

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

BRENA MÁRCIA DE FREITAS BORGES

**INFLUÊNCIA DE UM PESTICIDA SOBRE GIRINOS NECTÔNICOS
EM MESOCOSMOS**

São Luís
2012

BRENA MÁRCIA DE FREITAS BORGES

**INFLUÊNCIA DE UM PESTICIDA SOBRE GIRINOS NECTÔNICOS
EM MESOCOSMOS**

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

Orientadora: Prof. Dra. Gilda Vasconcellos de Andrade
Co-orientadora: Prof. Dra. Gilvanda Silva Nunes

São Luís
2012

Borges, Brena Márcia de Freitas.

Influência de um pesticida sobre girinos nectônicos em mesocosmos/Brena Borges – São Luís, 2012.
79f.

Impresso por computador (fotocópia)

Orientadora: Gilda Vasconcellos de Andrade

Co-orientadora: Gilvanda Silva Nunes

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

1. Pesticida_Efeitos_Amphibia 2. Paration Metílico 3. Larvas
4.Hylidae

I. Título

CDU 597.6:661.16

Brena Márcia de Freitas Borges

Influência de um pesticida sobre girinos nectônicos em mesocosmos

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de mestrado, em sessão pública realizada em 12/04/2012, considera o candidato APROVADA.

Profª. Dra. Gilda Vasconcellos de Andrade
Orientadora

Profª. Dra. Gilvanda Silva Nunes
Co-Orientadora

Profª. Dra. Flora Acuña Juncá

Prof. Dr. Ricardo Luvizotto

Prof. Dr. Luiz Norberto Weber
suplente

À Deus e à minha família.

|

Agradecimentos

Um momento difícil é este, agradecer sem esquecer alguém. Agradeço a todas àquelas pessoas que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, da minha formação profissional e pessoal. Mas fica aqui alguns nomes especiais que, sem dúvidas foram peças fundamentais neste meu percurso.

Ao meu marido e amigo Márcio Biguá, pelo amor, paciência e companheirismo dedicados durante todos esses anos até mesmo em algumas coletas de campo, meu muito obrigada!

Ao meu pequeno Caio Lucas, que dá sentido à minha vida.

Aos meus pais, meu irmão, meus sogros, minha madrinha, minha tia querida e afilhada amada pelo apoio e esperança depositados na minha pessoa.

À minha parceira e amiga Aline Magalhães, pelos momentos divididos durante essa e outras jornadas.

Às minhas amigas Eglantine, Kamila, Juliana, Allana e Ana Patricia pela torcida e amizade de muitos anos.

À profa. Dra. Gilda Vasconcellos pela orientação e conhecimentos passados.

À profa. Dra. Gilvanda Silva Nunes pela ajuda e conhecimentos químicos transmitidos.

À profa. Dra. Flora A. Juncá pelas valiosas sugestões ao artigo apresentado nesta dissertação.

Ao prof. Dr. Ricardo Luvizotto pelas contribuições feitas ao longo do trabalho.

Ao prof. Dr. Paulo De Marco Junior, pela contribuição com a identificação e informações biológicas da espécie de libélula.

Às estagiárias Fabiana França, Anna Evelin Liboro e ao técnico Bruno Rafael Costa do Laboratório de Herpetologia da Universidade Federal do Maranhão, pela ajuda e colaboração durante o trabalho.

Expresso também meu reconhecimento ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão.

Ao Consórcio de Alumínio do Maranhão – ALUMAR pela permissão ao acesso nas áreas de coleta.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa concedida e auxílio financeiro (processos CNPq/Casadinho 620163/2008 9 e CNPq/SISBIOTA 563075/2010-4), à FAPESP/SISBIOTA pelo auxílio financeiro 10/52321-7), à FINEP/ INFRAPESQ2 (CV 01.03.0337.00), que possibilitou a construção dos tanques artificiais, e à FAPEMA, que possibilitou o auxílio do bolsista técnico.

ÍNDICE

	p.
RESUMO	01
<i>ABSTRACT</i>.....	02
1.0 INTRODUÇÃO.....	03
2.0 REVISÃO DA LITERATURA.....	05
3.0 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Local de coleta	18
3.2 Espécie analisada	19
3.3 Técnicas utilizadas.....	20
4. RESULTADOS.....	22
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÕES	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
APÊNDICE	
Artigo.....	44
Normas da revista	66

RESUMO

BORGES, B. M. F. **Influência de um pesticida sobre girinos nectônicos em mesocosmos.**

2012. 79 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2012.

As consequências de aplicações repetidas de pesticidas em concentrações relativamente baixas para o desenvolvimento de girinos podem ser muito negativas, mas ainda foram pouco avaliadas. Neste estudo utilizamos os girinos nectônicos de *Dendropsophus minutus* Peters, 1872 em 32 poças artificiais (8 repetições por tratamento) para avaliar a influência de um pesticida comumente utilizado em campos agrícolas no Maranhão, nordeste do Brasil. Ninfas de libélulas colonizaram alguns tanques, mas essa presença não diferiu significativamente entre os tanques dos diferentes tratamentos e não teve efeito como covariável nas análises. Testamos o efeito de três diferentes concentrações do Paration Metílico (zero para o controle; $0,04\mu\text{g L}^{-1}$; $0,1\mu\text{g L}^{-1}$; $0,2\mu\text{g L}^{-1}$), utilizando a formulação comercial Mentox 600, com uma reaplicação com 10 dias de intervalo. A sobrevivência e o tamanho (comprimento rostro cloacal e massa) dos metamorfos e a taxa de crescimento até a metamorfose não diferiram significativamente entre os tratamentos. Mas o desenvolvimento foi mais longo no tratamento com maior concentração de pesticida (ANCOVA: $F_{3, 21}=3,777$; $p=0,026$), em relação à concentração intermediária, o que pode representar um risco para populações que vivem em ambientes temporários. Houve a ocorrência de metamorfos com deformações nos membros nos tanques artificiais de concentração mais e menos elevada, além da morte de girinos em metamorfose por possível problemas nas patas e afogamento.

Palavras-chave: Amphibia. Paration metílico. Larvas. Hylidae.

ABSTRACT

BORGES, B. M. F. **The influence of a pesticide on nektonic tadpoles in mesocosmos.** 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2012.

The consequences of repeated applications of pesticides in relatively low concentrations to develop tadpoles can be very negative, but were still slightly evaluated. In this study we used the nektonic tadpoles *Dendropsophus minutus* Peters, 1872 in 32 artificial ponds (8 replicates per treatment) to evaluate the influence of a pesticides commonly used in agricultural fields in Maranhão, northeastern Brazil. Nymphs of dragonflies have colonized some tanks, but its presence did not differ significantly between tanks of different treatments had no effect as a covariate in the analyses. We tested the effect of different concentrations of Paration Metílico (zero for the control, $0,04\mu\text{g L}^{-1}$; $0,1\mu\text{g L}^{-1}$; $0,2\mu\text{g L}^{-1}$), using the commercial formulation Mentox 600, with an overcoating with 10 days apart. Survival and size (snout-vent length and mass) of metamorphs did not differ significantly among treatments. But time to metamorphosis was longer on tanks with the higher concentration of the pesticide (ANCOVA: $F_{3, 21} = 3,777$; $p=0,026$) in relation to tanks with the intermediate concentration. This longer time to metamorphosis can be a risk to populations that inhabit temporary ponds. Deformed metamorphs occurred in tanks with pesticide, as the death of tadpoles on metamorphosis probably due to problems on limbs and drowning.

Key words: Amphibia. Paration metílico. Larvae. Hylidae.

1 INTRODUÇÃO

Anfíbios são animais que passam parte do ciclo de vida em um ambiente aquático e outro em ambiente terrestre. Embora exista alguma variação desse padrão, todos os anfíbios dependem de umidade para se alimentar, desenvolver e reproduzir (VERDADE *et al.* 2010). A maioria dos anfíbios passa por períodos embrionários e larvais em habitats aquáticos antes da metamorfose no ambiente terrestre. São animais que possuem pele permeável e úmida, com seus ovos diretamente expostos à água e luz solar e que podem facilmente absorver substâncias tóxicas. Esses animais participam como consumidores primários e secundários ocupando as cadeias alimentares aquáticas e terrestres, sendo sensíveis à deterioração dos ecossistemas, o que nos leva a considerá-los bons bioindicadores (FIORAMONTI *et al.* 1997).

A destruição dos habitats e as doenças infecciosas são apontadas como causas do declínio populacional dos anfíbios (YOUNG *et al.* 2004; JOHNSON *et al.* 2007; KIESECKER 2002; ROHR *et al.* 2008). Outras causas também podem ser apontadas como a contaminação por pesticidas, mudanças climáticas, presença de espécies invasoras, radiação ultravioleta, anomalias reprodutivas (HAYES *et al.* 2002) e o comércio ilegal de animais silvestres (YOUNG *et al.* 2001 e 2004). E a contaminação química acaba sendo uma ameaça importante para a biodiversidade de organismos aquáticos (WILCOVE & MASTER 2005), e declínio de espécies aquáticas não-alvo (DAVIDSON 2004; DAVIDSON *et al.* 2002).

O uso de pesticidas para combater pragas, doenças e ervas daninhas, é uma prática muito comum em todas as regiões do Brasil, muito usada também para obter a homogeneização do ambiente (CARVALHO *et al.* 2000; GRIGGS 2006), e vem se acentuando a cada ano, o que requer mais controle e a realização de estudos que possibilitem o monitoramento de possíveis contaminações do meio ambiente e da biota (GASPAR *et al.*

2005). Os pesticidas são aplicados em todo o mundo nas áreas agrícolas, onde diversas espécies de anfíbios anuros estão inseridas (RELYEA 2006). E o uso desses produtos tem levado ao aparecimento de resíduos nos diferentes compartimentos ambientais, como na água, solo e ar (CARVALHO *et al.* 2000; CALDAS & SOUZA 2000; RUEGG 1991). Nas zonas agricultáveis do Maranhão ocorre o uso de forma inadequada dos pesticidas e a contaminação de corpos d'água utilizados por anfíbios (SANTOS 2011).

Os contaminantes químicos podem desempenhar efeitos drásticos sobre as comunidades ecológicas. Alguns efeitos sobre as comunidades aquáticas podem ser previstos a partir dos efeitos tóxicos diretos observados em uma única espécie em laboratório. No entanto, outros efeitos são mediados através de outras espécies na comunidade. Quando adicionamos pesticidas em comunidades aquáticas, o impacto pode depender tanto do tipo de pesticida aplicado como da constituição da comunidade. Assim, apesar de os pesticidas serem encontrados nos habitats naturais dos anfíbios (MCCONNELL *et al.* 1998; LENOIR *et al.* 1999; SPARLING *et al.* 2001; SANTOS 2011), o papel que os pesticidas podem desempenhar sobre o declínio populacional de anfíbios é claramente uma mistura complexa de efeitos diretos e indiretos (RELYEA *et al.* 2005; GRIGGS 2006).

Os efeitos indiretos causados pelos contaminantes podem ter implicações profundas em ambientes com fortes cadeias tróficas pelágicas, como o de água doce (JOHN *et al.* 2003), onde as larvas de anfíbios se desenvolvem. Apesar dos relatos de efeitos dos pesticidas em anfíbios anuros, as consequências do uso de alguns contaminantes ainda não são bem conhecidas e são poucos os estudos em comparação com outros grupos taxonômicos (BOONE *et al.* 2005).

O presente estudo acrescenta informações para o entendimento dos efeitos diretos de um pesticida sobre girinos nectônicos de uma espécie que ocorre em região tropical. Testamos a hipótese de que o pesticida Paration Metílico na sua formulação comercial afeta

negativamente o desenvolvimento larvário de *Dendropsophus minutus* Peters, 1872, diminuindo a sobrevivência, aumentando o tempo até a metamorfose, diminuindo o tamanho dos metamorfos e causando deformações.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Os anfíbios anuros são reconhecidos como um dos grupos de animais mais ameaçados de extinção em todo o mundo, inclusive mais do que as aves ou os mamíferos, e desde a década de 1980 várias espécies vêm sofrendo declínios populacionais (STUART *et al.* 2004).

Segundo Silvano & Segalla 2005, vários aspectos frustram as tentativas de uma compreensão abrangente sobre a composição, geografia e demografia da fauna de anfíbios do Brasil para a sua conservação, como o fato de cerca de 30% das espécies de anuros correrem risco de desaparecer nos próximos anos. Citam também as aproximadamente 25% de espécies tão pouco conhecidas que não somos capazes de dizer se, de fato, estão ou não ameaçadas (IUCN 2010), além do grande número de exemplares sem identificação depositados nos museus e coleções. Assim, trabalhos como o presente, que investiguem questões sobre os riscos a que as espécies se encontram ameaçadas e como espécies ecologicamente distintas respondem às causas de risco, devem ser estimulados.

Em regiões tropicais com estações de chuva e seca marcadas, como em São Luís do Maranhão, a ocorrência e reprodução de muitas espécies de anuros são restritas a esses períodos chuvosos (DUELLMAN & TRUEB 1994; ETEROVICK & SAZIMA 2000; PRADO *et al.* 2005). Segundo Manahan (2003) a fase embrio-larval é crítica em espécies com fase larvária aquática e os danos causados nessa etapa são permanentes. Por exemplo, a contaminação química aumenta o tempo do período larval no ambiente aquático, tornando

os girinos mais susceptíveis aos predadores e ao secamento das poças, com a consequente diminuição do recrutamento de juvenis podendo contribuir para o declínio dessas populações (BOONE *et al.* 2007).

Dentre os contaminantes químicos, os pesticidas se decompõem mais lentamente sob baixas condições de pH e quando combinados com estressores naturais, tornam-se mais letais para os anfíbios, segundo trabalhos em mesocosmos que simularam as condições naturais (BOONE & SEMLITSCH 2002; BOONE & JAMES 2003). Boone *et al.* (2004) demonstraram que em comunidades de lagoa, onde a predação e a competição podem ser intensas, inseticidas de curta duração podem alterar significativamente a dinâmica da comunidade de anfíbios. Essas comunidades reagem de forma diferente a cada substância contaminante, dependendo do comportamento, fisiologia e história de vida das espécies (JAMES *et al.* 2005). A combinação desses contaminantes influencia a sobrevivência das espécies de anfíbios, tendo efeito sobre a competição, densidade, reprodução ou metamorfose desses animais (BOONE & SEMLITSCH 2002). Estes estudos mostraram que os pesticidas podem ter efeitos diretos e indiretos em comunidades naturais e que estes efeitos dependem principalmente da composição da comunidade e do grau de contaminação.

As espécies animais sofrem importante influência dos fatores abióticos. Eles são capazes de limitar os ambientes onde uma espécie pode ocorrer. O pH e a contaminação química podem intervir de forma importante no sucesso das espécies em determinados ambientes, aumentando a acidificação dos habitats (FIORAMONTI *et al.* 1997). Boone e Bridges (1999) observaram que um pesticida se mostrou mais letal para os organismos aquáticos em temperaturas mais quentes. Relyea (2006) mostrou em laboratório que os pesticidas podem ser mais letais quando simulamos condições abióticas mais naturais, como variação de pH, temperatura e radiação ultravioleta.

Os meios aquáticos com baixo pH, têm grandes impactos na distribuição e reprodução dos anfíbios e na sobrevivência e desenvolvimento dos seus ovos e larvas. Os anfíbios, dependendo da espécie, são sensíveis a ambientes ácidos. A acidificação do meio provoca atrasos ou antecipa a metamorfose, diminuição do tamanho corporal das larvas, alterações no comportamento de natação e redução da capacidade de resposta aos predadores, e o aumento na taxa de mortalidade e indiretamente, afeta na disponibilidade de alimento para os girinos (BARTH & WILSON 2009).

Girinos de *Rana sylvatica* em lagoas com baixo pH apresentavam menor concentração de sódio no corpo do que os de lagoas com pH mais alto (FREDA & DUNSON 1985). O baixo pH influencia nos mecanismos de regulação iônica, processo similar ao que ocorre em peixes.

Fioramonti *et al.* (1997) verificaram que os girinos de *Rana lessonae* tiveram uma taxa de crescimento mais elevada e um curto período larval quando expostos a um ambiente com pH 6,4, já para a espécie *Rana esculenta* o efeito desse pH resultou em uma taxa de crescimento menor e período larval mais longo. Isso demonstrou que os efeitos do pH também dependem da espécie. Segundo Birge *et al.* (1983), anfíbios generalistas quanto ao habitat demonstram maior tolerância aos estresses causados por fatores ambientais e químicos.

As investigações sobre as interações entre contaminantes e fatores bióticos em ambientes aquáticos têm aumentado na última década (HANAZATO 2001; ROHR *et al.* 2008). Contaminantes que são diretamente letais para alguns organismos podem causar efeitos indiretos sobre outras espécies através das interações ocorridas na cadeia alimentar (BOONE & SEMLITSCH 2003; RELYEA 2005). O efeito indireto dos contaminantes ocorre principalmente pela redução ou eliminação das populações de zooplâncton, que são sensíveis a inseticidas (MAYER & ELLERSIECK 1986; HANAZATO & YASUNO 1990).

Boone e Semlitsch (2002) também mostraram o efeito subletal de um pesticida quando combinado com as relações de competição entre outras espécies, ocorrendo a perturbação da dinâmica natural das comunidades ao longo do tempo.

Mills e Semlitsch (2004) observaram mudanças na estrutura da comunidade após exposição a um contaminante em diferentes concentrações. O pesticida levou ao declínio dos cladóceros, que normalmente se alimentam de fitoplâncton que pode competir com o perifiton que por sua vez serve de alimento para os anfíbios, ocorrendo diminuição do tamanho dos girinos já que o perifiton foi afetado com a proliferação de fitoplâncton.

Segundo Relyea (2009) a presença de produtos químicos na natureza constitui um desafio para a compreensão de como realmente as comunidades ecológicas são afetadas por eles. Este autor ressaltou que enquanto estamos ganhando rapidamente uma compreensão de como os contaminantes individualmente afetam as comunidades, estas estão expostas a uma mistura de contaminantes onde as informações sobre os efeitos ainda não foram bem definidas. Usando mesocosmos, Relyea examinou a ação de vários contaminantes sobre comunidades aquáticas compostas de zooplâncton, fitoplâncton, perifiton e larvas de anfíbios e constatou que as comunidades de zonas úmidas podem ser drasticamente afetadas por baixas concentrações de pesticidas.

Em comunidades naturais, algumas espécies de anuros podem sofrer efeitos diretos e indiretos pelos contaminantes (RELYEA *et al.* 2005; GRIGGS 2006). Através de um experimento em mesocosmos, Relyea *et al.* (2005), constataram que altas concentrações de alguns pesticidas podem ser letais a girinos, mas que concentrações subletais podem ter grandes efeitos positivos, já que acabam eliminando predadores.

Usando mesocosmos, Relyea (2008) examinou como as concentrações baixas de um pesticida aplicado em várias quantidades, horários e frequências afetam comunidades aquáticas contendo vários níveis da cadeia alimentar. Notou-se que o contaminante,

decompôs rapidamente mas reduziu o zooplâncton, o que deu início a uma cascata trófica em que houve um florescimento de fitoplâncton e, em vários tratamentos, um declínio subsequente no perifiton, não matando diretamente os anfíbios, mas que indiretamente resultou em uma maior mortalidade. As aplicações repetidas da concentração mais baixa promoveram os maiores impactos em muitas das variáveis resposta analisadas. O grande impacto sofrido no zooplâncton, pois é altamente sensível aos inseticidas, também foi relatado por Brock *et al.* (2000) e Fleeger *et al.* (2003). Com grande parte da assembléia zooplancônica sendo eliminada pelo inseticida, houve um aumento subsequente de fitoplâncton, reduzindo a quantidade de luz que atinge o perifiton no fundo da lagoa. E sendo o perifiton fonte de alimento para os girinos, esta cascata trófica causou uma redução no crescimento e desenvolvimento, causando uma mudança no tempo e tamanho na metamorfose (RELYEA & DIECKS 2008).

No experimento também em mesocosmos desenvolvido por Smith *et al.* (2010) foram examinados os efeitos individuais e interativos de concentrações de dois pesticidas em girinos de duas espécies de regiões agrícolas dos Estados Unidos. O contaminante malation retardou a metamorfose não afetando a sobrevivência em qualquer espécie, e o nitrato não afetou a sobrevivência ou o tamanho na metamorfose em ambas as espécies. Portanto, os resultados sugeriram que a interação entre os contaminantes possibilitou que o nitrato amenizasse os efeitos significativos do malation sobre as populações de anuros.

Boone & Semlitsch (2001, 2002) ressaltaram a importância dos testes realizados com contaminantes em condições mais realistas, incorporando estressores naturais bióticos e abióticos que podem influenciar nas reações dos organismos aos contaminantes químicos. Boone & James (2003) mostraram que tanto o contaminante carbaril como a atrazina interagiram significativamente com a densidade dos girinos, indicando que as condições ambientais poderiam influenciar no impacto dos contaminantes.

O uso de mesocosmos, imitando lagoas, em estudos ambientais, aumenta a relevância ambiental e maximiza os benefícios das experiências de laboratório e campo através da manutenção de ambientes relativamente controlados e ao mesmo tempo incorporando elementos naturais, como variação diária de temperatura e exposição aos raios do sol, condições típicas de uma lagoa natural (ROWE & DUNSON 1994). Através desses experimentos denominados de pressão, pode-se prever que a exposição contínua a um pesticida pode manter a comunidade em constante estado de perturbação, reduzindo sua resiliência. Pode-se observar ainda que concentrações muito pequenas podem apresentar maiores impactos sobre a comunidade (HANAZATO & YASUNO 1990; BOONE *et al.* 2001).

O uso desses contaminantes, na maioria organofosforados, começou a ser feito mais intensamente com as restrições ao uso de pesticidas organoclorados devido à observação de que estes possuíam alta persistência no ambiente, embora a maioria dos organofosforados seja bastante tóxica (PERES 2000). Alguns trabalhos mostram que alguns compostos dessa classe dos organofosforados podem persistir em solos, sedimentos e águas de rio, por um período de até 12 meses (RACKE *et al.* 1996). O consumo desses produtos organofosforados aumentou de 27.728 toneladas em 1970 para 80.968 toneladas em 1980 (FUTINO & SILVEIRA 1991), chegando a 158.737 toneladas em 2001 (BRASIL 2004). Isso mostra que a dependência na utilização desses produtos vem aumentando. No mercado brasileiro, o Paration Metílico, que é um organofosforado, cuja fórmula molecular é $C_{10}H_{19}NO_3PS$, é comercializado com as seguintes denominações: Folidol 600 (Bayer) e Folisuper[®] 600 BR (Agripec) (OLLE 2007) ou Mentox 600 (Prentiss Química LTDA). O Mentox 600 CE que foi o produto usado no estudo, é um inseticida e acaricida com ação de contato e ingestão, contendo em sua formulação 600 g/l de Paration Metílico, que, em função de suas ótimas características inseticidas, é um dos mais usados no mundo. É

indicado para as culturas de algodão, batata, milho, feijão e soja, sendo comprovadamente eficaz no combate a diversos tipos de pragas.

O contaminante Paration Metílico é largamente aplicado no Brasil como pesticida na agricultura, abrigos de armazenamento de alimentos, programa de controle de pragas, e tanques de piscicultura para matar as fases larvais de insetos aquáticos predadores que ameaçam a sobrevivência das larvas de peixes (SILVA *et al.* 1993; AGUIAR *et al.* 2004). Constitui um dos inseticidas mais empregados para o controle desses predadores aquáticos em tanques de produção e na preparação de viveiros de recepção de larvas de peixe para maximizar a produção de rotíferos (SENHORINI *et al.* 1991). A aplicação de inseticidas pode provocar efeitos tóxicos agudos nos peixes e resultar em altos riscos de intoxicação (RODRIGUES *et al.* 1997). A substância é considerada muito tóxica para os organismos aquáticos mesmo não apresentando tendência de acúmulo na cadeia alimentar. O potencial de contaminação das águas superficiais também pode ser previsto pelas características dos pesticidas utilizando-se os critérios propostos por Goss (1992) e Gustafson (1989). Estes critérios classificam o risco de contaminação em alto, médio e baixo em função do transporte de pesticidas em sedimentos e dissolvido em água. Esse efeito tóxico do Paration Metílico envolve a inibição de esterases, como acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BchE) (LEITE *et al.* 2010). Os inseticidas organofosforados tornam-se muito mais ativos e mais tóxicos após a biotransformação para a forma paraoxon. Segundo Patrick (2001) somente esses novos compostos nos quais o Paration Metílico é convertido é que são drogas ativas capazes de efetuar o processo de inibição da enzima. A inibição da enzima acetilcolinesterase por inseticidas organofosforados resulta em alterações das funções do sistema nervoso de peixes verificado por Aguiar & Moraes (2000) e Rao & Rao (1984).

Entre as propriedades físico-químicas do contaminante, o coeficiente de partição n-octanol-água (K_{ow}) é definido como a relação da concentração de um pesticida na fase de n-octanol saturado em água e sua concentração na fase aquosa saturada em n-octanol. Valores de K_{ow} não tem unidade e são expressos, normalmente, na forma logarítmica ($\log K_{ow}$) (PRATA 2002). A partir do K_{ow} do contaminante podemos conhecer seu poder de bioacumulação. Assim, o Paration Metílico possui bioacumulação média no ambiente. Pesticidas que possuem valores de $\log K_{ow}$ elevados são considerados lipofílicos, ou seja, possuem baixa solubilidade em água e a tendência de se acumular em materiais orgânicos. Sendo assim, esse valor constitui um importante parâmetro para avaliar o destino final do pesticida no ambiente (ARAUJO 2006).

Segundo a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que foi regulamentada pelo Decreto nº 98.816, de 11 de janeiro de 1990, o Paration Metílico foi excluído da lista de substâncias ativas autorizadas para o uso em produtos para proteção de plantas contra pragas e pestes em 1991 no Brasil. Foi proibida a produção, uso e comercialização de todos os produtos de proteção de plantas que contenham Paration Metílico pela União Européia (COMISSÃO EUROPEIA 2002).

No estudo desenvolvido por Araújo (2006), a intensidade da radiação solar provavelmente interferiu nas diferenças no tempo de meia vida encontradas nas amostras de água analisadas. Foram utilizadas temperaturas mais elevadas, observando uma rápida degradação via hidrólise do composto, o que torna a radiação solar um fator decisivo na degradação do Paration Metílico em ambientes aquáticos naturais.

A natureza orgânica das moléculas de muitos produtos permite sua degradação, sendo necessário estudar os destinos e as consequências do transporte destas moléculas e seus resíduos (MATTOS & SILVA 1999). Segundo Brito *et al.* (2001), o Paration Metílico não sofre lixiviação podendo permanecer no solo.

Segundo Monteiro *et al.* (2006) a meia vida no solo é a quantidade de tempo necessária para que metade do pesticida seja degradada no solo, o que vai depender dos tipos de organismos presentes no solo capazes de fazer a quebra do contaminante; o tipo de solo se é arenoso, barroso ou argiloso; o pH e a temperatura. Senhorini *et al.* (1991) relatam que o contaminante Paration Metílico, formulação concentrada emulsionável com 60% do ingrediente ativo, nas concentrações entre 0,25 ppm e 0,50 ppm, dizimou as populações de odonata e cladóceros, porém os copépodos permaneceram vivos. Segundo Gáradi *et al.* (1988) o folidol elimina odonatas na concentração de 0,5 ppm, mas não seleciona o zooplâncton.

O trabalho desenvolvido por Monteiro *et al.* (2006) demonstrou que o contaminante Paration Metílico causou estresse oxidativo em *Brycon cephalus* sendo as brânquias um dos órgãos mais sensíveis. Um período de 96 horas de exposição foi suficiente para induzir importantes alterações nas enzimas antioxidantes. A concentração encontrada para a mortalidade de 50% da população foi de 2 ppm. Quando comparado ao grupo controle, os peixes expostos ao Paration Metílico apresentaram movimentos letárgicos com a falta parcial de reflexos.

Em humanos, o pesticida afeta primeiramente o sistema nervoso e seus efeitos associados com a exposição excessiva são semelhantes àqueles de outros organofosforados. A exposição às concentrações de 22 a 30 mg/ pessoa/ dia (exposição crônica) resulta na inibição da acetilcolina (OLLE 2007).

Os contaminantes químicos podem servir como fontes de carbono, nitrogênio e energia, ou servir de substrato para co-metabolismo (FOURNIER *et al.* 1998). Através do metabolismo microbiano de pesticidas, verificou-se que os microrganismos não só têm papel importante na ciclagem de compostos orgânicos naturais, como também se mostraram

eficientes na metabolização de produtos sintéticos, como por exemplo, a hidrólise do Paration Metílico (MUNNECKE & HSIEH 1976).

O objetivo geral do presente estudo foi acrescentar informações sobre os efeitos diretos do pesticida Paration Metílico na sua formulação comercial sobre girinos nectônicos da espécie *Dendropsophus minutus* Peters, 1872 que ocorre em região tropical. Esperava-se um efeito negativo do pesticida no desenvolvimento larvário, diminuindo a sobrevivência, aumentando o tempo até a metamorfose, diminuindo o tamanho dos metamorfos e causando deformações.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em mesocosmos (Fig. 1), 32 tanques artificiais (mesocosmos) de 2,50 m² de área de superfície, situados ao ar livre no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Maranhão, onde foram reproduzidas condições similares aos corpos d'água naturais. Os tanques foram cobertos com tela de nylon de 1mm² para evitar a colonização por possíveis predadores ou competidores, e foram montados no dia 22 de março de 2011, 15 dias antes do início do experimento para permitir a estabilização da comunidade de algas, que serviram de alimento aos girinos. Os tanques foram inicialmente enchidos até 0,33 m de profundidade com água encanada, sendo a profundidade mantida sempre constante com a renovação da água feita pela água da chuva, já que esse período representou o auge da estação chuvosa em São Luís (331,8 mm, segundo o Instituto Nacional de Meteorologia-INMET) e por meio de um dreno protegido por uma tela, que impediu a saída dos girinos depois da sua introdução.

A tela não impediu a colonização dos mesocosmos por uma espécie de libélula, que são predadores na fase de ninfa e adulta, sendo as ninfas consideradas um dos principais

predadores do ambiente aquático, onde elas podem estar associadas às plantas aquáticas ou ao fundo desses corpos d'água (DE MARCO JR. & LATINI 1998). São predadores generalistas, alimentando-se do que conseguem capturar, como as larvas de moscas e mosquitos, pequenos anelídeos e crustáceos, girinos e alevinos, utilizando, sobretudo a emboscada como técnica de caça, escondendo-se na vegetação ou nos sedimentos. Em função disso, diariamente cada tanque foi revistado e cada ninfa encontrada foi retirada, sendo anotada a informação sobre o tanque em que ela se encontrava.

Em algumas dessas verificações diárias foram detectados ostracodas, artrópodes crustáceos diminutos, que se proliferavam em um dos sistemas (Fig. 2). Distribuímos esses organismos por todos os tanques, para que estes se mantivessem semelhantes, já que a presença desses organismos é comum em ambiente natural.





Figura 1. a) Tanques artificiais localizados ao ar livre; b) Visão interna dos tanques após esvaziamento.



Figura 2. Imagem microscópica do artrópode ostracoda.

O Paration Metilico foi o pesticida cujos efeitos foram investigados neste estudo devido ao seu uso pela população em diversos campos agrícolas e pela sua detecção em corpos d'água utilizados por anfíbios em São Luís, MA (SANTOS 2011). A classe dos pesticidas organofosforados (OPs) estão entre as mais extensivamente utilizadas na

agricultura. Os pesticidas organofosforados são derivados do ácido fosfórico, do ácido tiofosfórico ou do ácido ditiofosfórico (BRASIL1998) (Fig. 3). Algumas propriedades físico-químicas do organofosforado Paration Metílico são importantes como: peso - 263,20; Kow (coeficiente de partição octanol-água) - 3; pressão de vapor - 2×10^{-3} ; temperatura de fusão - 36; densidade - 1,269; solubilidade - 55 mg.L⁻¹. O princípio ativo do contaminante possui curta persistência no ambiente, possuindo vida média de 6-16 dias (MONTEIRO *et al.* 2006; BAIRD 2002). Mas segundo Ferracini *et al.* (2001), os dados de meia-vida em água são pouco citados na literatura, pois dependem das características do ambiente.

Para o experimento foi utilizado o produto comercializado Mentox 600 (Prentiss Química LTDA) preparando-se três concentrações do pesticida Paration Metílico para os três diferentes tratamentos, além do tratamento sem influência de contaminante (controle), todos com 8 replicações, totalizando 32 tanques, 8 para cada tratamento, incluindo o controle. As concentrações foram baseadas nos seguintes critérios: C1 - 0,04 µg L⁻¹, é o limite máximo admitido nos ecossistemas aquáticos de acordo com a Resolução CONAMA N° 357, de 17 de março de 2005; C2 - 0,1 µg L⁻¹, é um parâmetro tolerado, usado internacionalmente e C3 - 0,2 µg L⁻¹, foi encontrada em análise de água coletada em corpo de água utilizado por girinos em São Luís (SANTOS 2011).

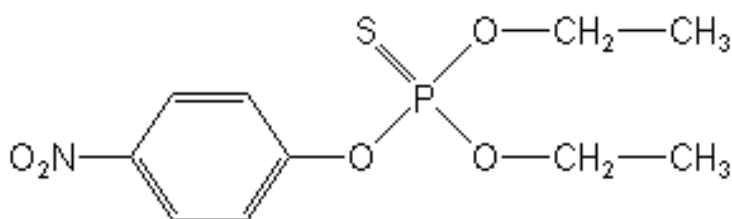


Figura 3. Estrutura química do Paration Metílico.

3.1 Local de coleta

Em fevereiro de 2011, foi realizada uma visita ao local escolhido para as coletas, uma área no sudoeste da ilha do Maranhão (02° 31' 47" S; 44° 18' 10" W), município de São Luís- MA, onde foram formadas lagoas, alagados e poças temporárias, onde a espécie objeto do estudo ocorre e se reproduz (Fig.4). Nesta área não foi detectada a influência do uso de contaminantes agrícolas, servindo para observação dos animais que se encontravam em atividade, para confirmação da espécie que seria utilizada no estudo e coleta de casais e desovas.



Figura 4. Área de coleta a sudoeste da ilha do Maranhão, município de São Luís, Maranhão.

A única coleta realizada para obtenção dos anuros para o experimento aconteceu no período de chuvas em São Luís – MA, no mês de março de 2011. A temperatura e o pH da água foram medidos por volta das 12:00 horas (29⁰C e 5,2, respectivamente), que está próximo das medidas nas poças dessa mesma área realizadas por Leal (2007), com pH variando de 5,56 a 8,77 e temperatura de 25,9⁰C a 28,1⁰C.

Em 29 de março de 2011 coletamos seis casais em amplexo de espécie *D. minutus*, que foram colocados em sacos plásticos para desovarem. As seis desovas obtidas foram trazidas até o laboratório de herpetologia da Universidade Federal do Maranhão, onde os girinos eclodiram. Os casais após desovarem foram liberados na mesma área de coleta.

3.2 Espécie analisada

Dendropsophus minutus é um anuro habitante das florestas tropicais úmidas (incluindo clareiras), borda da floresta e pântanos. Embora seja muito comum nas terras baixas, onde as pererecas se reúnem em grande número em poças temporárias na mata, também é comum em torno de valas na estrada e poças nas florestas (DUELLMAN 1997). Essa espécie também coloniza a água parada deixada pelo homem causada por atividades agrícolas e construções de estradas (GORZULA & SEÑARIS 1998). Esta espécie pode ser considerada muito versátil, de acordo com a sua vasta gama de latitude, bem como em altitude (CEI 1980). É uma espécie arborícola, mas durante o tempo de reprodução é comumente encontrada em campos abertos perto de águas rasas. A postura ocorre nos corpos d'água lênticos em pequenos lagos ou poças grandes (POMBAL & HADDAD 2005). Os machos vocalizam em arbustos perto ou sobre poças. O amplexo é axilar. As fêmeas depositam cerca de 400 ovos em uma massa globular que se adere às plantas emergentes em lagoas. As larvas eclodem e caem na água, onde completam o desenvolvimento até a metamorfose. O girino possui uma linha escura que vai da ponta do focinho ao olho e ocorrem dispersos por toda a coluna de água se alimentando principalmente de algas (KWET 1999). A larva é caracterizada como nectônica e neustônica, possuidora de um corpo maior e mais estreito, além de possuir nadadeira ventral mais alta e focinho mais comprido quando comparado com espécies bentônicas e fossoriais, o que pode estar

relacionado ao hábito macrofágico típico do gênero (PEZZUTI 2011). Em um estudo realizado em um tanque de piscicultura no sudeste do Brasil, os girinos desta espécie apresentaram itens alimentares predominantemente planctônicos, sugerindo um comportamento alimentar mais sugador (FONSECA 1996). Nos mesocosmos deste estudo as larvas se alimentavam tanto na coluna d'água, como raspando a superfície lateral dos tanques.

Em cada tanque, no início do experimento, foram adicionados 100 girinos bentônicos de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae), cujo desenvolvimento seria avaliado também sob o efeito do contaminante, mas que foram predadas pelas libélulas ou morreram por outras causas não detectadas, não sendo possível a comparação.

3.3 Técnicas utilizadas

As desovas obtidas foram mantidas separadamente em aquários e as larvas em início do estágio 25 (GOSNER 1960) e de tamanho similar foram colocadas nos mesocosmos em densidades similares à encontrada no ambiente natural por Soares (2007). Assim, introduzimos 30 girinos em cada um dos 32 tanques, sendo cinco de cada desova, para que ocorresse uma maior variabilidade genética, totalizando 960 larvas. As larvas passaram 5 dias aclimatando nos tanques antes da primeira adição do contaminante naqueles sorteados para receber a concentração C1, C2 ou C3. Foi feita a reaplicação do contaminante 10 dias após a primeira adição, simulando uma segunda aplicação realizada nos campos agrícolas.

Os parâmetros físico-químicos como pH, temperatura, condutividade, TDS (Total Dissolved Solids- material em dispersão que dificulta a proliferação das algas) e o oxigênio dissolvido foram medidos em todos os tanques, antes e após a aplicação do contaminante. O material de descarte, ou seja, a água retirada dos mesocosmos ao final do experimento, com

resíduos do contaminante, foi degradada segundo técnicas utilizadas pelo Núcleo de Análises de Resíduos de Pesticidas (NARP) da UFMA.

Como variáveis resposta para avaliar o efeito do contaminante sobre os girinos utilizamos: número de indivíduos que sobreviveram até a metamorfose (metamorfos); tempo até a metamorfose – número de dias desde a desova até a metamorfose; tamanho na metamorfose – comprimento total, do focinho até a cloaca (CRC), medido com um paquímetro (precisão de 0,1 mm) e massa, medido com balança de precisão de 0,001g; taxa de crescimento – incremento no comprimento do corpo em relação ao comprimento inicial, dividido pelo tempo até a metamorfose; proporção de indivíduos com deformações físicas. Estimamos o tamanho inicial dos girinos introduzidos nos tanques através da pesagem e obtenção do CRC de uma amostra de 100 larvas de mesmo tamanho e origem das introduzidas nos tanques.

As variáveis resposta foram analisadas por análise de covariância através do programa SYSTAT 12.0 (2007) Cranes Software International Ltd, Bangalore, India. Avaliamos a distribuição normal dos dados através do teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias através do teste de Levene, o que indicou necessário transformar os dados (em logaritmo) de indivíduos (ninfas de libélulas e metamorfos) e de tempo para atingir a metamorfose. O número de ninfas de libélulas em cada tanque foi utilizado como covariável nas análises, uma vez que a presença do predador poderia ter afetado os resultados direta ou indiretamente. Não houve significância na interação entre o tratamento (pesticida) e a covariável (ninfas de libélulas), indicando homogeneidade das inclinações.

4 RESULTADOS

As ninfas de libélulas (Odonata, Libellulidae) que colonizaram os tanques eram da espécie *Pantala flavescens* (Fabricius, 1798) (Fig. 5).

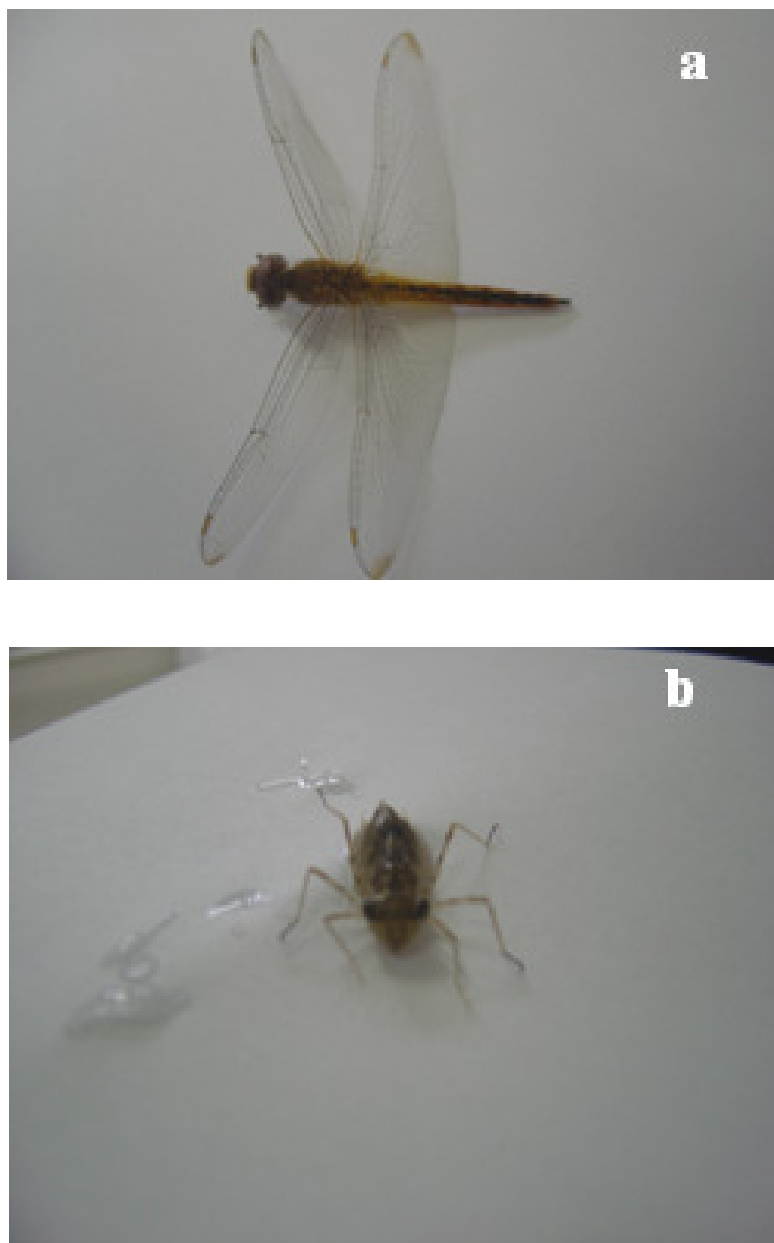


Figura 5. a) Libélula da espécie *Pantala flavescens*; b) Ninfã da mesma espécie de libélula, que colonizou os mesocosmos no presente estudo.

A ocorrência dessas ninfas de libélulas, apesar de maior em dois tanques com maior concentração de pesticida (Fig. 6), não diferiu significativamente entre os tanques dos diferentes tratamentos (ANOVA: $F_{3,28} = 1,3$; $p = 0,294$).

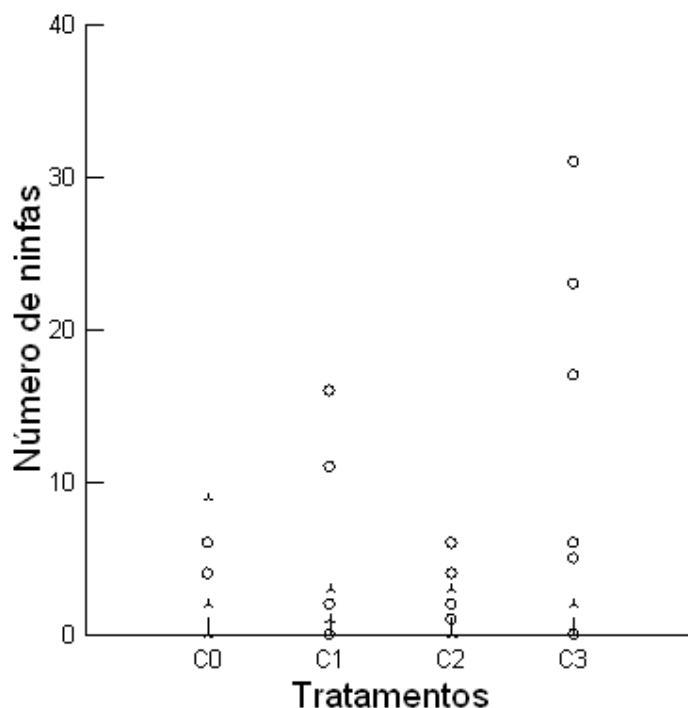


Figura 6. Número de ninfas de libélulas encontradas nos tanques nos diferentes tratamentos (C0- controle; C1- $0,04\mu\text{g L}^{-1}$; C2- $0,1\mu\text{g L}^{-1}$; C3- $0,2\mu\text{g L}^{-1}$).

Ao final do experimento foram obtidos 278 indivíduos de *D. minutus* com metamorfose completa, sendo 90 dos tanques controle (ausência de contaminante); 76 obtidos na concentração 1 ($0,04\mu\text{g L}^{-1}$); 40 na concentração 2 ($0,1\mu\text{g L}^{-1}$) e 72 nos tanques com a concentração 3 ($0,2\mu\text{g L}^{-1}$). O efeito do tratamento (pesticida) ajustado pela

covariável (quantidade de ninfa de libélula) não foi significativo para o número de girinos sobreviventes que metamorfosearam (Fig. 7; ANCOVA: $F_{3,27}=1,255$; $p=0,310$).

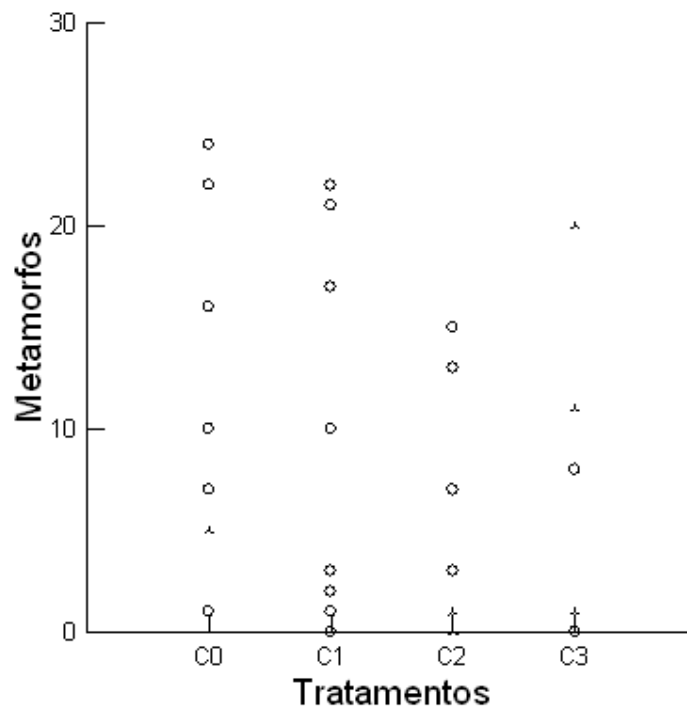


Figura 7. Número de *Dendropsophus minutus* metamorfoseados por tratamento, onde C0- controle; C1- $0,04\mu\text{g L}^{-1}$; C2- $0,1\mu\text{g L}^{-1}$; C3- $0,2\mu\text{g L}^{-1}$.

A média da massa encontrada para os girinos da espécie no início do experimento foi de $0,003\text{g}$ ($N=100$; $SD=0,349$) e a do comprimento rostro-cloacal (CRC) foi de $6,32\text{mm}$ ($N=100$; $SD=2,1$). O tamanho dos metamorfos (CRC, Fig. 8, e massa, Fig. 9; Tabela 1) também não diferiu significativamente entre os tratamentos (ANCOVA: CRC: $F_{3,23}=1,560$; $p=0,226$; massa: $F_{3,23}=0,623$; $p=0,607$).

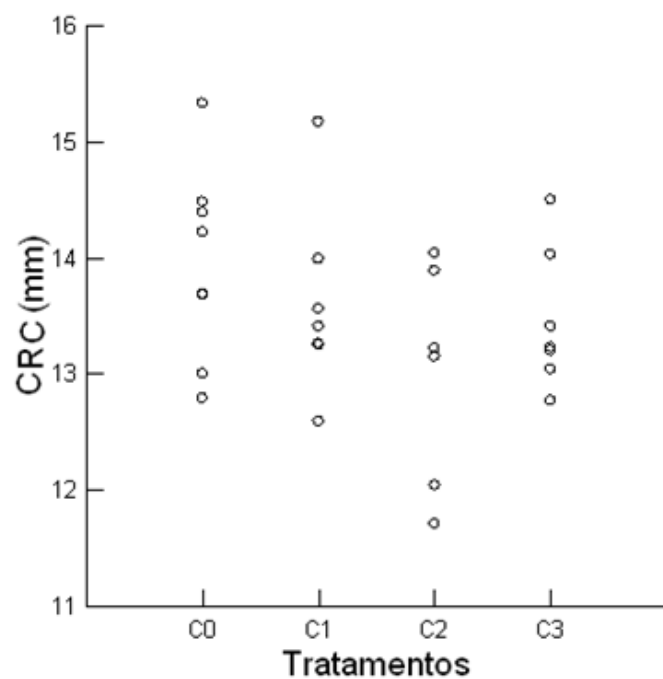


Figura 8. Comprimento rostro-cloacal dos indivíduos de *Dendropsophus minutus* metamorfoseados por tratamento, onde C0- controle; C1- 0,04µg L⁻¹; C2- 0,1 µg L⁻¹; C3- 0,2µg L⁻¹.

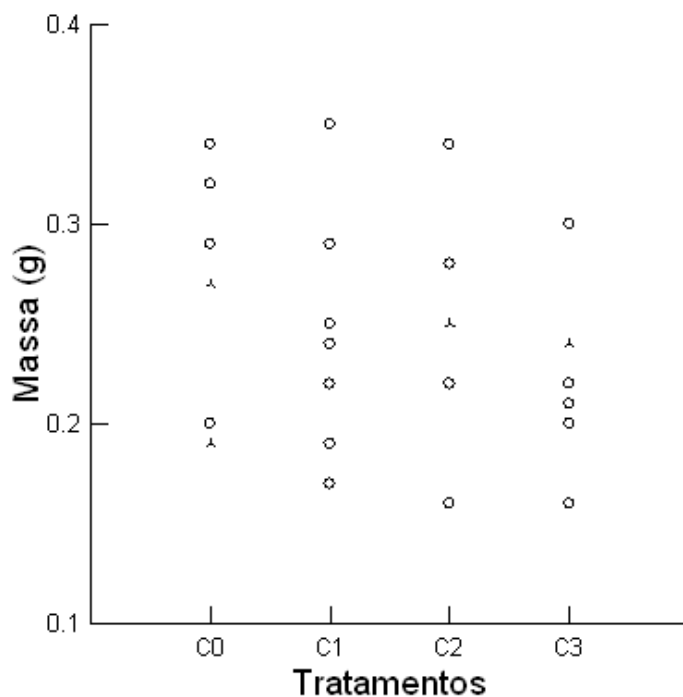


Figura 9. Massa corporal (em gramas) dos indivíduos de *Dendropsophus minutus* metamorfoseados por tratamento, onde C0- controle; C1- 0,04µg L⁻¹; C2- 0,1 µg L⁻¹; C3- 0,2µg L⁻¹.

Tabela I. Respostas medidas do peso em gramas e comprimento rostro-cloacal (CRC) em mm dos girinos de *Dendropsophus minutus* nos tratamentos com diferentes concentrações de Paration Metílico (C0-controle; C1- 0,04µg L⁻¹; C2- 0,1 µg L⁻¹; C3- 0,2µg L⁻¹), onde $\bar{x}$ - média e σ - desvio-padrão.

TRATAMENTOS	PESO		CRC	
	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$
C0	0,079	0,25	1,532	14,55
C1	0,098	0,21	1,292	13,89
C2	0,077	0,49	1,030	13,50
C3	0,056	0,51	1,071	13,14

O experimento nos sistemas artificiais teve duração de 86 dias. No trigésimo dia de experimento o primeiro indivíduo metamorfoseou. A maioria dos girinos metamorfoseou com 50 dias (137 metamorfos), sendo C1 o tratamento que apresentou mais indivíduos metamorfoseados nesse intervalo de tempo (Fig. 10). No entanto, entre 30 e 40 dias de desenvolvimento, houve mais metamorfoses nos tratamentos controle. Com 70 dias, houve um pico tardio de metamorfose para o tratamento com maior concentração de pesticida.

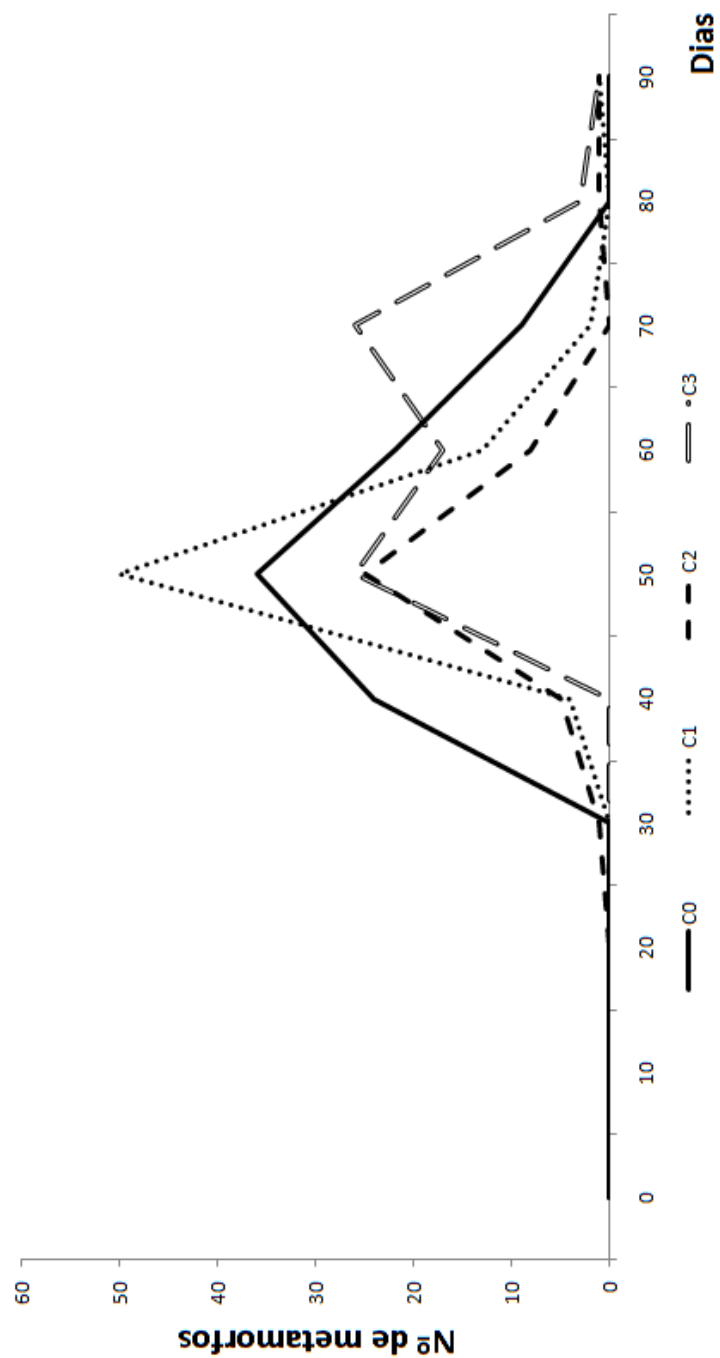


Figura 10. Número de metamorfos de *Dendropsophus minutus* nos tratamentos com Paration Metílico (C0- controle; C1- 0,04µg L⁻¹; C2- 0,1 µg L⁻¹; C3- 0,2µg L⁻¹) em poças artificiais ao longo do tempo em dia.

O efeito do pesticida ajustado pela quantidade de ninfa de libélula foi significativo para o tempo até a metamorfose (ANCOVA: $F_{3, 21} = 3,777$; $p = 0,026$), com os girinos do tratamento C3 demorando mais tempo para metamorfosear do que os girinos do tratamento C2 (Fig. 11, Tukey C2 x C3: $p = 0,027$). A taxa de crescimento não diferiu entre os tratamentos (Fig. 12, ANCOVA: $F_{3, 21} = 1,856$; $p = 0,168$).

Houve a ocorrência de sete metamorfos (2,52%) apresentando deformações nos membros (Fig. 13), sendo 3 provenientes de tanques com concentração C1 e 4 com C3. Além disso, 30 indivíduos foram encontrados mortos na fase final de metamorfose (9,74% dos girinos que chegaram nessa fase final), sendo 4 em tanques controle (1,30%), 6 em C1 (1,95%), 9 em C2 (2,92%) e 11 em C3 (3,57%). Aparentemente houve dificuldade de locomoção ou aderência, impedindo a escalada desses animais nas paredes dos tanques, o que levou à morte por afogamento.

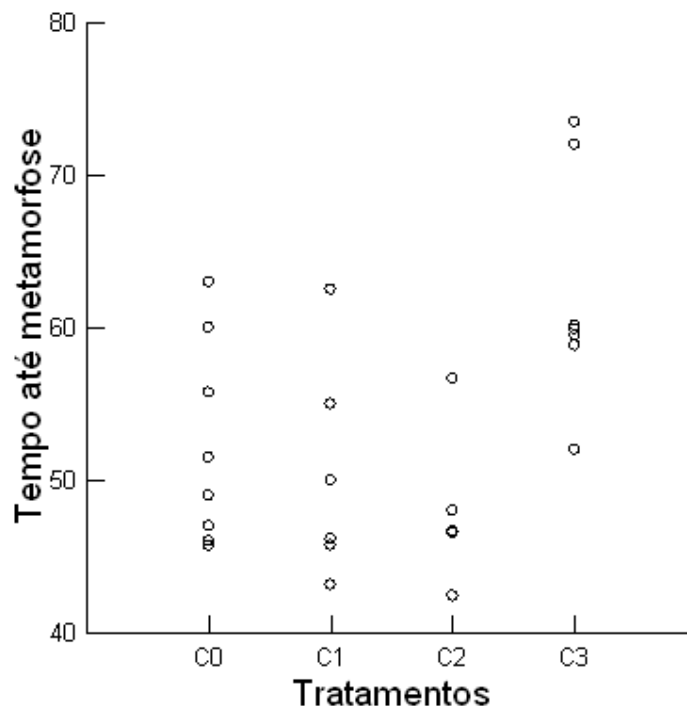


Figura 11. Tempo (em dias) que os indivíduos de *D.minutus* levaram até a metamorfose completa nos tratamentos com o pesticida, sendo C0- controle; C1- $0,04\mu\text{g L}^{-1}$; C2- $0,1\mu\text{g L}^{-1}$; C3- $0,2\mu\text{g L}^{-1}$.

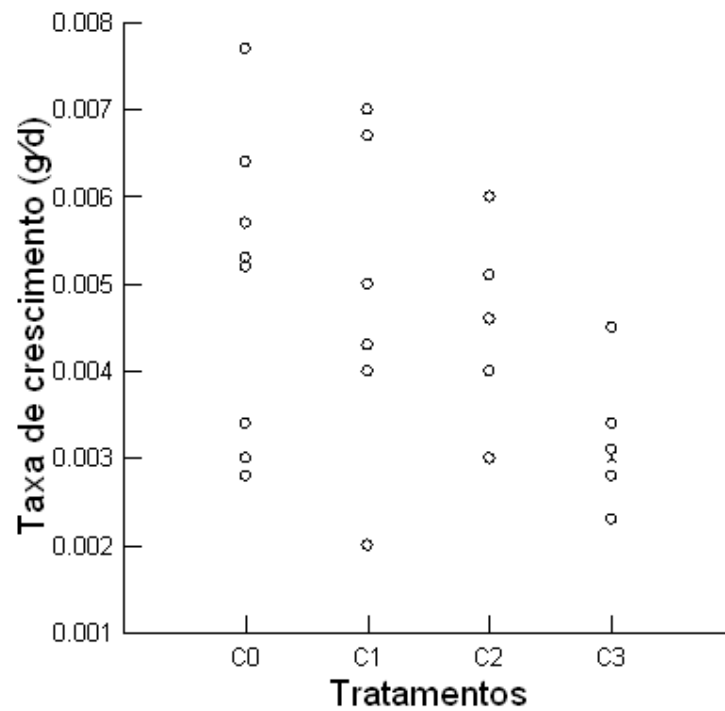


Figura 12. Taxa de crescimento (em gramas /dias) dos indivíduos de *Dendropsophus minutus* nas poças artificiais, sendo C0- controle; C1- 0,04µg L⁻¹; C2- 0,1 µg L⁻¹; C3- 0,2µg L⁻¹.



Figura 13. Metamorfos de *Dendropsophus minutus* com deformações nos membros.

5 DISCUSSÃO

A recomendação mais utilizada para o controle de larvas de odonata em viveiros de piscicultura é de 0,5 mg L⁻¹ de Paration Metílico (GARADI *et al.* 1988; TAMASSIA 1996). As larvas de odonatas morrem na concentração de 0,5 ppm do composto formulado do contaminante, mas essa concentração não seleciona o zooplâncton. As concentrações utilizadas no presente estudo foram bem menores do que a recomendada, o que explica a não eliminação das ninfas dos nossos sistemas artificiais.

A colonização de sistemas artificiais por ninfas de libélulas (Odonata) com hábito altamente predatório tem constituído um problema não só no Brasil, mas também em outros países (SANTOS *et al.* 1988). Nos viveiros de piscicultura é um dos fatores que contribuem para a redução da sobrevivência dos alevinos e conseqüentemente para a diminuição dos lucros da produção (CESNIK & QUEIROZ 2004). As ninfas das libélulas que colonizaram os tanques são de uma espécie exofítica, territorialista e migratória, que ocorre em toda região pantropical (SRYGLEY 2003). Devido ao comportamento migratório, a ocorrência desta espécie em áreas não alagadas é comum (CARVALHO & CALIL 2000; COSTA *et al.* 2002). Existe a suspeita de que essas ninfas tenham colonizado os tanques a partir de ovos depositados na própria tela que os recobre (DE MARCO JR., com. pess.). Apesar de essas ninfas serem consideradas um dos principais predadores do ambiente aquático, como elas ficam associadas às plantas aquáticas ou ao fundo dos corpos d'água (DE MARCO JR. & LATINI 1998), possivelmente elas não predaram os girinos de *D. minutus*, porque eles permaneciam na coluna de água. No entanto, é provável que elas tenham sido responsáveis por parte da mortalidade das larvas bentônicas de *P. cuvieri* introduzidas no início do experimento.

Boone *et al.* (2001) demonstraram através de experimentos que a exposição contínua a um pesticida pode manter a comunidade em constante estado de perturbação, impedindo assim a resiliência, que é a capacidade concreta de retornar ao estado natural, superando uma situação crítica. Observaram ainda que concentrações menores apresentaram maiores impactos sobre a comunidade. O nosso experimento foi desenhado para uma exposição a concentrações relativamente baixas, repetidas uma única vez, apenas no primeiro terço do desenvolvimento, simulando a reaplicação de pesticidas que ocorre nos campos agrícolas e aproximando as condições experimentais à realidade. Mesmo sem provocar uma exposição continuada ao pesticida, uma vez que ele se degrada no ambiente, nos mesocosmos com girinos se desenvolvendo na ausência do contaminante, parte dos indivíduos metamorfoseou mais cedo e com o mesmo tamanho que nos tanques com pesticidas. Relyea (2003) relata que o crescimento rápido dos girinos, alcançando rapidamente um tamanho que os torna menos vulneráveis, acaba limitando a ação de predadores. Girinos maiores são relativamente mais ativos que girinos menores, pois não estão em risco quando expostos a pequenos predadores. Por outro lado, o atraso no desenvolvimento pode acarretar em maiores riscos de predação, morte por secagem do corpo d'água ou problemas de disponibilidade de alimento (SEMLITSCH 1987). Como o experimento foi desenvolvido no auge da estação chuvosa, os tanques mantiveram o nível de água constante, e não houve o risco de dessecação. Portanto, não houve pressão para que os girinos metamorfoseassem mais rápido e o efeito do pesticida na maior concentração foi detectado apenas no atraso no desenvolvimento. Os girinos puderam continuar crescendo até um tamanho similar aos dos outros tratamentos, antes de metamorfosear.

Vários autores como Ouellet *et al.* (1997) relatam que deformidades de membros e anomalias ocasionalmente ocorrem em comunidades naturais de anfíbios. Segundo Blaustein & Jonhson (2003) usualmente essa proporção não ultrapassa 5% em populações naturais

saudáveis e em geral envolvem apenas dedos faltando ou partes de um membro. As anormalidades mais frequentes descritas na literatura incluem deformidades nos olhos, incompleta absorção da cauda, membros extras e membros amputados (OUELLET *et al.* 1997; METEYER *et al.* 2000; JOHNSON *et al.* 2002; LANNOO *et al.* 2003; SCHOFF *et al.* 2003). Considerando-se apenas os metamorfos com deformações, não poderíamos atribuir essa baixa porcentagem ao efeito do pesticida. Porém, somando-se os que aparentemente morreram no final da metamorfose por problemas de formação nos membros, devemos considerar, embora com cautela, o efeito do pesticida.

Ouellet *et al.* (1997) observaram alta prevalência de deformidades em membros posteriores em sapos e rãs de zonas agrícolas expostos a pesticidas. Verificaram várias anormalidades evidentes que possivelmente interferiram na natação e salto e provavelmente constituem desvantagem na sobrevivência. Apesar do fato de que muitos agentes abióticos e bióticos são potencialmente prejudiciais ao desenvolvimento dos membros, os contaminantes agrícolas são considerados agressores primários. Assim, a presença de uma deformidade em membros de anuros pode ser uma das ferramentas para se avaliar a saúde do ecossistema e a presença de contaminantes ambientais. Britson & Threlkeld (1998) também exibiram em experimento o aumento da ocorrência de deformações, predominantemente do membro posterior, em várias espécies de anfíbios anuros de diferentes regiões da América do Norte. E as investigações sobre as possíveis causas também revelam os contaminantes químicos como um dos principais estressores.

Concluindo, neste estudo verificamos em poças artificiais que girinos nectônicos podem ter o desenvolvimento larvário prolongado devido ao contato com o pesticida Paration Metílico no terço inicial do seu desenvolvimento, o que é um risco para espécies que utilizam ambientes temporários. Houve indícios também da associação do pesticida com deformações, causando mortalidade na metamorfose.

6 CONCLUSÕES

- As concentrações utilizadas no presente estudo foram bem menores do que a recomendada para eliminação de libélulas em tanques de piscicultura, o que explica a não eliminação das ninfas dos nossos sistemas artificiais.
- As ninfas de libélulas possivelmente não predaram os girinos de *D. minutus*, já que estes permaneciam na coluna de água e as ninfas estão mais associadas ao fundo dos corpos d'água.
- É provável que as ninfas tenham sido responsáveis por parte da mortalidade das larvas bentônicas de *P. cuvieri* introduzidas no início do experimento, já que permaneciam no mesmo microhabitat nos mesocosmos.
- A presença de uma deformidade em membros de anuros pode ser uma das ferramentas para se avaliar a saúde do ecossistema e a presença de contaminantes ambientais.
- Os girinos nectônicos podem ter o desenvolvimento larvário prolongado devido ao contato com o pesticida Paration Metílico no terço inicial do seu desenvolvimento.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR LH, Correa CF, Moraes C (2000) **Efeitos do pesticida organofosforado methyl parathion (folidol 600) sobre o metabolismo e atividade de colinesterase do teleósteo de água doce, *Brycon cephalus* (matrinxã).** In: Espíndola ELG, Botta-Paschoal CMR, Rocha O, Boher MBC, Oliveira-Neto AL(ed) Ecotoxicologia: perspectivas para o Século XXI, RiMa, São Carlos, p.575
- AGUIAR, L.H.; G. M. I.M Avilez.; Altran, A. E. and C.F.Cristina Ferro Corrêa. 2004. **Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*.** Environmental Research 95.224–230.
- ARAUJO, T.M.R. 2006. **Degradação do Paration Metílico em Ambientes Aquáticos Naturais.** Tese de mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense.
- BAIRD, Colin. 2002. **Química Ambiental.** 2. ed. Porto Alegre: Bookman,. 622p.
- BARTH, B. J. and R. S. Wilson, 2009. **Life in acid: interactive effects of pH and natural organic acids on growth, development and locomotor performance of larval striped marsh frogs (*Limnodynastes peronii*).**
- BIRGE, W. J., J. A., Black, A. G. Westerman and B. A. Ramey. 1983. Fish and amphibian embryos—A model system for evaluating teratogenicity. *Fundam. Appl. Toxicol.* **3**: 237–242.
- BLAUSTEIN, A.R. & JOHNSON P.T.J 2003.) The complexity of deformed amphibians. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1, 87–94.
- BOONE, M. D., and C. M. Bridges. 1999. The effect of temperature on the potency of carbaryl for survival of tadpoles of the green frog, *Rana clamitans*. **Environmental Toxicology and Chemistry** 18:1482–1484.
- BOONE, M. D., C. M. BRIDGES, B. B. ROTHMEL, 2001. Growth and development of larval green frogs (*Rana clamitans*) exposed to multiple doses of an insecticide. **Oecologia** 129:518–524.
- BOONE, M.D and James, S.M. 2003. Interaction of an insecticide, herbicide, and natural stressors in amphibian community mesocosms. **Ecological Application**, 13(3): 829–841.
- BOONE, M. D.; Semlitsch, R. D. 2002. Interaction of an insecticide with competition and pond drying in amphibian communities. **Ecological Applications**, 12(1): 307–316.
- BOONE, M. D., and R. D. Semlitsch. 2003. **Interactions of bullfrog tadpole predators and an insecticide: predation re-lease and facilitation.** *Oecologia* 137:610–616.

- BOONE, M.D., R.D. Semlitsch, J.M. Fairchild, and B.B. Rothermel. 2004. Effects of an insecticide on amphibians in large-scale experimental ponds. **Ecological Applications** 14:685-691.
- BOONE, Michelle D. et al. 2005. Evaluating the Role of Environmental Contamination in Amphibian Population Declines. In: C. Gascon; J. P. Collins; R. D. Moore; D. R. Church; J. E. McKay e R. Mendensol III (eds.), Amphibian Conservation Action Plan. **The World Conservation Union (IUCN)**, p.32-35.
- BOONE, M. D., and R. D. Semlitsch. 2001. Interactions of an insecticide with larval density and predation in experimental amphibian communities. *Conservation Biology* **15**: 228–238.
- BOONE, M. D., R. D. SEMLITSCH, E. E. LITTLE, M. C. DOYLE. Multiple stressors in amphibian communities: interactive effects of chemical contamination, bullfrog tadpoles, and bluegill sunfish. **Ecological Applications**, 17:291-301. 2007
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde - Centro Nacional de Epidemiologia. **Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, 1998. 523p.
- BRASIL, 2004. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**. Brasília, 2004. 328p.
- BRITO, N. M.; Amarante Jr. O. P.; Abakerli R.; Santos, T. C. R.; Ribeiro, M. L. 2001. **Risco de contaminação de águas por pesticidas aplicados em plantações de eucaliptos e coqueiros: Análise preliminar**.
- BRITSON, C. A.; THRELKELD, S. T.. Abundance, Metamorphosis, Developmental, and Behavioral Abnormalities in *Hyla chrysoscelis* Tadpoles Following Exposure to Three Agrichemicals and Methyl Mercury in Outdoor Mesocosms. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 61(2):154-161. 1998.
- BROCK, T.C.M., R.P.A. van Wijngaarden and G.J. van Geest, 2000. **Ecological Risk of Pesticides in Freshwater Ecosystems**. Part 2: Insecticides. Green World Research, Wageningen, The Netherlands.
- CALDAS, E. D. SOUZA, L. C. K. R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Rev. Saúde Pública**, 34, 529–537. 2000.
- CARVALHO, A. L.; CALIL, E. R. 2000. Chaves de identificação para as famílias de Odonata (Insecta) ocorrentes no Brasil, adultos e larvas. **Pap. Avulsos Zool.**, 41(15): 223-241.
- CARVALHO, A. R.; SCHLITTLER, F. H. M.; TORNISIELO, V. L. 2000. Relações da atividade agropecuária com parâmetros físico-químicos da água. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 5, p. 618-622.
- CEI, J. M. "Amphibians of Argentina." **Monitore Zoologica Italiano**, New Series Monografia, Firenze, 2, 1-609. 1980.

- CESNIK, R.; QUEIROZ, J. F. de. Produção de fungos entomopatogênicos para o controle de larvas de *Odonata* na piscicultura. In: I CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE AQUICULTURA E BIOLOGIA AQUÁTICA, 2004, Vitória. **Anais...** Vitória: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2004. 1 CD.
- COMISSÃO EUROPÉIA, 2002. **Diretório Geral de Saúde e proteção do consumidor.** Resultados da reunião de 18/10/02 a respeito da avaliação do paration metílico, SANCO/2665/01- final.
- COSTA, J. M., LOURENÇO, A. N.; VIEIRA, L. P.. Chave de identificação para imagos dos gêneros de Libellulidae citados para o Brasil – Comentários sobre os gêneros (Odonata: Anisoptera). **Entomol. Vect.**, 9(4): 477-504. 2002.
- DAVIDSON, C. Declining downwind: amphibian population declines in California and historical pesticide use. **Ecol Appl**, 14:1892–1902. 2004.
- DAVIDSON, C.; SHAFFER, H. B; JENNINGS, M. R. 2002. Spatial tests of the pesticide drift, habitat destruction, UV-B, and climate-change hypotheses for California amphibian declines. **Conserv Biol**, 16: 1588–1601.
- DE MARCO, J. R. P. & LATINI, A. O. 1998. Estrutura de guildas e riqueza de espécies em uma comunidade de larvas de Anisoptera (Odonata), In: J.L. Neiss Imian; Carvalho, A.L. (Eds.). Ecologia de Insetos Aquáticos. Rio de Janeiro: **Séries Oecologia Brasiliensis**, PPGE-UFRJ, P. 101-112.
- DUELLMAN, W. E. e Trueb, L., 1994. **Biology of amphibians**. John Hopkins University Press.
- DUELLMAN, W. E. 1997. Amphibians of La Escalera Region, southeastern Venezuela: Taxonomy, Ecology, and Biogeography. **Scient. Papers**. 2:1-52.
- ETEROVICK, P. C. & SAZIMA, I. 2000. **Structure of an anuran community in a montane meadow in southeastern Brazil: effects of seasonality, habitat, and predation.** *Amphibia-Reptilia* 21:439-461.
- FERRACINI, A. V. L.; Pessoa, M.C.Y.; Silva, A.S. & Spadotto, C.A. 2001. Análise de Risco de contaminação das águas subterrâneas e superficiais da região de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA). **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v .11, p. 1-6, jan/dez.
- FIORAMONTI, E.; Semlitsch, R. D.; Reyer, H.; Fent, K.. **Effects of triphenyltin and pH on the growth and development of *Rana lessonae* and *Rana esculenta* tadpoles.** *Environmental Toxicology and Chemistry* {HYPERLINK <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.v16:9/issuetoc>} pages 1940–1947. 1997.
- FLEEGER, J.W., Carman K.R. and Nisbet R.M. 2003. **Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems.** *Sci. Total Environ.* 317: 207 –233.
- FONSECA, M.G. 1996. **Distribuição espacial e partilha de recursos alimentares durante a fase larvária entre *Scinax fuscovaria* A. Lutz, 1925 e *Hyla minuta* Peters,**

- 1872 em um corpo d'água da região de Botucatu, São Paulo (Amphibia, Anura, Hylidae).** Dissertação de Mestrado em Zoologia, UNESP-Botucatu.
- FOURNIER, M., Lacroix, A., Voccia, I. and Brousseau, P., 1998. Phagocytic and metabolic activities of macrophages from mummichog naturally exposed to pulp mill effluents in Miramichi River. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 40, pp. 177–183.
- FREDA, J. and Dunson, W.A. 1985. **Field and laboratory studies of ion balance and growth rates of Ranid tadpoles chronically exposed to low pH.** Copeia, pp. 415-423.
- FUTINO, A.M.; Silveira, J.M.J.F. 1991. **A indústria de defensivos agrícolas no Brasil.** *Agricultura em São Paulo*, São Paulo, 38: 1-44. Apud Zavatti, L.M.S. e Abakerli, R.B. (1999) Resíduos de Agrotóxicos em Frutos de Tomate, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34 (3): 473-480.
- GARADI, P.; Domarco, R.C.; Araujo, O.J. & Pinheiro, C.W.L. 1988. Avaliação do uso de inseticidas (orgânicos fosforados) no combate às odonatas e na seleção zooplancônica em piscicultura de alevinagem. In: CODEVASF – Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco. **Estudos de piscicultura.** 2ª ed., Brasília: 71p.
- GASPAR, S. M. F. S.; NUNES, G. S.; PINHEIRO, C.U.B. & AMARANTE JUNIOR, O.P. 2005. Avaliação de risco de pesticidas aplicadas no município de Arari, Maranhão, Brasil: base para programa de controle ambiental do Rio Mearim. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, n. 15, p. 43-54.
- GORZULA, S. & SENÂRIS, J.C. 1998. **Contribution the herpetofauna of the Venezuelan Guavana.** A data base Science Guaianae, 1-270.
- GOSNER, K. L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, 16:183–190.
- GOSS, D.W. 1992. **Screening procedure for soils and pesticides for potential water quality impacts.** Weed Technology, v. 6, n.3, p. 701-708.
- GRIGGS, J. L. 2006. **Effects of Atrazine and Metolachlor on Snails, Tadpoles, and Their Trematode Parasites.** Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Biological Sciences.
- GUSTAFSON, D.I. Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 8, n. 4, p.339-357, 1989.
- HANAZATO, T., and M. Yasuno. 1990. **Influence of time of application of an insecticide on recovery patterns of a zooplankton community in experimental ponds.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology 19:77–83.
- HANAZATO, T. 2001. **Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective.** Environmental Pollution, 112, 1–10.

- HAYES, T. B., A. Collins, M. Lee, M. Mendoza, N. Noriega, A. A. Stuart; A. Vonk. **Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99:5476-5480. 2002.
- IUCN. **International Union for Conservation of Nature.** Red List of Threatened Species. Version 2010.1. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>.
- JAMES, S. M.; E. E. Little; R. D. Semlitsch. Responses of two amphibian species to chronic cadmium exposure as tadpoles in aquatic outdoor mesocosms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 24:1994-2001. 2005.
- JOHN, W. F.; Kevin, R. C. & Roger, M. N. 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. **The Science of The Total Environment**, Vol. 317, pp. 207-233.
- JOHNSON P T J; K B Lunde; E M Thurman; E G Ritchie; S N Wray; D R Sutherland, et al. 2002. Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the western United States. **Ecological Monographs**, vol. 72, pages: 151-168.
- JOHNSON, P. T. J; Chase, J. M; Dosch, K. L.; Hartson, R. B.; Gross, J. A.; Larson, D. J.; Sutherland, D. R.; Carpenter, S. R. **Aquatic eutrophication promotes pathogenic infection in amphibians.** Proc Natl Acad Sci. USA 104:15781–15786. 2007.
- KIESECKER, J.M. **Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature?** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99(15): 9900–9904. 2002.
- KWET, A. & DI-Bernardo. 1999. Pró-Mata. **Anfíbios - Amphibien - Amphibians.** Porto Alegre: EDIPUCRS. 107 p.
- LANNOO, J. J D.R. Sutherland, P. Jones, D. Rosenberry, R.W. Klaver, D.M. Hoppe, P.T.J. Johnson, K.B. Lunde, C. Facemire and J.M. Kapfer, Multiple causes for the malformed frog phenomenon, G. Linder, S. Krest, D. Sparling, E. Little, Editors , **Multiple Stressor Effects in Relation to Declining Amphibian Populations**, *ASTM STP 1443*, ASTM International, West Conshohocken, PA (2003), pp. 233–262.
- LEAL, C.B.. **Efeitos da alteração da quantidade de alimento no crescimento e desenvolvimento de girinos de *Physalaemus cuvieri* (ANURA: LEIUPERIDAE).** Dissertação de mestrado em Biodiversidade e Conservação. 2007.
- LEITE, P.Z; Margarido, TC; de Lima D, Rossa-Feres, Dde C, de Almeida EA. 2010. **Esterase inhibition in tadpoles of *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae) as a biomarker for exposure to organophosphate pesticides.** Environ Sci Pollut Res Int. 2010 Sep;17(8):1411-21.
- LENOIR, J. S; McConnell, L. L; Fellers, G. M; Cahill, T. M; Seiber, J. N. 1999. Summertime transport of current-use pesticides from California's central valley to the Sierra Nevada Mountain range, USA. **Environ Toxicol Chem**, 18:2715–2722.
- MANAHAN, S.E. 2003. **Toxicological Chemistry and Biochemistry**, 3rd ed., Lewis Publishers: Boca Raton.

- MATTOS, L.M.; Silva, E. F. 1999. **Influência das propriedades de solos e de pesticidas no potencial de contaminação de solos e águas subterrâneas**. Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba, v. 9, p.103-124, jan./dez.
- MAYER, F. L. and M. R. Ellersieck. 1986. **Manual of acute toxicity: interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals**. Fisheries and Wildlife Service Resource Publication Number 160.
- MCCONNELL, LL; LeNoir JS, Datta S, Seiber JN. 1998. Wet deposition of current-use pesticides in the Sierra Nevada Mountain range, California, USA. **Environ Toxicol Chem** 17:1908–1916.
- METEYER, C.U. et al. Eaton-Poole & J.G. 2000. Burkhart, Hind limb malformations in free-living northern leopard frogs (*Rana pipiens*) from Maine, Minnesota, and Vermont suggest multiple etiologies. **Teratology**, **62**, pp. 151–171.
- MILLS, N. E., and R. D. Semlitsch. 2004. Competition and predation mediate the indirect effects of an insecticide on southern leopard frogs. **Ecol Appl** 14:1041-1054.
- MONTEIRO, Diana Amaral, Jeane Alves de Almeida, Francisco Tadeu Rantin, Ana Lúcia Kalinin. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 143 (2006) 141–149.
- MUNNECKE, D.M; Hsieh, D.P. 1976. Pathways of microbial metabolism of parathion. **Appl Environ Microbiol**. 1976 Jan;31(1):63-9.
- OLLE, C. D. 2007. **Efeito do inseticida organofosforado metilparation (Folisuper 600 BR) sobre a função cardio-respiratória do peixe teleósteo matrinxã, *Brycon cephalus***. São Carlos.
- OUELLET, M; J. Bonin, J. Rodrigue, J.-L. DesGranges; S. Lair. **Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats**. J. Wildlife Dis. **33** (1997), pp. 95–104.
- PATRICK G. L.; *An Introduction to Medicinal Chemistry. 2th ed., Ed. Oxford, 432, 2001.*
- PERES, T. B. 2000. **Efeito da Aplicação de Pesticidas na Atividade Microbiológica do solo e na Dissipação do *C-PARATION METÍLICO**. Tese de mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações.
- PEZZUTI, T. L. 2011. **Girinos do Quadrilátero Ferrífero, Sudeste do Brasil: Ecomorfologia e Chave de Identificação Interativa**. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais.
- POMBAL JR, J.P; Haddad, C.F.B. Estratégias e modos reprodutivos de anuros (Amphibia) em uma poça permanente na Serra de Paranapiacaba, Sudeste do Brasil. **Pap. Avulsos Zool.** (São Paulo) v.45 n.15 São Paulo 2005.

- PRADO, C. P. A.; Uetanabaro, M. & Haddad, C. F. B. 2005. **Breeding activity patterns, reproductive modes, and habitat use by anurans (Amphibia) in a seasonal environment in the Pantanal, Brazil.** *AmpHibia-Reptilia* 26(2):211-221.
- PRATA, F. 2002. **Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina.** Tese (Doutorado em Agronomia) – Piracicaba-SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, 161p.
- RACKE, K.D., Steele, K.P., Yoder, R.N., Dick, W.A., Avidov, E. 1996. **Factors affecting the hydrolytic degradation of chlorpyrifos in soil.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 1582-1592.
- RAO, K.S.P.; RAO, K.V.R. Impact of methyl parathion and parathion toxicity and eserine inhibition on acetylcholinesterase activity in tissue of teleost *Tilapia mossambica* – a correlative study. **Toxicol. Lett.** v.22, p. 351-6, 1984
- RELYEA, R. A. 2003. Predators come and predators go: the reversibility of predator-induced traits. **Ecology**, 84: 1840– 1848.
- RELYEA, R. A. 2005. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. **Ecological Applications** 15:2, 618-627 Online publication date: 1-Apr-2005.
- RELYEA, R. A.; Nancy M. Schoeppner & Jason T. Hoverman. PESTICIDES AND AMPHIBIANS: THE IMPORTANCE OF COMMUNITY CONTEXT. **Ecological Applications**, 15:4, 1125-1134 Online publication date: 1-Aug-2005.
- RELYEA, R. A. 2006. The effects of pesticides, pH, and predatory stress on amphibians under mesocosm conditions. **Ecotoxicology**, 15:503-511.
- RELYEA, R. A. 2008. **A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities.** {HYPERLINK “javascript:AL_get(this,%20’jour’,%20’Oecologia’.);”} “Oecologia.”} 2009 Mar; 159(2):363-76. Epub 2008 Nov 11.
- RELYEA, R. A.; Nicole Diecks. 2008. An unforeseen chain of events: lethal effects of pesticides on frogs at sublethal concentration. **Ecological Applications** 18:7, 1728-1742 Online publication date: 1-Oct-2008.
- RELYEA, R. A. 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. **Oecologia** 159:2, 363-376 Online publication date: 1-Mar-2009.
- RODRIGUES, E.D.L.; Ranzani-Paiva, M.J.; Pacheco, F.J.; Veiga, M.L. **Efeito agudo do organofosforado Dipterex 500 (Trichlorfon) em baço de curimatá Prochilodus scrofa (STEINDACHNER, 1881).** B. CEPTA, Pirassununga, n. 24, p. 197-203, 1997.
- ROHR, J.R., Raffel, T.R., Romansic, J., McCallum, H., Hudson, P.J. **Evaluating the links between climate, disease spread, and amphibian declines.** *PNAS*. 105: 17436-17441. 2008.

- ROWE, C. L., and W. Dunson. 1994. The value of simulated pond communities in mesocosms for studies of amphibian ecology and ecotoxicology. **Journal of Herpetology** 28:346–356.
- RUEGG, E.F. (Coord.). 1991. **Impacto dos agrotóxicos sobre o ambiente, saúde e a sociedade**. São Paulo: Ícone.
- SANTOS, N. D.; COSTA, J. M.; PUJOL-LUZ, J. R. 1988. Nota sobre ocorrência de odonatos em tanques de piscicultura e o problema de predação de alevinos pelas larvas. **Acta Limnol. Brasil**, v. 11, p. 771-780.
- SANTOS, C. L. 2011. **Contaminação de Pesticidas em áreas agrícolas na ilha de São Luis, MA e efeitos do Paration Metílico em girinos de *Physalaemus cuvieri* Fitz.1826 (Amphibia, Leiuperidae)**. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação) - Universidade Federal do Maranhão.
- SCHOFF, P.K.; C.M. Johnson; A.M. Schotthoefer, J.E. Murphy, C. Lieske, R.A. Cole, L.B. Johnson; V.R. Beasley. **Prevalence of skeletal and eye malformations in frogs from north-central United States**. J. Wildlife Dis., 39 (2003), pp. 510–521.
- SEMLITSCH, R. D. **Relationship of pond drying to the reproductive success of the salamander *Ambystoma talpoidrum***. Copeia, p. 61-69, 1987.
- SENHORINI, J.A., Fontes, N.A., Lucas, A.F.B., Santos, J.R.S., 1991. **Larvicultura do pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Pisces, Characidae) em viveiros com e sem organofosforado (folidol 600)**. Bol. Tec. CEPTA 4, 11–22.
- SILVA, H. C.; Medina, H. S. G; Fanta, E.; Bacila, M. 1993. **Sublethal effects of the organophosphate Folidol 600 (methyl paration) on *Callichthys callichthys* (Pisces:Teleostei)**. Comparative Biochemistry and Physiology C, London, v. 1005, n. 2, p. 197-201.
- SILVANO, D.L; Segalla, M.V. 2005. **Conservação de Anfíbios no Brasil**. Belo Horizonte: *Megadiversidade*. v. 1, n. 1, p. 79-86.
- SMITH, G.R.; Krishnamurthy, S.V.; Burger, A.C. {HYPERLINK “<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Term=%22Mills%20LB%225BAuthor%5D%7D>}.2010. **Differential Effects of Malathion and Nitrate Exposure on American Toad and Wood Frog Tadpoles**.
- SOARES, G.C. 2007. **Diversidade e ecomorfologia de girinos (Anura) em fragmentos de mata na Ilha do Maranhão**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Maranhão – UFMA. São Luis, MA.
- SPARLING, D.W.; Fellers, G. M.; McConnell, L. S. 2001. Pesticides and amphibian population declines in California, USA. **Environ Toxicol Chem**, 20:1591–1595.
- SRYGLEY, R. B. 2003. **Wind drift compensation in migrating dragonflies *Pantala* (Odonata: Libellulidae)**. J. Insect Behav., 16(2): 217-233.

- STUART, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L. & Waller, R.W. 2004. **Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide**. Science, 306, 783–786.
- TAMASSIA, S. T. J. **Carpa comum (*Cyprinus carpio*): produção de alevinos**. Florianópolis: EPAGRI, 1996. 75p. (EPAGRI, Boletim Técnico, 76).
- VERDADE, V. K.; Dixo, M.; Curcio, F.F. **Os riscos de extinção de sapos, rãs e pererecas em decorrência das alterações ambientais**. Estudos avançados, 24 (68). 2010.
- WILCOVE, D.S., Master L.L. How many endangered species are there in the United States? **Front Ecol Environ**, 3, 414–420. 2005.
- YOUNG, B. E. et al. Population declines and priorities for Amphibian conservation in Latin America. **Conservation Biology**, 15: 1213-1223. 2001.
- YOUNG, B.E. et al. Disappearing jewels: **The status of New World amphibians**. Nature Serve, Arlington, EUA. 2004.

APÊNDICE

INFLUÊNCIA DE UM PESTICIDA SOBRE GIRINOS NECTÔNICOS EM POÇAS ARTIFICIAIS

BRENA MÁRCIA DE FREITAS BORGES, GILVANDA SILVA NUNES, ALINE NOGUEIRA MAGALHÃES and GILDA VASCONCELLOS DE ANDRADE¹

¹Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia. Av. dos Portugueses, s/n - Campus do Bacanga, Depto Biologia Bacanga 65085-580 - São Luis, MA – Brasil

Abstract. The consequences of repeated applications of pesticides in relatively low concentrations to develop tadpoles can be very negative, but were still slightly evaluated. In this study we used the nektonic tadpoles *Dendropsophus minutus* Peters, 1872 in 32 artificial ponds (8 replicates per treatment) to evaluate the influence of a pesticides commonly used in agricultural fields in Maranhão, northeastern Brazil. Nymphs of dragonflies have colonized some tanks, but its presence did not differ significantly between tanks of different treatments had no effect as a covariate in the analyses. We tested the effect of different concentrations of Paration Metílico (zero for the control, 0,04µg L⁻¹; 0,1µg L⁻¹; 0,2µg L⁻¹), using the commercial formulation Mentox 600, with an overcoating with 10 days apart. Survival and size (snout-vent length and mass) of metamorphs did not differ significantly among treatments. But time to metamorphosis was longer on tanks with the higher concentration of the pesticide (ANCOVA: $F_{3,21} = 3,777$; $p = 0,026$) in relation to tanks with the intermediate concentration. This longer time to metamorphosis can be a risk to populations that inhabit temporary ponds. Deformed metamorphs occurred in tanks with pesticide, as the death of tadpoles on metamorphosis probably due to problems on limbs and drowning.

Key words: Amphibia; Paration Metílico; larvae; Hylidae.

INTRODUÇÃO

O uso de pesticidas para combater pragas, doenças e ervas daninhas, é uma prática muito comum em todas as regiões do Brasil, muito usada também para obter a homogeneização do ambiente (Carvalho *et al.* 2000; Griggs 2006), e vem se acentuando a cada ano, o que requer mais controle e a realização de estudos que possibilitem o monitoramento de possíveis contaminações do meio ambiente e da biota (Gaspar *et al.* 2005). Os pesticidas são aplicados em todo o mundo nas áreas agrícolas, onde diversas espécies de anfíbios anuros estão inseridas (Relyea 2006). E o uso desses produtos tem levado ao aparecimento de resíduos nos diferentes compartimentos ambientais, como na água, solo e ar (Carvalho *et al.* 2000; Caldas and Souza 2000; Ruegg 1991). Nas zonas agricultáveis do Maranhão ocorre o uso de forma inadequada dos pesticidas e a contaminação de corpos d'água utilizados por anfíbios (Santos 2011).

Os contaminantes químicos podem desempenhar efeitos drásticos sobre as comunidades ecológicas. Alguns efeitos sobre as comunidades aquáticas podem ser previstos a partir dos efeitos tóxicos diretos observados em uma única espécie em laboratório. No entanto, outros efeitos são mediados através de outras espécies na comunidade. Quando adicionamos pesticidas em comunidades aquáticas, o impacto pode depender tanto do tipo de pesticida aplicado como da constituição da comunidade. Assim, apesar de os pesticidas serem encontrados nos habitats naturais dos anfíbios (McConnell *et al.* 1998; Lenoir *et al.* 1999; Sparling *et al.* 2001; Santos, 2011), o papel que os pesticidas podem desempenhar sobre o declínio populacional de anfíbios é claramente uma mistura complexa de efeitos diretos e indiretos (Relyea *et al.* 2005; Griggs 2006).

Os efeitos indiretos causados pelos contaminantes podem ter implicações profundas em ambientes com fortes cadeias tróficas pelágicas, como o de água doce (John *et al.* 2003),

onde as larvas de anfíbios se desenvolvem. Apesar dos relatos de efeitos dos pesticidas em anfíbios anuros, as consequências do uso de alguns contaminantes ainda não são bem conhecidas e são poucos os estudos em comparação com outros grupos taxonômicos (Boone *et al.* 2005).

Alguns trabalhos realizados em região temperada relatam efeitos de contaminantes em girinos de anfíbios (Smith *et al.* 2010; Relyea 2009, 2008, 2006; Relyea *et al.* 2005). Usando mesocosmos, Relyea (2009) examinou a ação de vários contaminantes sobre comunidades aquáticas compostas de zooplâncton, fitoplâncton, perifíton e larvas de anfíbios das famílias Hylidae e Ranidae e constatou que as comunidades de zonas úmidas podem ser drasticamente afetadas por baixas concentrações de pesticidas. Relyea *et al.* (2005) também em experimentos em mesocosmos, constataram que altas concentrações de alguns pesticidas podem ser letais aos girinos das famílias Ranidae, Hylidae e Bufonidae e que concentrações subletais podem ter efeitos positivos, já que acabam eliminando predadores. Já Relyea (2006) mostrou que os pesticidas podem ser mais letais em laboratório do que quando incluímos condições abióticas mais naturais, como variação de pH, temperatura e radiação ultravioleta. Mas demonstrou que a manipulação do pH não afetou a sobrevivência dos girinos do gênero *Rana*, e sim, seu crescimento. A letalidade também foi verificada no tratamento com o contaminante em concentração mais elevada. Usando mesocosmos, Relyea (2008) examinou como as concentrações baixas de um pesticida aplicado em várias quantidades, horários e frequências afetam comunidades aquáticas contendo vários níveis da cadeia alimentar. Houve decomposição rápida e redução do zooplâncton, o que deu início a uma cascata trófica não matando diretamente as larvas de anfíbios do gênero *Rana*, mas indiretamente resultando em uma maior mortalidade. No experimento desenvolvido por Smith *et al.* (2010), também em mesocosmos, foram

examinados os efeitos individuais e interativos de concentrações de pesticidas em girinos de duas espécies de regiões agrícolas dos Estados Unidos.

O presente estudo acrescenta informações para o entendimento dos efeitos diretos de um pesticida sobre girinos nectônicos de uma espécie que ocorre em região tropical. Testamos a hipótese de que o pesticida Paration Metílico na sua formulação comercial afeta o desenvolvimento larvário de *Dendropsophus minutus* Peters, 1872, diminuindo a sobrevivência e aumentando o tempo até a metamorfose, diminuindo o tamanho dos metamorfos e causando deformações. Esta espécie é habitante das florestas tropicais úmidas (incluindo clareiras), borda da floresta e pântanos, e embora seja muito comum nas terras baixas, onde se reúnem em grande número em poças temporárias na mata, também é comum em torno de valas na estrada e poças nas florestas (Duellman 1997). Essa espécie também coloniza a água parada deixada pelo homem causada por atividades agrícolas e construções de estradas (Gorzula and Señaris 1998). Esta espécie pode ser considerada muito versátil, de acordo com a sua vasta gama de latitude, bem como em altitude (Ceil 1980). É uma espécie arborícola, mas durante o tempo de reprodução é comumente encontrada em campos abertos perto de águas rasas. A postura ocorre nos corpos d'água lênticos em pequenos lagos ou poças grandes (Pombal and Haddad 2005). As fêmeas depositam cerca de 400 ovos em uma massa globular que se adere às plantas emergentes em lagoas. As larvas eclodem e caem na água, onde completam o desenvolvimento até a metamorfose. Os girinos ocorrem dispersos por toda a coluna de água se alimentando principalmente de algas (Kwet 1999). A larva é caracterizada como nectônica e neustônica, possuidora de um corpo maior e mais estreito, além de possuir nadadeira ventral mais alta e focinho mais comprido, quando comparada às de espécies bentônicas e fossoriais, o que pode estar relacionado ao hábito macrofágico típico do gênero (Pezzuti 2011). Em um estudo realizado em um tanque de piscicultura no sudeste do Brasil, os girinos desta espécie apresentaram itens alimentares

predominantemente planctônicos, sugerindo um comportamento alimentar mais sugador (Fonseca 1996).

MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em mesocosmos, 32 tanques artificiais de 2,50 m² de área de superfície, situados ao ar livre no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Maranhão, onde foram reproduzidas condições similares aos corpos d'água naturais. Os tanques foram cobertos com tela de nylon de 1mm² para evitar a colonização por possíveis predadores, ou competidores, e foram preparados no dia 22 de março de 2011, 15 dias antes do início do experimento, para permitir a estabilização da comunidade de algas, que serviram de alimento aos girinos. Os tanques foram inicialmente enchidos até 0,33 m de profundidade com água encanada, sendo a profundidade mantida sempre constante com a renovação da água feita pela água da chuva, já que esse período representou o auge da estação chuvosa em São Luís (331,8 mm em março de 2011, segundo o Instituto Nacional de Meteorologia-INMET) e por meio de um dreno protegido por uma tela, que impediu a saída dos girinos depois da sua introdução.

Diariamente no decorrer de todo o experimento os 32 tanques artificiais foram observados. Em algumas dessas verificações foram detectados ostracodas, artrópodes crustáceos diminutos, que se proliferavam em um dos sistemas. Distribuímos esses organismos por todos os tanques, para que estes se mantivessem semelhantes, já que a presença desses organismos é comum em ambiente natural.

Ninfas de libélulas (Odonata, Libellulidae) da espécie *Pantala flavescens* (Fabricius, 1798) foram detectadas no interior de vários tanques, apesar das telas. São predadores generalistas, alimentando-se do que conseguem capturar, como as larvas de moscas e mosquitos, pequenos anelídeos e crustáceos, girinos e alevinos, utilizando, sobretudo a

emboscada como técnica de caça, escondendo-se na vegetação ou nos sedimentos (De Marco Jr. and Latini 1998). Diariamente cada tanque foi revistado e cada ninfa encontrada foi retirada, sendo anotada a informação sobre o tanque em que ela se encontrava. Em cada tanque, no início do experimento, foram adicionados 100 girinos bentônicos de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae), cujo desenvolvimento seria avaliado também sob o efeito do contaminante, mas que foram predadas pelas libélulas e morreram por outras causas não detectadas, não sendo possível a comparação. O número de ninfas de libélulas em cada tanque foi utilizado como covariável nas análises, uma vez que a presença do predador poderia ter afetado os resultados direta ou indiretamente.

O Paration Metílico foi o pesticida cujos efeitos foram investigados neste estudo devido ao seu uso pela população em diversos campos agrícolas e pela sua detecção em corpos d'água utilizados por anfíbios em São Luís, MA (Santos 2011). A classe dos pesticidas organofosforados (OPs) está entre as mais extensivamente utilizadas na agricultura. Os pesticidas organofosforados são derivados do ácido fosfórico, do ácido tiofosfórico ou do ácido ditiofosfórico (Brasil 1998). O princípio ativo do Paration Metílico possui curta persistência no ambiente, possuindo vida média de 6-16 dias (Monteiro *et al.* 2006; Baird 2002). Mas segundo Ferracini *et al.* (2001), os dados de meia-vida em água são pouco citados na literatura, pois dependem das características do ambiente. Algumas propriedades físico-químicas do organofosforado Paration Metílico são relevantes como: peso - 263,20; Kow (coeficiente de partição octanol-água) - 3; pressão de vapor - 2×10^{-3} ; temperatura de fusão - 36; densidade - 1,269; solubilidade - 55 mg.L⁻¹.

Para o experimento foi utilizado o produto comercializado Mentox 600 (Prentiss Química LTDA) preparando-se três concentrações do pesticida Paration Metílico para os três diferentes tratamentos, além do tratamento sem influência de contaminante (controle), todos com 8 replicações. As concentrações foram baseadas nos seguintes critérios: C1 - 0,04

$\mu\text{g L}^{-1}$, é o limite máximo admitido nos ecossistemas aquáticos de acordo com a Resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) Nº 357, de 17 de março de 2005; C2 - $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$, é um parâmetro tolerado, usado internacionalmente e C3 - $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$, foi encontrada em análise de água coletada em corpo de água utilizado por girinos em São Luís (Santos 2011).

Em 29 de março de 2011 coletamos seis casais em amplexo de *D. minutus* em alagados e poças temporárias formadas por água de chuva no sudoeste da ilha do Maranhão ($02^{\circ} 31' 47'' \text{ S}$; $44^{\circ} 18' 10'' \text{ W}$), município de São Luís. Todos os casais desovaram em laboratório e foram devolvidos à área de coleta. As desovas foram mantidas separadamente em aquários e posteriormente as larvas em início do estágio 25 (Gosner, 1960) e de tamanho similar foram colocadas nos mesocosmos em densidades similares à encontrada no ambiente natural por Soares (2007). Assim, introduzimos 30 girinos em cada um dos 32 tanques, sendo cinco de cada desova, para que ocorresse uma maior variabilidade genética, totalizando 960 larvas. As larvas passaram 5 dias aclimatando nos tanques antes da primeira adição do contaminante. Foi feita a reaplicação do contaminante 10 dias após a primeira adição.

Os parâmetros físico-químicos como pH, temperatura, condutividade, TDS (Total Dissolved Solids- material em dispersão que dificulta a proliferação das algas) e o oxigênio dissolvido foram medidos em todos os tanques. Esses parâmetros oscilaram de maneira similar ao longo de todo o experimento. A média diária das temperaturas mínimas foi de $27,5^{\circ}\text{C}$, enquanto que a das temperaturas máximas foi de 29°C . O pH foi de 7,3; a condutividade $117,91 \text{ S/m}$; TDS foi de $60,99 \text{ mg/L}$; e oxigênio dissolvido foi de 88,16%.

O material de descarte, ou seja, a água dos mesocosmos ao final do experimento, com resíduos do contaminante, foi degradada segundo técnicas utilizadas pelo Núcleo de Análises de Resíduos de Pesticidas (NARP) da Universidade Federal do Maranhão.

Como variáveis resposta para avaliar o efeito do contaminante sobre os girinos utilizamos: número de indivíduos que sobreviveram até a metamorfose (metamorfos); tempo até a metamorfose – número de dias desde a desova até a metamorfose; tamanho na metamorfose – comprimento total, do focinho até a cloaca (CRC), medido com um paquímetro (precisão de 0,1 mm) e massa, medido com balança de precisão de 0,001g; taxa de crescimento – incremento no comprimento do corpo em relação ao comprimento inicial, dividido pelo tempo até a metamorfose; proporção de indivíduos com deformações físicas. Estimamos o tamanho inicial dos girinos introduzidos nos tanques através da pesagem e obtenção do CRC de uma amostra de 100 larvas de mesmo tamanho e origem das introduzidas nos tanques.

As variáveis resposta foram analisadas por análise de covariância através do programa SYSTAT 12 (2007) Cranes Software International Ltd, Bangalore, India. Avaliamos a distribuição normal dos dados através do teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias através do teste de Levene, o que indicou necessário transformar os dados (em logaritmo) de indivíduos (ninfas de libélulas e metamorfos) e de tempo para atingir a metamorfose. Não houve significância na interação entre o tratamento (pesticida) e a covariável (ninfas de libélulas), indicando homogeneidade das inclinações.

RESULTADOS

A ocorrência de ninfas de libélulas, apesar de maior em dois tanques com a maior concentração de pesticida (C3- $\bar{x} = 10,7$; SD = 11,4; N= 32), não diferiu significativamente

entre os tanques dos diferentes tratamentos (ANOVA: $F_{3,28} = 1,3$; $p = 0,294$) (C2- $\bar{x} = 2,3$; SD = 2,0; N= 37; C1- $\bar{x} = 4,6$ e SD=5,7; N= 19; C0- $\bar{x} = 4$; SD =3,6; N= 86).

Ao final do experimento foram obtidos 278 indivíduos de *D. minutus* com metamorfose completa, sendo 90 dos tanques controle (ausência de contaminante), 76 de C1 ($0,04\mu\text{gL}^{-1}$), 40 de C2 ($0,1\mu\text{gL}^{-1}$) e 72 de C3 ($0,2\mu\text{gL}^{-1}$) (Tabela 1). O efeito do tratamento (pesticida) ajustado pela covariável (quantidade de ninfa de libélula) não foi significativo para o número de girinos sobreviventes que metamorfosearam (ANCOVA: $F_{3,27}=1,255$; $p=0,310$).

A média da massa encontrada para os girinos da espécie no início do experimento foi de 0,003g (N= 100; SD=0,349) e a do CRC foi de 6,32mm (N= 100; SD=2,1). O tamanho dos metamorfos também não diferiu significativamente entre os tratamentos (ANCOVA: CRC: $F_{3,23}=1,560$; $p=0,226$; massa: $F_{3,23}=0,623$; $p=0,607$).

O experimento nos sistemas artificiais teve duração de 86 dias. No trigésimo dia de experimento o primeiro indivíduo metamorfoseou. A maioria dos girinos metamorfoseou com 50 dias (137 metamorfos), sendo C1 o tratamento que apresentou mais indivíduos metamorfoseados nesse intervalo de tempo (Fig. 1). No entanto, entre 30 e 40 dias de desenvolvimento, houve mais metamorfoses nos tratamentos controle. Com 70 dias, houve um pico tardio de metamorfose para o tratamento com maior concentração de pesticida.

O efeito do pesticida ajustado pela quantidade de ninfa de libélula foi significativo para o tempo até a metamorfose (ANCOVA: $F_{3,21}= 3,777$; $p=0,026$), com os girinos de C3 demorando mais tempo para metamorfosear do que os girinos de C2 (Fig. 2, Tukey C2 x C3: $p=0,027$). A taxa de crescimento não diferiu entre os tratamentos (ANCOVA: $F_{3,21}=1,856$; $p= 0,168$).

Houve a ocorrência de sete metamorfos (2,52%) apresentando deformações nos membros, sendo 3 provenientes de tanques C1 e 4 de C3. Além disso, 30 indivíduos foram encontrados mortos na fase final de metamorfose (9,74% dos girinos que chegaram nessa fase final), sendo 4 em tanques controle (1,30%), 6 em C1 (1,95%), 9 em C2 (2,92%) e 11 em C3 (3,57%). Aparentemente houve dificuldade de locomoção ou aderência, impedindo a escalada desses animais nas paredes dos tanques, o que levou à morte por afogamento.

DISCUSSÃO

A recomendação mais utilizada para o controle de ninfas de odonata em viveiros de piscicultura é o uso de 0,5 mg L⁻¹ de Paration Metílico, que mata as ninfas mas não seleciona o zooplâncton (Garadi *et al.* 1988; Tamassia 1996). As concentrações utilizadas no presente estudo foram bem menores do que a recomendada, o que explica a não eliminação das ninfas dos nossos sistemas artificiais.

As ninfas das libélulas que colonizaram os tanques são de uma espécie exofítica, territorialista e migratória, que ocorre em toda região pantropical (Srygley 2003). Devido ao comportamento migratório, a ocorrência desta espécie em áreas não alagadas é comum (Carvalho and Calil 2000; Costa *et al.* 2002). Existe a suspeita de que essas ninfas tenham colonizado os tanques a partir de ovos depositados na própria tela que os recobre (De Marco Jr., com. pess.). Apesar de essas ninfas serem consideradas um dos principais predadores do ambiente aquático, como elas ficam associadas às plantas aquáticas ou ao fundo dos corpos d'água (De Marco Jr. and Latini 1998), possivelmente elas não predaram os girinos de *D. minutus*, porque eles permaneciam na coluna de água. No entanto, é provável que elas tenham sido responsáveis por parte da mortalidade das larvas bentônicas de *P. cuvieri* introduzidas no início do experimento.

Boone *et al.* (2001) demonstraram através de experimentos que a exposição contínua a um pesticida pode manter a comunidade em constante estado de perturbação, impedindo assim a resiliência, que é a capacidade concreta de retornar ao estado natural, superando uma situação crítica. Observaram ainda que concentrações menores apresentaram maiores impactos sobre a comunidade. O nosso experimento foi desenhado para uma exposição a concentrações relativamente baixas, repetidas uma única vez, apenas no primeiro terço do desenvolvimento, simulando a reaplicação de pesticidas que ocorre nos campos agrícolas e aproximando as condições experimentais à realidade. Mesmo sem provocar uma exposição continuada ao pesticida, uma vez que ele se degrada no ambiente, nos mesocosmos com girinos se desenvolvendo na ausência do contaminante, parte dos indivíduos metamorfoseou mais cedo e com o mesmo tamanho que nos tanques com pesticidas. Relyea (2003) relata que o crescimento rápido dos girinos, alcançando rapidamente um tamanho que os torna menos vulneráveis, acaba limitando a ação de predadores. Girinos maiores são relativamente mais ativos que girinos menores, pois não estão em risco quando expostos a pequenos predadores. Por outro lado, o atraso no desenvolvimento pode acarretar em maiores riscos de predação, morte por secagem do corpo d'água ou problemas de disponibilidade de alimento (Semlitsch 1987). Como o experimento foi desenvolvido no auge da estação chuvosa, os tanques mantiveram o nível de água constante, e não houve o risco de dessecação. Portanto, não houve pressão para que os girinos metamorfoseassem mais rápido e o efeito do pesticida na maior concentração foi detectado apenas no atraso no desenvolvimento. Os girinos puderam continuar crescendo até um tamanho similar aos dos outros tratamentos, antes de metamorfosear.

Vários autores como Ouellet *et al.* (1997) relatam que deformidades de membros e anomalias ocasionalmente ocorrem em comunidades naturais de anfíbios. Segundo Blaustein & Jonhson (2003) usualmente essa proporção não ultrapassa 5% em populações naturais

saudáveis e em geral envolvem apenas dedos faltando ou partes de um membro. As anormalidades mais frequentes descritas na literatura incluem deformidades nos olhos, incompleta absorção da cauda, membros extras e membros amputados (Ouellet *et al.* 1997; Meteyer *et al.* 2000; Johnson *et al.* 2002; Lannoo *et al.* 2003; Schoff *et al.* 2003). Considerando-se apenas os metamorfos com deformações, não poderíamos atribuir essa baixa porcentagem ao efeito do pesticida. Porém, somando-se os que aparentemente morreram no final da metamorfose por problemas de formação nos membros, devemos considerar, embora com cautela, o efeito do pesticida.

Ouellet *et al.* (1997) observaram alta prevalência de deformidades em membros posteriores em sapos e rãs de zonas agrícolas expostos a pesticidas. Verificaram várias anormalidades evidentes que possivelmente interferiram na natação e salto e provavelmente constituem desvantagem na sobrevivência. Apesar do fato de que muitos agentes abióticos e bióticos são potencialmente prejudiciais ao desenvolvimento dos membros, os contaminantes agrícolas são considerados agressores primários. Assim, a presença de uma deformidade em membros de anuros pode ser uma das ferramentas para se avaliar a saúde do ecossistema e a presença de contaminantes ambientais. Britson & Threlkeld (1998) também exibiram em experimento o aumento da ocorrência de deformações, predominantemente do membro posterior, em várias espécies de anfíbios anuros de diferentes regiões da América do Norte. E as investigações sobre as possíveis causas também revelam os contaminantes químicos como um dos principais estressores.

Concluindo, neste estudo verificamos em poças artificiais que girinos nectônicos podem ter o desenvolvimento larvário prolongado devido ao contato com o pesticida Paration Metílico no terço inicial do seu desenvolvimento, o que é um risco para espécies que utilizam ambientes temporários. Houve indícios também da associação do pesticida com deformações, causando mortalidade na metamorfose.

CONCLUSÃO

As concentrações utilizadas no presente estudo foram bem menores do que a recomendada para eliminação de libélulas em tanques de piscicultura, o que explica a não eliminação das ninfas dos nossos sistemas artificiais.

As ninfas de libélulas possivelmente não predaram os girinos de *D. minutus*, já que estes permaneciam na coluna de água e as ninfas estão mais associadas ao fundo dos corpos d'água.

É provável que as ninfas tenham sido responsáveis por parte da mortalidade das larvas bentônicas de *P. cuvieri* introduzidas no início do experimento, já que permaneciam no mesmo microhabitat nos mesocosmos.

A presença de uma deformidade em membros de anuros pode ser uma das ferramentas para se avaliar a saúde do ecossistema e a presença de contaminantes ambientais.

Os girinos nectônicos podem ter o desenvolvimento larvário prolongado devido ao contato com o pesticida Paration Metílico no terço inicial do seu desenvolvimento.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação para o Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos recursos disponibilizados ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão; À FINEP/ INFRAPESQ2 (CV 01.03.0337.00, pelo auxílio financeiro para a construção dos tanques; Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro (CNPQ/CASADINHO 620163/2008 9; CNPq/SISBIOTA 563075/2010-4) e pelas bolsas concedidas a BMB e GVA; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP/SISBIOTA 10/52321-7), pelo apoio financeiro; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA) pela bolsa de auxílio técnico e pelo auxílio para publicação deste artigo; ao Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) por nos fornecer a licença para coleta e ao Comitê de Ética para o Uso de Animal da Universidade Federal do Maranhão (CEUA/UFMA) pela aprovação do projeto.

LITERATURA CITADA

- Baird, Colin. 2002. Química Ambiental. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 622.
- Blaustein, A.R. and P.T.J. Johnson. 2003. The complexity of deformed amphibians. *Frontiers in Ecology and the Environment* **1**:87-94.
- Boone, M. D.; C. M. Bridges and B. B. Rothemel 2001. Growth and development of larval green frogs (*Rana clamitans*) exposed to multiple doses of an insecticide. *Oecologia* **129**:518–524.
- Boone, M. D.; Cowman, D.; Davidson, C.; Hayes, T.; Hopkins, W.; Relyea, R.; Schiesari, L.; Semlitsch, R. 2005. Evaluating the Role of Environmental Contamination in Amphibian Population Declines. In: C. Gascon; J. P. Collins; R. D. Moore; D. R. Church; J. E. McKay e R. Mendensol III (eds.), *Amphibian Conservation Action Plan*. The World Conservation Union (IUCN), 32-35.
- Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde - Centro Nacional de Epidemiologia. Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica. Brasília, 1998. 523p.
- Britson, C. A. and Threlkeld, S. T. 1998. Abundance, Metamorphosis, Developmental, and Behavioral Abnormalities in *Hyla chrysoscelis* Tadpoles Following Exposure to Three Agrichemicals and Methyl Mercury in Outdoor Mesocosms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **61**(2):154-161.
- Caldas, E. D. and Souza, L. C. K. R. 2000. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. *Rev. Saúde Pública*, **34**:529–537.
- Carvalho, A. L. and Calil, E. R. 2000. Chaves de identificação para as famílias de Odonata (Insecta) ocorrentes no Brasil, adultos e larvas. *Pap. Avulsos Zool.*, **41**(15): 223-241.

- Carvalho, A. R.; Schlittler, F. H. M. and Tornisiello, V. L. 2000. Relações da atividade agropecuária com parâmetros físico-químicos da água. Química Nova, São Paulo, n. 5, **23**:618-622.
- Cei, J. M. 1980. "Amphibians of Argentina." *Monitore Zoologica Italiano, New Series* Monografia, Firenze, **2**:1-609.
- Costa, J. M.; Lourenço, A. N. and Vieira, L. P. 2002. Chave de identificação para imagos dos gêneros de Libellulidae citados para o Brasil – Comentários sobre os gêneros (Odonata: Anisoptera). *Entomol. Vect.*, **9**(4): 477-504.
- De Marco, J. R. P. and Latini, A. O. 1998. Estrutura de guildas e riqueza de espécies em uma comunidade de larvas de Anisoptera (Odonata), In: J.L. Neiss Imian; Carvalho, A.L. (Eds.). *Ecologia de Insetos Aquáticos*. Rio de Janeiro: Séries Oecologia Brasiliensis, PPGE-UFRJ, P. 101-112.
- Duellman, W. E. 1997. Amphibians of La Escalera Region, southeastern Venezuela: Taxonomy, Ecology, and Biogeography. *Scient. Papers*. **2**:1-52.
- Ferracini, A. V. L.; Pessoa, M.C.Y.; Silva, A.S. and Spadotto, C.A. 2001. Análise de Risco de contaminação das águas subterrâneas e superficiais da região de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA). *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, Curitiba, **11**:1-6, jan/dez.
- Fonseca, M.G. 1996. Distribuição espacial e partilha de recursos alimentares durante a fase larvária entre *Scinax fuscovaria* A. Lutz, 1925 e *Hyla minuta* Peters, 1872 em um corpo d'água da região de Botucatu, São Paulo (Amphibia, Anura, Hylidae). Dissertação de Mestrado em Zoologia, UNESP-Botucatu.

Garadi, P.; Domarco, R.C.; Araujo, O.J. and Pinheiro, C.W.L. 1988. Avaliação do uso de inseticidas (orgânicos fosforados) no combate às odonatas e na seleção zooplancônica em piscicultura de alevinagem. In: CODEVASF – Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco. Estudos de piscicultura. 2ª ed., Brasília: 71p.

Gaspar, S. M. F. S.; Nunes, G. S.; Pinheiro, C.U.B. and Amarante Junior, O.P. 2005. Avaliação de risco de pesticidas aplicadas no município de Arari, Maranhão, Brasil: base para programa de controle ambiental do Rio Mearim. Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, Curitiba, **15**: 43-54.

Gorzula, S. and Senãris, J.C. 1998. Contribution the herpetofauna of the Venezuelan Guavana. A data base Science Guaianae, 1-270.

Gosner, K. L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica, **16**:183–190.

Griggs, J. L. 2006. Effects of Atrazine and Metolachlor on Snails, Tadpoles, and Their Trematode Parasites. Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Biological Sciences.

John, W. F.; Kevin, R. C. and Roger, M. N. 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. The Science of The Total Environment, **317**:207-233.

Johnson P. T. J; K B Lunde; E M Thurman; E G Ritchie; S N Wray; D R Sutherland, et al. 2002. Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the western United States. Ecological Monographs, **72**:151-168.

Kwet, A. and Di-Bernardo. 1999. Pró-Mata. Anfíbios - Amphibien - Amphibians. Porto Alegre: EDIPUCRS. 107 p.

- Lannoo, J. J.D.R. Sutherland, P. Jones, D. Rosenberry, R.W. Klaver, D.M. Hoppe, P.T.J. Johnson, K.B. Lunde, C. Facemire and J.M. Kapfer, Multiple causes for the malformed frog phenomenon, G. Linder, S. Krest, D. Sparling, E. Little, Editors , Multiple Stressor Effects in Relation to Declining Amphibian Populations, *ASTM STP 1443*, ASTM International, West Conshohocken, PA (2003), 233–262.
- Lenoir, J. S; McConnell, L. L; Fellers, G. M; Cahill, T. M; Seiber, J. N. 1999. Summertime transport of current-use pesticides from California's central valley to the Sierra Nevada Mountain range, USA. *Environ Toxicol Chem*, **18**:2715–2722.
- McConnell, L.L; LeNoir J.S, Datta S, Seiber J.N. 1998. Wet deposition of current-use pesticides in the Sierra Nevada Mountain range, California, USA. *Environ Toxicol Chem* **17**:1908–1916.
- Meteyer, C.U. et al. Eaton-Poole and J.G. 2000. Burkhart, Hind limb malformations in free-living northern leopard frogs (*Rana pipiens*) from Maine, Minnesota, and Vermont suggest multiple etiologies. *Teratology*, **62**:151–171.
- Monteiro, Diana Amaral, Jeane Alves de Almeida, Francisco Tadeu Rantin, Ana Lúcia Kalinin. 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **143**:141–149.
- Ouellet, M; J. Bonin, J. Rodrigue, J.-L. DesGranges; S. Lair. Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. 1997. *J. Wildlife Dis.* **33**: 95–104.

Pezzuti, T. L. 2011. Girinos do Quadrilátero Ferrífero, Sudeste do Brasil: Ecomorfologia e Chave de Identificação Interativa. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais.

Pombal J.R, J.P; Haddad, C.F.B. 2005. Estratégias e modos reprodutivos de anuros (Amphibia) em uma poça permanente na Serra de Paranapiacaba, Sudeste do Brasil. Pap. Avulsos Zool. (São Paulo) **45**:15, São Paulo.

Relyea, R. A. 2003. Predators come and predators go: the reversibility of predator-induced traits. *Ecology*, **84**: 1840– 1848.

Relyea, R. A.; Nancy M. Schoeppner and Jason T. Hoverman. Pesticides and Amphibians: the importance of community context. *Ecological Applications*, **15**:4, 1125-1134
Online publication date: 1-Aug-2005.

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

Relyea, R. A. 2008. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. {HYPERLINK
“javascript:AL_get(this,%20'jour',%20'Oecologia'.);”\0”Oecologia.”} 2009 Mar;
159(2):363-76. Epub 2008 Nov 11.

Relyea, R. A. 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* **159**:2, 363-376 Online publication date: 1-Mar-2009.

Ruegg, E.F. (Coord.). 1991. Impacto dos agrotóxicos sobre o ambiente, saúde e a sociedade. São Paulo: Ícone.

Santos, C. L. 2011. Contaminação de Pesticidas em áreas agrícolas na ilha de São Luis, MA e efeitos do Paration Metílico em girinos de *Physalaemus cuvieri* Fitz.1826 (Amphibia, Leiuperidae). Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação) - Universidade Federal do Maranhão.

Schoff, P.K.; C.M. Johnson; A.M. Schotthoefer, J.E. Murphy, C. Lieske, R.A. Cole, L.B. Johnson; V.R. Beasley. 2003. Prevalence of skeletal and eye malformations in frogs from north-central United States. *J. Wildlife Dis.*, **39**:510–521.

Semlitsch, R. D. Relationship of pond drying to the reproductive success of the salamander *Ambystoma talpoidrum*. 1987. *Copeia*, **1**:61-69.

Smith, G.R.; Krishnamurthy, S.V.; Burger, A.C. {HYPERLINK “<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Term=%22Mills%20LB%225BAuthor%5D>”.2010. Differential Effects of Malathion and Nitrate Exposure on American Toad and Wood Frog Tadpoles.

Soares, G.C. 2007. Diversidade e ecomorfologia de girinos (Anura) em fragmentos de mata na Ilha do Maranhão. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Maranhão – UFMA. São Luis, MA.

Sparling, D.W.; Fellers, G. M.; McConnell, L. S. 2001. Pesticides and amphibian population declines in California, USA. *Environ Toxicol Chem*, **20**:1591–1595.

Srygley, R. B. 2003. Wind drift compensation in migrating dragonflies *Pantala* (Odonata: Libellulidae). *J. Insect Behav.* **16**(2): 217-233.

Tamassia, S. T. J. Carpa comum (*Cyprinus carpio*): produção de alevinos. Florianópolis: EPAGRI, 1996. (EPAGRI, Boletim Técnico, 76).75p.

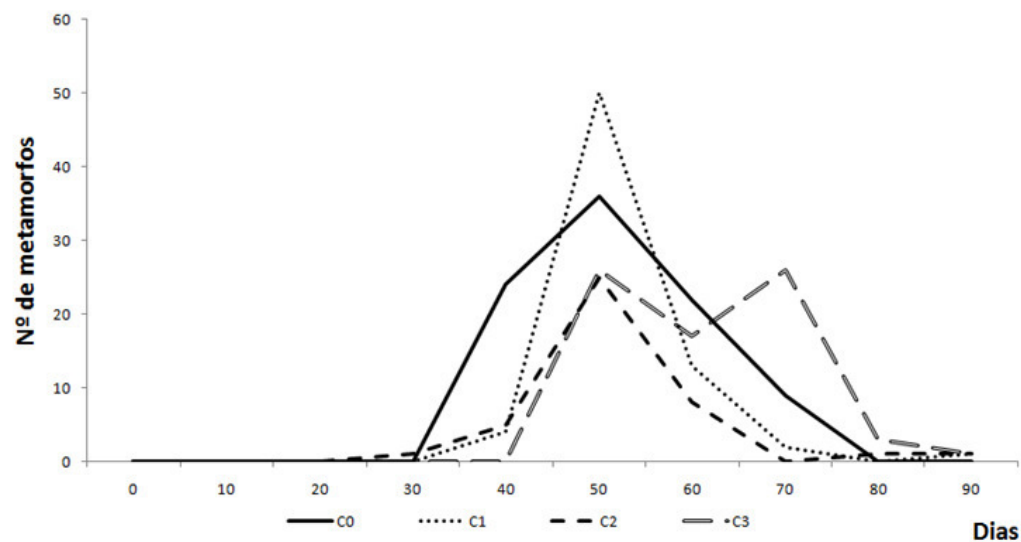


FIG. 1. Número de metamorfos de *Dendropsophus minutus* nos tratamentos com Paration Metílico, sendo C0- controle; C1- $0,04\mu\text{g L}^{-1}$; C2- $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$; C3- $0,2\mu\text{g L}^{-1}$ em poças artificiais ao longo do tempo em dia.

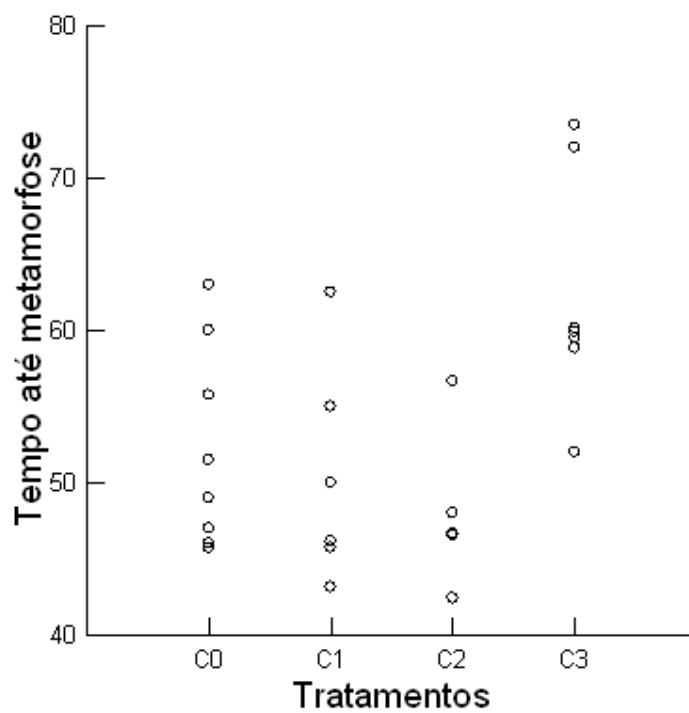


FIG. 2. Tempo (em dias) que os indivíduos de *D.minutus* levaram até a metamorfose completa nos tratamentos com o pesticida, sendo C0- controle; C1- 0,04µg L⁻¹; C2- 0,1 µg L⁻¹; C3- 0,2µg L⁻¹.

TABELA 1. Resposta de *Dendropsophus minutus* aos tratamentos com concentração de Paration Metilico (C0=ausente, C1=0,04µg L⁻¹, C2=0,1µg L⁻¹, C3= 0,2µg L⁻¹) em mesocosmos. Os dados de cada tratamento são as médias seguidas do desvio padrão.

Tratamentos	N	metamorfos	Tempo até metamorfose (d)	CRC na metamorfose (mm)	Massa (g)
C0	8	11.3 ±8.4	52.2 ±6.6	14.55 ± 1.5	0.29 ± 0.07
C1	8	9.5±9.3	48.56 ±24.0	13.89 ± 1.2	0.27 ± 0.09
C2	8	5±6.0	40.78±28.6	13.50 ± 1.03	0.25± 0.07
C3	8	9 ±8.1	54.48±23.1	13.14 ± 1.07	0.21± 0.05

NORMAS DA REVISTA

Instructions for Authors

Ecology, Ecological Applications, Ecological Monographs

Submission Instructions:

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

Formatting your manuscript

- Minimum formatting requirements
- Allowable file formats
- Importance of Concision and Use of Ecological Archives

The Mechanics

- EcoTrack
- Author profiles
- The submission process
- Checking the manuscript status
- Manuscript correspondence
- Getting help

Instructions for Authors of Accepted Manuscripts

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

Submission Instructions:

Specify journal and manuscript type

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

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

Requirements for submission

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

Resubmission policy. If the manuscript (or a previous version of the manuscript) has been previously submitted to the same or another ESA journal, provide the previous manuscript number; explain how the current version differs from the previously submitted version and why it should be considered now for this journal. There are no guarantees it will be reviewed by the newly targeted journal.

ESA Code of Ethics. Authors must adhere to the ESA Code of Ethics. [More info]

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

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

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

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

Formatting your manuscript: Minimum formatting requirements

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

* The entire manuscript must be double-spaced (text, quotations, figure legends, literature cited) at three lines per inch (12 lines/10 cm) with a 12-point font, Times New Roman.

Choose the "double-spacing" option for line spacing. Leave a 1 inch (2.54-cm) margin on all sides of each page. Page size should be Letter 8 ½" by 11". Do not justify the right margin.

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

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

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

Allowable file formats:

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

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

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

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

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

The Mechanics: Once your manuscript is ready:

Log-in to [EcoTrack](#) to submit your manuscript.

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

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

The submission process

You can save and exit at any time during the process, and come back later to where you left off. The manuscript submission process is broken into a series of 5 screens that

gather detailed information about your manuscript and allow you to upload the pertinent files. The sequence of screens are as follows:

1. A long form asking for author information, title, abstract, key words, journal, manuscript type, adherence to ESA policies, and file quantities. You can paste in the title and abstract from your manuscript. You may indicate your suggestions for Subject-matter Editor, who oversees your manuscript during the peer review process. In addition, authors are invited to suggest names of individuals who might be appropriate peer reviewers. Suggested editors and reviewers should not have any conflict-of-interest in evaluating the paper. (You can also name Editors and reviewers you would prefer to be excluded. It's advisable to include a justification in the note field and possibly your cover letter as well.)
- Searching the database for co-authors and suggested reviewers. We already have an extensive database of many potential authors. Before entering your contributing authors' information, try first to use "find person" to see if your contributing author is already in the system. Just type in the complete last name and click "find Person". If the right name comes up, click on it and close the name window. The person's information will copy into the form. Do the same thing for suggested reviewers.
- Only the person's name, institution, and city will be visible on the form. Other fields will be redacted to prevent unauthorized users from taking advantage of the database. Do not attempt to update or correct any of the information. Continue with your manuscript submission, but please notify the contributing author to come into the system to modify and update his or her profile; or notify the staff. Do not add a new record for someone in the database, even if the record is out-of-date.

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

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

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

An approval screen that will allow you to verify that your manuscript was uploaded and converted correctly. You need to view each pdf and approve it. You are able to replace, add, and delete files on this page. When you are satisfied that your submission is complete, click "confirm approved converted files." Do not approve your submission

if there are any issues about which you need to contact the staff. Instead contact esa_pubs@cornell.edu for assistance. Please do not send already uploaded files to staff or Editor-in-chief by e-mail.

- **Parsed citation file:** Please note that once you upload an article file, EcoTrack will convert the article to pdf and make a parsed citation file. You do not need to view or approve this file. It may be used by the editors and reviewers during the peer review process. If your paper is selected for publication, you may be asked to resolve any issues with citations that are formatted incorrectly.
- **What is in a parsed citation file:** Many correctly formatted citations will contain external links to those papers on Cross Ref and Pub Med. A link to search Google Scholar will also appear for each citation. Citations which are incorrectly formatted will appear in red.

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

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

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

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

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