anfíbios, mas estudos mostram que a exposição ao estradiol (GRAY; JANSSENS, 1990) e etinilestradiol (BRANDE-LAVRIDSEN; CHRISTENSEN-DALSGAARD; KOLSGAARD, 2010; HOGAN et al., 2008) atrasam a metamorfose, o que deve estar ligado a desregulações de funções endócrinas, principalmente da tireóide, produtora do hormônio tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), que induz e regula a metamorfose

(GRAY; JANSSENS, 1990; HAYES, 1997; RICHARDS; NACE, 1978), logo, o etinilestradiol pode estar diretamente ligado com a inibição da tireóide e o consequente atraso do desenvolvimento larval. Diante desses fatores, o efeito do predador torna os girinos mais suscetíveis e maximiza os efeitos do hormônio, que não causou efeitos individualmente, levando ao retardamento da metamorfose nos girinos e sobrepondo a tendência natural de aceleração da metamorfose sobre a exposição ao contaminante (ROSE, 2005).

O atraso no desenvolvimento larval acarreta sérios problemas para o sucesso reprodutivo de populações de anuros, pois apesar da alta plasticidade da metamorfose, que pode variar o seu tempo de acordo com as pressões ambientais, a permanência por mais tempo na poça trás maiores riscos de predação, secamento da poça e deficiência na quantidade de alimento disponível (SEMLITSCH et al., 1987). Também pode causar menor tamanho dos metamorfos e adultos, interferindo diretamente no sucesso reprodutivo.

6.5 Tamanho na metamorfose

O fato do maior tamanho ocorrer em tratamentos com a maior concentração de etinilestradiol implica uma relação direta da sua ação desreguladora sobre o organismo do girino. Apesar de ainda existirem controvérsias sobre o principal hormônio que atua no crescimento de girinos durante a pré-metamorfose, as pesquisas apontam a prolactina (PRL) e o hormônio de crescimento (“GH”) como os responsáveis por esse metabolismo (HOGAN et al., 2008). A prolactina age inibindo o hormônio tiroxina, que é responsável pela metamorfose, promovendo o crescimento, sendo, portanto, mais ativo nos estágios que antecedem a fase de pró-metamorfose (KIKUYAMA et al., 1993). Estudos demonstram a estimulação da produção e expressão de PRL e GH em peixes (ELANGO; SHEPHERD; CHEN, 2006; TRUDEAL et al., 1992) expostos ao estradiol, o que corrobora para hipótese do etinilestradiol também agir como indutor da produção destes hormônios (HOLGAN et al., 2008; KIKUYAMA et al., 1993; WHITE; NICHOLL, 1981). Quando se inicia a pró-metamorfose, a tireoide é estimulada pelo TSH (Hormônio Estimulante da Tireoide), produzindo tiroxina, que provoca a maturação do centro inibitório de prolactina no hipotálamo, acarretando na inibição da produção de PRL e GH (NORRIS, 2006). Portanto, o etinilestradiol pode ter estimulado a produção dos hormônios de crescimento, fazendo com

que os girinos crescessem mais e demorassem mais para iniciar a pró-metamorfose (devido ao bloqueio da tiroxina) nos tratamentos que receberam o contaminante.

Como discutido anteriormente, os estudos demonstram que a presença não letal do predador causa efeitos negativos sobre os girinos, podendo levar a redução no crescimento (PEACOR, 2002), mas, o aumento no tempo de desenvolvimento pode ter causado um efeito positivo no tamanho, pois apesar de uma possível diminuição nas taxas metabólicas, a permanência por mais tempo no aquário levou ao aumento do tamanho dos metamorfoseados na presença do predador e densidade baixa, aumento que é similar ao ocorrido com a variável tamanho na metamorfose.

Na natureza, os girinos chegando com um maior tamanho ao final da metamorfose, pode lhes proporcionar maior aptidão para sobreviver no ambiente terrestre, influenciando até mesmo na maturidade sexual do adulto. Mas, o fato das larvas passarem mais dias para concluir a metamorfose, faz com que aumente os riscos de sobrevivência, como predação, seca mento da poça e disponibilidade de recursos. (NICIEZA, 2000).

6.6 Razão sexual

Estudos demonstram que os hormônios são de grande importância no desenvolvimento reprodutivo dos anfíbios. Os esteroides sexuais agem diretamente na formação e diferenciação de gônadas e, em várias espécies, isso ocorre durante os primeiros estágios da metamorfose (HAYES, 1998; HOGAN et al., 2008). Logo, a exposição ao estrogênio durante essa fase, pode causar mudança no sexo, com reversão ou anormalidade de gônadas (GOTO et al., 2006; HOGAN et al., 2008; MACKENZIE et al., 2003; PARK; KIDD, 2005; TAKAHASHI, 1958). Apesar da literatura demonstrar a feminilização parcial ou completa de girinos expostos ao etinilestradiol, em concentrações inferiores a 2,5µg/L para a espécie *Rana pipens* (HOGAN et al., 2008; MACKENZIE et al., 2003) e *Xenopus tropicalis* (PETTERSSON, et al., 2006), não houve mudança na razão sexual para a espécie *Rana sylvatica* (MACKENZIE et al., 2003), o que mostra que dosagens iguais ou semelhantes agem de forma diferentes em cada espécie. Portanto, as concentrações de etinilestradiol na qual foram submetidos os girinos de *P. cuvieri*, não foram suficientes para causar feminilização e mudanças na razão sexual quando comparadas ao controle. É importante salientar, também, que todos esses estudos foram feitos com espécies de regiões temperadas, que possuem características de vida diferentes das

espécies tropicais. A presença de apenas três intersexos é um número muito baixo para inferirmos sobre a atuação do composto estudado na formação das gônadas desses indivíduos e apesar dos efeitos dessa aberração ainda serem pouco conhecidos, ela pode atuar diretamente no comportamento e sucesso reprodutivo do adulto (HOGAN et al, 2008).

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no experimento fatorial que testou as interações entre 17 α -etinilestradiol, presença de predador e diferentes densidades sobre o desenvolvimento larval de *Physalaemus cuvieri*, permite concluir que:

- A exposição de girinos dessa espécie a concentrações de etinilestradiol semelhantes às de outros estrogênios encontrados na natureza, é capaz de causar diminuição da sobrevivência dos girinos, e aumento no tamanho dos juvenis metamorfoseados;
- Além de proporcionar danos quando estudado isoladamente, o etinilestradiol causou efeitos diferentes dependendo da ação de estressores naturais presente no ambiente, como predadores e diferentes densidades de girinos;
- As malformações estiveram presentes no controle, mas nos tratamentos com maiores doses de etinilestradiol elas diminuíram, ocorrendo o inverso na menor concentração, que pode ser devido à presença de um efeito agudo para maior dosagem e crônico para a menor dosagem sobre a taxa de sobrevivência;
- Os membros foram os mais afetados pelas malformações, o que acarretou dificuldades para chegar ao final do desenvolvimento, devido a diminuição da capacidade natatória, locomoção e sustentação, o que comprometeria o desenvolvimento e sucesso reprodutivo do adulto;
- A sobrevivência caiu bastante durante os 30 primeiros dias de experimento, principalmente na maior dosagem de etinilestradiol e em densidade alta, que demonstra um efeito agudo do hormônio em maior concentração e o efeito dependente de densidade;
- Os estágios 25 e 26 tiveram menor sobrevivência, pelo efeito agudo do hormônio aliado a densidade alta e a maior sensibilidade dos girinos nessa fase;

- A maioria dos girinos que chegaram a metamorfose pertenceram ao controle e a menor concentração de etinilestradiol, principalmente na ausência do predador e densidade baixa, que reflete o resultado da menor sobrevivência em tratamentos com maior estresse;
- O tempo de metamorfose também foi alterado, sendo os girinos submetidos aos tratamentos com densidade alta, presença do predador e etinilestradiol demorando mais para metamorfosear, que pode estar ligado a desregulação dos mecanismos hormonais, como a inibição de tiroxina e os efeitos ligados a predação e densidade;
- A presença do predador agiu aumentando o tempo de desenvolvimento dos girinos, que acarretou em maior crescimento, apesar do estresse a que foram submetidos;
- Não houve mudança na razão sexual dos girinos quando comparados com o controle, que apesar de ser um resultado não esperado, é registrado na literatura para outras espécies;
- Os girinos apresentaram maior tamanho do corpo quando expostos as altas dosagens de etinilestradiol, o que pode ser devido à estimulação da produção de hormônios de crescimento pelo etinilestradiol.

8. REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, C. A.; SILVA, M. A.; TORRES, R. A. Curvas de crescimento de rãs-pimenta, *Leptodactylus labyrinthicus* (SPIX, 1824). **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 20, n. 1, p. 47-54, 1991.

ALVAREZ, R.; HONRUBIA, M. P.; HERRAEZ, M. P. Skeletal malformations induced by the insecticides ZZ-Aphox and Folidol during larval development of *Rana perezii*. **Archives of Environmental Contaminants and Toxicology**, v.28, p. 349-356, 1995.

ANDRADE, G. V. **Reprodução e vida larvária de anuros (Amphibia) em poça de área aberta na Serra do Japi, Estado de São Paulo**. 1987. 157 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1987.

ANDRADE, G. V. **A História de Vida de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) em um Ambiente Temporário**. 1995. 176 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1995.

BACHMANN CHRISTIANSEN, L.; WINTHER-NIELSEN, M.; HELWEG, C. Feminisation of fish: the effect of estrogenic compounds and their fate in sewage treatment plants and nature. **Danish Environmental Protection Agency**, n. 729, 184 p., 2002.

BARONTI, C.; CURINI, R.; D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; SAMPERI, R. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. **Environmental Science and Technology**, v. 34, p. 5059-5066, 2000.

BARRETO, L.; ANDRADE, G. V. Aspects of the reproductive biology of *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in northeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 16, p. 67-76, 1995.

BEBEE, T. J. C.; GRIFFITHS, R. A. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology. **Biological Conservation**, v. 125, p. 271-285, 2005.

BEGON, M., TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. **Ecologia de indivíduos a ecossistemas**. 4ª Edição. Porto Alegre: Artmed S/A, 738 p., ISBN: 9788536308845, 2006.

BELFROID, A. C.; VAN DER HORST, A.; VETHAAK, A. D.; SCHÄFER, A. J.; RIJS, G. B. J.; WEGENER, J.; COFINO, W. P. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. **The Science of the Total Environment**, vol. 225, p. 101-108, 1999.

BENOTTI, M. J.; STANFORD, B. D.; WERT, E. C., SNYDER, S. A. Evaluation of a photocatalytic reactor membrane pilot system for the removal of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds from water. **Water research**, v. 43, p. 1513–1522, 2009.

BERRIL, M.; BERTRAM, S.; COULSON, D.; KOLOHON, M.; OSTRANDER, D.; PAULI, B. Comparative sensitivity of amphibian tadpoles to single and pulsed exposures of the forest-use insecticide fenitrothion. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.14, n.6, p. 1011-1018, 1995.

BIANCO, B.; CHRISTOFOLINI, D. M.; SOUZA, A. M. B.; PARENTE, C. B. O papel dos desreguladores endócrinos na fisiopatologia da endometriose: revisão da literatura. **Arquivo da sociedade brasileira de Ciência e Saúde**, v.35, n.2, p.103-10, 2010.

BILA, D. M. **Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17β – Estradiol pelo processo de ozonização**. 2005.281 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BOGI, C.; LEVY, G.; LUTZ, I.; KLOAS, W. Functional genomics and sexual differentiation in amphibians. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 133, n. 4, p.559–570, 2002.

BOKERMANN, W. C. A. Observações ecológicas sobre *Physalaemus cuvieri* (Fitz.) 1826. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 22, p. 391-399, 1962.

BOONE, M. D.; BRIDGES, C. M. The effect of temperature on the potency of carbaryl for survival of tadpoles of the green frog (*Rana clamitans*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, p. 1482–1484, 1999.

BOONE, M. D.; SEMLITSCH, R. D. Interaction of an insecticide with competition and pond drying in amphibian communities. **Ecological Applications**, vol. 12, n. 1, p. 307-316, 2002.

BOONE, M. D.; JAMES, S. M. Interaction of an insecticide, herbicide, and natural stressors in amphibian community mesocosms. **Ecological Applications**, v. 13, n. 3, p. 829-841, 2003.

BOONE, M. D.; SEMLITSCH, R. D. Interactions of bullfrog tadpole predators and insecticide: predation release and facilitation. **Oecologia**, v. 137, p. 610-616, 2003.

BOONE, M. D.; SEMLITSCH, R. D.; LITTLE, E. E.; DOYLE, M. C. Multiple stressors in amphibian communities: effects of chemical contamination, bullfrogs, and fish. **Ecological Applications**, v. 17, n. 1, p. 291-301, 2007a.

BOONE, M. D.; COWMAN, D.; DAVIDSON, C.; HAYES, T.; HOPKINS, W.; RELYEA, R.; SCHIESARI, L.; SEMLITSCH, R. Evaluating the Role of Environmental Contamination in Amphibian Declines. In: C. GASCON; J. P. COLLINS; R. D. MOORE; D. R. CHURCH; J. E. MCKAY E R. MENDENSOL. **Amphibian Conservation Action Plan**, p. 32-35, 2007b.

BLAUSTEIN, A. R.; JOHNSON, P. T. J. The complexity of deformed amphibians. **Frontiers in the Ecology and the Environment**, v. 1, n. 2, p. 87–94. 2003.

BLOUIN, M. S.; Genetic correlations among morphometric traits and rates of growth and differentiation in the green tree frog, *Hyla cinerea*. **Evolution**, v. 46, n. 3, p.735-744, 1992.

BRANDE-LAVRIDSEN, N.; CHRISTENSEN-DALSGAARD, J.; KORSGAARD, B. Effects of Prochloraz and Ethinylestradiol on Sexual Development in *Rana temporaria*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 309, p. 389–398, 2008.

BRANDE-LAVRIDSEN, N.; CHRISTENSEN-DALSGAARD, J.; KORSGAARD, B. Effects of Ethinylestradiol and the Fungicide Prochloraz on Metamorphosis and Thyroid Gland Morphology in *Rana temporaria*. **The Open Zoology Journal**, vol. 3, p. 7-16, 2010.

BROOMHALL, S. The effects of endosulfan and variable water temperature on survivorship and subsequent vulnerability to predation in *Litoria citropa* tadpoles. **Aquatic Toxicology**, v. 61, p. 243-250, 2002.

BROWN, P. S.; FRYE, B. E. Effects of prolactin and growth hormone on growth and metamorphosis of tadpoles of the frog, *Rana pipiens*. **General and Comparative Endocrinology**, vol.13, p. 126–138, 1969.

BUCHHOLZ, D. R.; HAYES, T. B. Evolutionary patterns of diversity in spadefoot toad metamorphosis (Anura: Pelobatidae). **Copeia**, vol. 1, p. 180–189, 2002.

BURKHART, J. G.; HELGEN, J. C.; FORT, D. J.; GALLAGHER, K.; BOWERS, D.; PROPST, T. L.; GERNES, M.; MAGNER, J.; SHELBY, M. D.; LUCIER, G. Induction of mortality and malformation in *Xenopus laevis* embryos by water sources associated with field frog deformities. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. 12, 1998.

CAMPBELL, A. Declines and Disappearances of frog. **Environment**, Australia, 236 p., 1999.

CARDOSO, A. J. Biologia e Sobrevivência de *Physalaemus cuvieri* (Fitz.) 1826 (Amphibia, Anura) na natureza. **Ciência e Cultura**, v. 33, p. 1224-1228, 1981.

CHAKRABORTY, M; BURMEISTER, S. S. Estradiol induces sexual behavior in female túngara frogs. **Hormones and Behavior**, v. 55, p. 106–112, 2009.

CHEN, C. Y.; HATHAWAY, K. M.; FOLT, C. L. Multiple stress effects of Vision_ herbicide, pH, and food on zooplankton and larval amphibian species from forest wetlands. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 823–831, 2004.

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

DESBROW, C.; ROUTLEDGE, E. J.; BRIGHTY, G. C.; SUMPTER, J. P.; WALDOCK, M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluents. Chemical fractionation and in vitro biological screening. **Environmental Science and Technology**, v.32, p.1549-1558, 1998.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. The Johns Hopkins University Press, Estados Unidos, 613 p., ISBN: 9780801847806, 1994.

DUFFUS, J. H. Introduction of Toxicology. In: J. H. Duffus; H. G. J. Worth. **Fundamental Toxicology**, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 517 p., ISBN: 0854046143, 2006.

EDUARDO, E. J. **Estudo da degradação eletroquímica, fotolítica, fotocatalítica e eletrofotocatalítica do hormônio etinilestradiol**. 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

ELANGO, A.; SHEPHERD, B.; CHEN, T. T. Effects of endocrine disrupters on the expression of growth hormone and prolactin mRNA in the rainbow trout pituitary. **General and Comparative Endocrinology**, vol. 145, n. 2, p. 116-127, 2006.

FROST, D. R. **Amphibian Species of the World 5.5: An Online Reference**. American Museum of Natural History, New York, USA. Disponível em: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>. Acesso em: 03 de março de 2011.

GABET, V.; MIEGE, C.; BADOS, P.; COQUERY, M. Analysis of estrogens in environmental matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v.26, n.11, p. 1113-113, 2007.

GARDNER, T. Declining Amphibian Populations: a global phenomenon in conservation biology. **Animal Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 2, p. 23-43, 2001.

GASCON, C.; COLLINS, J. P.; MOORE, R. D.; CHURCH, D. R.; MCKAY, J. E.; MENDELSON, J. R. **Amphibian Conservation Action Plan**. IUCN\SSC Amphibian Specialist Group, 66 p., 2007.

GOMES, R. L.; SCRIMSHAW, M. D.; NESTER, J. N. Determination of endocrine disrupters in sewage treatment and receiving waters. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 697-707, 2003.

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

GOTO, Y.; KITAMURA, S.; KASHIWAGI, K.; OOFUSA, K.; TOOI, O.; YOSHIZATO, K.; SATO, J.; OHTA, S.; KASHIWAGI, A. Suppression of amphibian metamorphosis by bisphenol A and related chemical substances. **Journal of Health Science**, v. 52, p.160–168, 2006.

GRAY, K. M., JANSSENS, P. A. Gonadal hormones inhibit the induction of metamorphosis by thyroid hormones in *Xenopus laevis* tadpoles in vivo but not in vitro. **General and Comparative Endocrinology**, v. 77, p. 202–211, 1990.

GRIFFITHS, R. A.; DENTON, J.; WONG, A. L. C. The effect of food level on competition in tadpoles – interference mediated by Protothecan algae. **Journal of Animal Ecology**, v.62, p.274–279, 1993.

HAMER, A. J.; McDONELL, R. J. Amphibian ecology and conservation in the urbaning world: A review. **Biological Conservation**, v. 141, p. 2432-2449, 2008.

HAYES, T. B. Steroids as potential modulators of thyroid hormone activity in anuran metamorphosis. **American Zoologist**, v. 37, p.185–194, 1997.

HAYES, T. B. Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. **Journal of Experimental Zoology**, v. 281, p. 373–399, 1998.

HAYES, T. B.; COLLINS, A.; LEE, M.; MENDOZA, M.; NORIEGA, N.; STUART, A. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. **Proceedings of the National Academy of Sciences-USA**, v. 99, p. 5476–5480, 2002.

HENSE, A. B.; SEVERIN, G. F.; WELZL, G.; SCHRAMM, K. Effects of 17 α -ethinylestradiol on zoo and phytoplankton in lentic microcosms. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378 , p. 716–724, 2004.

HOFER, R.; LACKNER, R.; LORBEER, G. Accumulation of toxicants in tadpoles of the common frog (*Rana temporaria*) in High Mountains. **Archives of Environmental Contaminants and Toxicology**, v.49, p.192–199, 2005.

HOGAN, A. N. S.; DUARTE, P.; WADEB, M. G.; LEAN, D. R. S.; TRUDEAU, V. L. Estrogenic exposure affects metamorphosis and alters sex ratios in the northern leopard frog (*Rana pipiens*): Identifying critically vulnerable periods of development. **General and Comparative Endocrinology**, v.156, p. 515-5232, 2008.

HOPKINS, W. A.; CONGDON, J.; RAY, J. K. Incidence and impact of axial malformations in larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*) developing in sites polluted by a coal-burning power plant. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, p. 862-868, 2000.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. An Analysis of Amphibians on the 2009 IUCN Red List. Disponível em: <www.iucnredlist.org/amphibians>. Acesso em: 3 de março de 2011.

JOHNSON, P. T. J.; LUNDE, K. B.; THURMAN, E. M.; RITCHIE, E. G.; WRAY, S. N.; SUTHERLAND, D. R.; KAPFER, J. M.; FREST, T. J.; BOWERMAN, J.; BLAUSTEIN, A. R. Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the western United States. **Ecological Monographs**, v. 72, n. 2, p. 151-168, 2002.

KARASOV, W. H.; JUNG, R. E.; LANGENBERG, S. V; BERGESON, T. L. E. Field exposure of frog embryos and tadpoles along a pollution gradient in the fox river and green bay ecosystem in Wisconsin, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 942-953, 2005.

KHANGAROT, B. S.; RAY, P. K.; CHANDRA, H. Preventive effects of amino acids on the toxicity of copper to *Daphnia magna*. **Water, Air, and Soil Pollution**, vol. 32, n. 3-4, p. 379-387, 1985.

KIKUYAMA, S.; KAWAMURA, K.; TANAKA, S.; YAMAMOTO, K. Aspects of amphibian metamorphosis: hormonal control. **International Review of Cytology**, v. 145, p. 105–148, 1993.

KLOAS, W.; LUTZ, I; EINSPANIER, R. 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**, v. 225, p. 59-68, 1999.

KLOAS, W. Amphibians as a model for the study of endocrine disruptors. **International Review of Cytology**, v. 216, p.1–57, 2002.

KLOAS, W.; LUTZ, I. Amphibians as model to study endocrine disrupters. **Journal of Chromatography A**, v. 1130, p. 16–27, 2006.

KOLPIN, D. W.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; BUSTON, H. T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a National Reconnaissance. **Environment Science and Technology**, v. 36, n. 6, p. 1202-1211, 2002.

LANNOO, M. J. Amphibian Malformations. In: H. Heathwole; J. W. Wilkinson. **Amphibian Biology**, vol. 8, Surrey Bealty and Sons, Chipping Norton, Australia, 330 p., ISBN: 9780980311334, 2009.

LAURILA, A.; KUJASALO, J.; RANTA, E. Different antipredator behaviour in two anuran tadpoles: effects of predator diet. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, vol. 40, p. 329–336, 1997.

LEAL, C. B. **Efeitos da Alteração da Quantidade de Alimento no Crescimento e Desenvolvimento de Girinos de *Physalaemus cuvieri*** (Anura; Leiuperidae). 2007. 66 f. Dissertação (Mestrado) – São Luís, Universidade Federal do Maranhão, 2007.

LOHNER, T. W.; FISHER, S. W. Effects of pH and temperature on the acute toxicity and uptake of carbaryl in the midge, *Chironomus riparius*. **Aquatic Toxicology**, v. 16, p. 335–354, 1990.

LOMAN, J. Intraspecific competition in tadpoles, does it matter in nature? A field experiment. **Population Ecology**, vol. 43, p. 253-263, 2001.

LOMAN, J. Density regulation in tadpoles of *Rana temporaria*: A full pond field experiment. **Ecology**, vol. 85, n. 6, p. 1611-1618, 2004.

LUTZ, I.; KLOAS, W.; SPRINGER, T. A.; HOLDEN, L. R.; WOLF, J. C.; KRUEGE, H. O.; HOSMER A. J. Development, standardization and refinement of procedures for evaluating effects of endocrine active compounds on development and sexual differentiation of *Xenopus laevis*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, p. 2031–2048, 2008.

MACKENZIE, C. A.; BERRILL, M.; METCALFE, C.; PAULI, B. D. Gonadal differentiation in frogs exposed to estrogenic and antiestrogenic compounds. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, p. 2466–2475, 2003.

MCDIARMID, R. W.; ALTIG, R. **Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae**. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA, 458 p., ISBN: 0226557634, 1999.

MELO, S. A. S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 188-197, 2009.

MELLO-DA-SILVA, C. A.; FRUCHTENGARTEN, L. Riscos químicos ambientais à saúde da criança. **Jornal de Pediatria**, v.81, p. 205-211, 2005.

METEYER, C. U. **Field guide to malformations of frogs and toads with radiographic interpretations**. Biological Science Report, USGS National Wildlife Health Center Madison - U.S., 20 p., 2000.

MEYER, A.; SARCINELLI, P. N.; MORREIRA, J. C. Estarão alguns grupos populacionais brasileiros sujeitos à ação de disruptores endócrinos? **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 4 p. 845-850, 1999.

MIJARES, A.; RODRIGUES, M. T.; BALDO, D. *Physalaemus cuvieri*. In: **IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011**. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 03 de março de 2011.

MORAES, N. V.; GRANDO, M. D.; VALERIO, D. A. R.; OLIVEIRA, D. P. Exposição ambiental a desreguladores endócrinos: alterações na homeostase dos hormônios esteroidais e tireoideanos. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.21, n.1, p.1 – 8, 2008.

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

NOPPE, H.; WASCH, K.; POELMANS, S.; VAN HOOFF, N.; VERSLYCKE, T.; JANSSEN, C. R.; BRABANDER, H. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p.92, 2005.

NORRIS, D. O. **Vertebrate Endocrinology**. Elsevier Academic Press, USA, 4ª edição, 560 p., 2006. ISBN: 9780120887682.

OHTA, S. Sex determining mechanism in *Buergeria buergeri* (Schlegel): II. The effects of sex hormones on the differentiation of gonads and the offspring of sex-reversed females. **Scientific Report of the Laboratory for Amphibian Biology**, vol. 9, p. 213-238, 1987.

OLIVEIRA, C.; SANT' ANNA, A. C.; OMENA, P. M. O.; SANTOS, L. R. S.; ZIERI, R. Morphological considerations on the seminiferous structures and testes of anuran amphibians: *Bufo crucifer*, *Physalaemus cuvieri* and *Scinax fuscovarius*. **Biociências**, Porto Alegre, v. 11, n. 1, p. 39-46, 2003.

ÖRN, S.; HOLBECH, H.; MADSEN, T. H.; NORRGREN, L.; PETERSEN, G. I. Gonad development and vitellogenin production in Zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. **Aquatic Toxicology**, v. 65, p. 397–411, 2003.

PARK, B. J.; KIDD, K. Effects of the synthetic estrogen ethinylestradiol on early life stages of Mink frogs and Green frogs in the wild and in situ. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, p. 2027–2036, 2005.

PAULI, B. D.; COULSON, D. R.; BERRILL, M. Sensitivity of amphibian embryos and tadpoles to Mimic® 240 LV insecticide following single or double exposures. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 2538-2544, 1999.

PEACOR, S. D. Positive effects of predators on prey growth rate through induced modifications of prey behaviour. **Ecology Letters**, v. 5, p. 77-85, 2002.

PEDRO, J. M. A experiência com contraceptivos no Brasil: Uma questão de geração. **Revista Brasileira de História**, v. 23, n. 45, p. 239-260, 2003.

PETROVIC, M.; ELJARRAT, E.; LOPEZ de ALDA, M. J.; BARCELO, D. Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 549–562, 2004.

PETTERSSON, I.; ARUKWE, A.; LUNDSTEDT-ENKEL, K.; MORTENSEN, A. S.; BERG, C. Persistent sex-reversal and oviductal agenesis in adult *Xenopus* (*Silurana*) *tropicalis* frogs following larval exposure to the environmental pollutant ethinylestradiol. **Aquatic Toxicology**, v. 79, p.356–365, 2006.

PETTERSON, I.; BERG, C. Environmentally relevant concentrations of ethinylestradiol cause female-biased sex ratios in *Xenopus tropicalis* and *Rana temporaria*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, p.1005–1009, 2007.

POLLIO, C. A. Effects of pH and heavy metal concentrations on amphibian breeding and community structure on a reclaimed pyrite mine in southern Virginia. **Catesbeiana**, v. 25, n. 2, p. 51-75, 2005.

PUKY, M.; OERTEL, N. On the protective role of material organism in amphibians. *Opuscula Zoologica*, **Budapest**, v. 29-30, p.125-132, 1997.

REIS FILHO, R. W.; LUVIZOTTO-SANTOS, R.; VIEIRA, E. M. Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 3, p. 283-288, 2007.

RELYEA, R. A. Predator cues and pesticides: a double dose of danger for amphibians. **Ecological Applications**, v. 13, n. 6, p. 1515-1521, 2003.

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

RELYEA, R. A.; SCHOEPPNER, N. M.; HOVERMAN, J. T. Pesticides and Amphibians: The importance of community context. **Ecological Applications**, v. 15, n. 4, p. 1125-1134, 2005.

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

RICHARDS, C. M.; NACE, G. W. Gynogenetic and hormonal sex reversal used in tests of the XX–XY hypothesis of sex determination in *Rana pipiens*. **Growth**, v.42, p. 319–331, 1978.

ROBINSON, C. D.; BROWN, E.; CRAFT, J. A.; DAVIES, I. M. ; MOFFAT, C. F.; PIRIE, D.; ROBERTSON, F.; STAGG, R. M.; STRUTHERS, S. Effects of sewage effluent and ethinylestradiol upon molecular markers of oestrogenic exposure, maturation and reproductive success in the sand goby (*Pomatoschistus minutus*, Pallas). **Aquatic Toxicology**, v. 62 , p.119-134, 2003.

ROBINSON, L.; THORN, I. **Toxicology and Ecotoxicology in Chemical Safety Assessment**. Blackwell Publishing, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, ISBN: 0849324009, 159 p., 2005.

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

ROWE, C. L.; SADINSKI, W. J.; DUNSON, W. A. Elevated maintenance costs in an anuran (*Rana catesbeiana*) exposed to a mixture of trace elements during the embryonic and early larval periods. **Physiological Zoology**, v. 7, n.1, p. 27-35, 1998.

RZEHAŁ, K.; MARYANSKA-NADACHOWSKA, A.; JORDAN, M. The effect of Karbatox 75, a carbaryl insecticide, upon the development of tadpoles of *Rana temporaria* and *Xenopus laevis*. **Folia Biologica**, v. 25, p. 391-399, 1977.

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

SEMLITSCH, R. D.; SCOTT, D. E.; PECHMANN, J. H. K.; GIBBONS, J. W. Structure and dynamics of an amphibian community: evidence from a 16-year study of a natural pond. In: CODY, M. L.; SMALLWOOD, J. A. **Long-term studies of vertebrate communities**. Academic Press, San Diego, California, USA, p. 217–248, 1996.

SHAPPELL, N. W. Estrogenic Activity in the Environment: Municipal Wastewater Effluent, River, Ponds, and Wetlands. **Journal of Environmental Quality**, v.35, p.122-132, 2006.

SILVA, D. P.; MELO, C. F.; OLIVEIRA, J. L. M. Avaliação “in vitro” da desregulação estrogênica causada por poluentes orgânicos. **Saúde e Ambiente em Revista**, v. 2, n. 2, p. 82-91, 2007.

SMITA, A.; DUTTA, S.; DUTTA, A. Effect of copper sulphate on the respiratory tissues of dragon fly nymphs (Anisoptera) at variable temperature. **The Bioscan**, v. 5, n. 3, p. 517-521, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. **Lista Brasileira de Anfíbios e Répteis**. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/>, Acesso em: 03 de março de 2011.

SOCIETY OF ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY. **Endocrine disruptors and modulators**. Technical Issue Paper (TIP), Pensacola, 5p. 2000.

SODRÉ, F. F.; MONTAGNER, C. C.; LOGATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 2, p.187-196, 2007.

SOWER, S. A.; REED, K. L.; BABBITT, K. J. Limb malformations and abnormal sex hormone concentrations in frogs. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, p.1085–1090, 2000.

TAKAHASHI, H. Some observations on the masculinizing effect of estradiol upon the larval gonad of *Rana temporaria*. **Zoology**, v.13, p. 423-427, 1957a.

TAKAHASHI, H. The malformed development of toad larvae treated with estradiol. **Annotations Zoology Japanese**, v. 30, p. 199-203, 1957b.

TAKAHASHI, H. Time Relation between the Administration of Estradiol and the Occurrence of Abnormalities in Limbs and Gonads of Frog Larvae. **Zoology**, v.14, n.1, p. 101- 110, 1958.

TAVERA-MENDOZA, L.; RUBY, S.; BROUSSEAU, P.; FOURNIER, M.; CYR, D.; MARCOGLIESE, D. Response of the amphibian tadpole *Xenopus laevis* to atrazine during sexual differentiation of the ovary. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.21, p.1264–1267, 2002.

TERNES, T. A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HEBERER, K.; WILKEN, R. D.; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewages treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 81-90, 1999.

TRUDEAL, V. L.; SOMOZA, G. M.; NAHORNIAK, C. S.; PETER, R. E. Interactions of Estradiol with Gonadotropin-Releasing Hormone and Thyrotropin-Releasing Hormone in the Control of Growth Hormone Secretion in the Goldfish. **Neuroendocrinology**, v.56, n.4, p. 483-490, 1992.

VAN DEN BELT, K.; WESTER, P. W.; VAN DER VEN, L. T. M.; VERHEYEN, R.; WITTERS, H. Effects of ethinylestradiol on the reproductive physiology in Zebrafish (*Danio*

erio): time dependency and reversibility. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, p. 767–775, 2002.

WARNER, S. C.; DUNSON, A.; TRAVIS, J. Interaction of pH, density, and priority effects on the survivorship and growth of two species of hylid tadpoles. **Oecologia**, vol. 88, p. 331–339, 1991.

WERNER, E. E.; GILLIAM, J. F.; HALL, D. J.; MITTELBAACH, G. G. An experimental test of the effects of predation risk on habitat use in fish. **Ecology**, vol. 64, p.1540–1548, 1983.

WHITE, B. A.; NICHOLL, C. S. Hormonal control of amphibian metamorphosis. In: L. I. GILBERT; E. FRIEDEN. **Metamorphosis: A Problem in Developmental Biology**. Plenum Press, New York, p. 363–396, 1981.

YAMAUCHI, K.; PRAPUNPOJI, P.; RICHARDSON, S. J. Effect of diethylstilbestrol on thyroid hormone binding to amphibian transthyretins. **General and Comparative Endocrinology**, v.119, p. 329–339, 2000.

YIN, G. G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y. J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environmental International**, v. 28, p. 545–551, 2002.

ZAGA, A.; LITTLE, E. E.; RABEN, C. F.; ELLERSIECK, M. R. Photoenhanced toxicity of a carbamate insecticide to early life stage anuran amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, p. 2543–2553, 1998.

ZUG, G. R.; VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles**, 2 ed., Academic Press, New York, 630 p., ISBN: 012782622X, 2001.