

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA
BIODIVERSIDADE**

Respostas a curto e longo prazo: como herbicidas e estresse térmico afetam a sobrevivência, desenvolvimento e subsequente taxa de predação em girinos de *Boana faber* (Anura)

Orientador/e-mail: Mirco Solé/ mksol@uesc.br

Nome do Candidato/e-mail: Gabriela Alves Ferreira/ gabriela-alves77@hotmail.com

Nível: Mestrado

Linha de pesquisa do curso na qual o projeto se encaixa: Ecologia e Conservação de Populações.

Ilhéus, 04/12/2019

RESUMO. A degradação e modificação dos habitats têm afetado a persistência de muitas espécies. Os anfíbios são um dos grupos mais afetados por estas ameaças e possuem mais de 40% das espécies em algum grau de ameaça. Os girinos possuem maior susceptibilidade às alterações referentes à qualidade do habitat se comparados aos adultos, fato ligado à sua capacidade limitada de dispersão e busca por microhabitats favoráveis. Ambientes estressantes podem levar a aceleração da metamorfose em detrimento do menor tamanho corporal, podendo resultar na ocorrência de anormalidades morfológicas; muitos estudos associaram a ocorrência desses fenômenos à poluição dos habitats por agrotóxicos e ao estresse térmico. No entanto, pouco se sabe sobre como esses fatores em sinergia podem afetar a sobrevivência e aspectos morfológicos de girinos. Neste contexto, Avaliar a influência isolada e sinérgica do herbicida glifosato e do estresse térmico na mortalidade, assimetria flutuante, metamorfose e subsequente capacidade de fuga de predadores em girinos de *Boana faber*. Esperamos um aumento da mortalidade dos girinos com aumento da concentração de glifosato. Também esperamos que o aumento da temperatura da água, bem como a exposição ao glifosato, acelere a velocidade de metamorfose em detrimento do menor tamanho dos indivíduos. Além disso, esperamos que tais fatores em conjunto elevem índices de assimetria flutuante e o tempo de metamorfose em girinos de *B. faber*. Esperamos que girinos expostos ao aumento da temperatura e exposição à glifosato sejam mais assimétricos e portanto, sejam capturados mais rapidamente por predadores do que os indivíduos menos assimétricos. A compreensão de como alterações ambientais decorrentes de atividades humanas afetam a persistência dos girinos pode ser fundamental para o planejamento e as tomadas de decisões da conservação.

PALAVRAS-CHAVE: ecotoxicologia, ecomorfologia, girinos, assimetria flutuante.

INTRODUÇÃO

Diante de uma perspectiva histórica, muitos pesquisadores vêem na atual crise da biodiversidade um sexto evento de extinção em massa (Wake & Vredenburg 2008). A modificação e destruição dos habitats combinada às mudanças climáticas afetam diretamente a persistência das espécies, tornando-as mais susceptíveis à extinção (Fonseca et al. 2008; Wake & Vredenburg, 2008). Dentre os vertebrados, os anfíbios parecem ser um dos grupos mais afetados por essas ameaças (Blaustein et al. 2010); especialmente devido à alta sensibilidade associada às características fisiológicas, comportamentais e de história de vida do grupo (Huey et al. 2012).

As respostas dos anfíbios às mudanças ambientais podem ser mediadas por mecanismos complexos (Katzenberg et al. 2014). Prever estas respostas com mais precisão requer o entendimento de como o estresse provocado por uma mudança ambiental (como por exemplo, aumento da temperatura da água) pode interagir com o estresse induzido por outro tipo de estressor (como os agroquímicos; Portner & Farrel, 2008).

A poluição química tem sido apontada como um dos possíveis causadores dos declínios populacionais em anfíbios (Reylea, 2005). A toxicidade de alguns agroquímicos pode ser influenciada por condições abióticas, como temperatura e pH, e também pela presença de outros agrotóxicos (Rand, 1995). É conhecido que estes agroquímicos podem se tornar mais tóxicos à medida que a temperatura aumenta (Rand, 1995).

A exposição a estas ameaças pode provocar diversos tipos de respostas nos anfíbios (e.g. fenologia, fisiologia, morfologia e/ou comportamento; Weis et al. 2001; Root, 2003). Uma das possíveis respostas a estresses ambientais são os desvios no desenvolvimento ontogenético (Palmer & Strobeck, 1986); tais desvios podem refletir em componentes do fitness como crescimento, longevidade e sobrevivência (Moller, 1997), afetando direta ou indiretamente a capacidade de aquisição de recursos limitantes para o desenvolvimento e reprodução e diminuindo a habilidade de evitar predadores e parasitas (Moller, 1997).

A medição da assimetria flutuante consiste na caracterização de pequenos desvios aleatórios em caracteres bilaterais em organismos simétricos (Tomkins & Kotiaho, 2001). É um método relativamente simples e geralmente é utilizado para avaliar e quantificar a qualidade e o nível de estresse de indivíduos submetidos a algum tipo de estressor ambiental durante seu desenvolvimento (Tomkins & Kotiaho, 2001). As larvas de anfíbios anuros possuem alta plasticidade em seus atributos morfológicos, fisiológicos e comportamentais diante de alterações na qualidade do habitat e podem responder à ambientes novos ou alterados com fenótipos ambientalmente induzidos (Katzenberg et al. 2014), sendo então consideradas bons modelos para estudos que investigam como alterações antrópicas no ambiente podem afetar a biodiversidade (Altig & McDiarmid, 1999).

OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência isolada e sinérgica do estresse térmico e do herbicida glifosato na mortalidade, assimetria flutuante, metamorfose e subsequente capacidade de fuga de predadores em girinos de *Boana faber*.

Objetivos específicos

Objetivo 1: Avaliar as taxas de mortalidade em concentrações crescentes de glifosato;

- Hipótese: a exposição aguda ao glifosato afeta a sobrevivência de larvas de *B. faber*.
- Predição: esperamos um aumento da mortalidade à medida que aumenta a concentração de glifosato.

Objetivo 2: Avaliar os efeitos da exposição ao glifosato e ao aumento da temperatura da água, separadamente e sinérgicamente, sobre a metamorfose e assimetria flutuante;

- Hipótese: o aumento da temperatura e a exposição ao glifosato afetam a metamorfose e o desenvolvimento de larvas de *B. faber*.
- Predição: esperamos que girinos expostos ao efeito conjunto do aumento da temperatura e do glifosato levem menor tempo até a metamorfose quando comparados a girinos expostos ao efeito isolado de da temperatura e do glifosato. Como os girinos atingirão a metamorfose mais cedo, esperamos que os indivíduos possuam menor tamanho corporal e apresentem assimetria flutuante em seus caracteres bilaterais.

Objetivo 3: Avaliar se a exposição ao glifosato e ao aumento da temperatura durante o desenvolvimento do girino afetam a capacidade de fuga de predadores.

- Hipótese: a exposição ao glifosato e ao aumento da temperatura durante o desenvolvimento afetam a capacidade de fuga de predadores.
- Predição: esperamos que indivíduos expostos ao efeito conjunto do aumento da temperatura e do glifosato apresentem desvios maiores no desenvolvimento ontogenético e sejam mais assimétricos e por isso, após a metamorfose tenham mais dificuldade de fugir de predadores se comparados ao controle.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécies de estudo: Boana faber e Hydrophilus sp.

A espécie *Boana faber* é amplamente distribuída na América do Sul e pode ser encontrada tanto em ambientes florestais quanto em áreas antropizadas (Frost 2019). Possui modo reprodutivo generalizado com ovos aquáticos que são colocados em poças nas margens dos corpos d'água, onde os girinos permanecem até que se complete a metamorfose (Haddad & Prado, 2005). Tendo em vista o seu modo de vida e sua associação com ambientes semi-urbanos, há uma alta probabilidade de que esta espécie possa ser afetada pela contaminação por agrotóxicos e pelo aumento na temperatura da

água das poças. Os ovos não são um recurso limitante para o estudo devido ao comportamento reprodutivo desta espécie, que pode produzir até cerca de 700 ovos por ninhada (Lima et al. 2013).

Como predadores utilizaremos larvas de Hydrophilidae (*Hydrophilus sp.*). Muitas das espécies de larvas deste gênero atuam como predadoras de macroinvertebrados e de larvas de vertebrados como girinos e peixes (Wilson 1923; Hansen 1995; Merritt et al. 2008). São conhecidas por habitarem corpos d'água lânticos, assim como grande parte dos girinos (Wilson, 1923).

Método de coleta

Coletaremos 10 casais em amplexo da espécie *Boana faber* e 20 larvas de *Hydrophilus sp.* em corpos d'água lânticos situados na cabruca da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, Brasil. A coleta de casais de *Boana faber* acontecerá em um mesmo dia para reduzir efeitos associados ao tempo de desenvolvimento e a coleta das larvas de besouro acontecerá na mesma semana em que os casais foram coletados. Cada casal coletado será acondicionado em sacos plásticos individuais com água retirada da própria poça para deposição dos ovos, em seguida os adultos serão soltos no respectivo local onde foram capturados. Transportaremos as desovas de cada casal e as larvas de besouro para o Laboratório de Vertebrados e Herpetologia Tropical da UESC e acondicionaremos as larvas de besouro e os girinos em dois tanques de armazenamento (60cm x 40cm x 40cm) contendo oito litros de água descloretada. Após eclosão, os girinos estarão aleatorizados entre os casais, diminuindo o efeito parental. Alimentaremos os girinos com ração para peixes ornamentais (Alcon Basic) *ad libitum* a cada dois dias. As larvas de besouro serão alimentadas com outros girinos até a realização do experimento. Os girinos e as larvas de *Hydrophilus sp.* serão mantidas separadamente nos aquários de armazenamento com temperatura ambiente (25°C) até o início dos experimentos (para os girinos isso se dá quando atingirem o estágio 25 de desenvolvimento; Gosner, 1960).

Sistema de estudo

Realizaremos três experimentos em laboratório com condições controladas de temperatura do ar e fotoperíodo (25° C, 12h com luz/ 12h sem luz). As unidades experimentais serão aquários de vidro (60cm x 40cm x 40cm) com 1L de água descloretada, sem substrato e sem vegetação. O agrotóxico utilizado será o Glifosato (Roundup Original®) com 48% de ingrediente ativo. Antes que os experimentos sejam realizados, os girinos passarão por um período de 24 horas de aclimação nas unidades experimentais.

Nos experimentos que utilizam a temperatura da água como fator de estresse, utilizaremos o aumento da temperatura com base na média entre o CTmax (° C) da espécie e dados de temperatura coletados em poças naturais em um período de três meses. Para coleta destes dados utilizaremos dois data loggers que serão instalados em dois corpos d'água lânticos onde girinos de *Boana faber* já tenham sido coletados ou

avistados anteriormente. Realizaremos um experimento de CTmax pelo método de Lutterschmidt & Hutchison (1997).

No experimento de exposição aguda as concentrações do herbicida serão baseadas em valores crescentes obtidos em estudos que envolvam ecotoxicidade em larvas de anuros (Relyea 2012, Lajmanovich et al. 2013, Costa & Nomura 2016). A concentração de glifosato utilizada na exposição crônica será baseada na LC50 96h obtida no experimento de exposição aguda, com o intuito de garantir a sobrevivência dos indivíduos.

Experimento de exposição aguda – glifosato e LC50

Coletaremos 10 indivíduos no tanque de armazenamento e os colocaremos em cada uma das unidades experimentais. Após a aclimatação, as larvas serão submetidas a quatro tratamentos com diferentes concentrações de glifosato (controle= 0 mg a.i./L; tratamento 1= 0,28 mg a.i./L ; tratamento 2= 1,5 mg a.i./L; tratamento 3= 3 mg a.i./L e tratamento 4= 4,5 mg a.i./L). Cada tratamento será replicado seis vezes, totalizando 24 unidades experimentais (UE) e 240 girinos utilizados. Neste experimento, a temperatura (25°C +/- 1°C) será mantida constante. A posição das unidades experimentais e dos tratamentos será aleatorizada através de sorteio no software R (Rstudio Team, 2015). O pH, a temperatura e o oxigênio dissolvido serão medidos em cada unidade experimental diariamente. Examinaremos os aquários a cada 24 horas e os indivíduos mortos serão removidos e contabilizados. Ao atingir 96 horas de experimento, finalizaremos a exposição aguda e registraremos o número total de indivíduos que sobreviveram. Todos os indivíduos serão anestesiados em solução aquosa de xilocaína e então serão eutanasiados e fixados em formalina 10%.

Experimento de exposição crônica – glifosato e temperatura

Os girinos serão submetidos a um tratamento fatorial com combinação de exposição ao glifosato (controle: 0 mg a.i. e Tratamento: < LC50) e aumento da temperatura da água (ambiente/ alta): Controle: sem glifosato e temperatura ambiente; Tratamento temperatura: sem glifosato e aumento de temperatura; Tratamento com agrotóxico: com glifosato e temperatura ambiente, Tratamento sinérgico: com glifosato e aumento de temperatura. Os tratamentos realizados serão fatoriais, onde serão testados os efeitos crônicos isolados da temperatura e do glifosato, bem como o efeito dos dois fatores em conjunto. Para manter a temperatura da água constante durante o experimento serão utilizados controladores de temperatura AquaTerm AT-1 ® e para manter a água aquecida durante os tratamentos será utilizado um aquecedor LifeTech ®. Replicaremos cada tratamento sete vezes, totalizando 28 unidades experimentais e 560 girinos utilizados (20 girinos em cada unidade experimental). Assim que as larvas derem início à metamorfose (estágio 42; Gosner 1960), o experimento será finalizado. Do total de 20 girinos utilizados em cada unidade experimental, eutanasiaremos 10 utilizando o mesmo procedimento citado acima e outros 10 sobreviventes serão transferidos para água limpa e serão mantidos em condições de laboratório para posterior experimento de predação.

Experimento de vulnerabilidade à predação

No experimento de vulnerabilidade à predação, os girinos e as larvas serão submetidos a dois tratamentos (com predador e sem predador) com 10 réplicas para cada tratamento. Em cada uma das 20 unidades experimentais, serão colocados 10 girinos e uma larva de besouro. Preferencialmente, selecionaremos girinos com tamanhos semelhantes para controlar o efeito dependente de tamanho na susceptibilidade à predação (Broomhall 2004). Nos dois dias anteriores ao início do experimento, as larvas de besouros não serão alimentadas. Como variáveis resposta utilizaremos (A) número de girinos mortos por unidade experimental após 5 horas (tempo 1) e após 24 horas (tempo 2) de exposição aos predadores (girinos devem apresentar marcas de predação como: partes faltantes do corpo ou marcas de escoriação) e (B) número de girinos ingeridos por unidade experimental após 5 horas (tempo 1) e após 24 horas (tempo 2) de exposição a predadores. Mediremos pH, oxigênio dissolvido e temperatura de cada unidade experimental no dia 1 e dia 2. O experimento terá duração de 48 horas, após sua finalização os girinos e as larvas de *Hydrophilus* sp. serão anestesiados e eutanasiados em solução de xilocaína 5% e fixados em formalina 10%. Todos os girinos e larvas serão tombados no Museu de Zoologia da UESC (MZUESC).

Análises estatísticas

Para verificar se a exposição aguda ao glifosato afeta a taxa de sobrevivência dos girinos e se houve mudança no oxigênio dissolvido, pH e temperatura da água entre os tratamentos serão realizadas ANOVA multifatorial. Caso exista diferença significativa entre os tratamentos, realizaremos Teste de Tukey HSD para comparação entre as médias de cada tratamento. Utilizaremos uma análise de regressão pelo método probit para estimar o valor do LC50 96h. No experimento de exposição crônica, utilizaremos uma ANOVA de medidas repetidas para avaliar diferenças no oxigênio dissolvido e no pH entre o primeiro e o último dia de experimento. Para comparar o comprimento total e o estágio de desenvolvimento dos indivíduos entre os tratamentos utilizaremos um modelo linear generalizado (GLM).

Para analisar a assimetria flutuante selecionaremos dez indivíduos de cada unidade experimental. Cada indivíduo será posicionado em placa de Petri com gel de Ultrasom e água, para obtenção de imagens em vista dorsal com câmera Nikon L330 posicionada a uma altura de 30 cm. Em cada imagem será inserida uma escala para posterior avaliação morfológica no software ImageJ (Schneider et al. 2012). Utilizaremos os seguintes caracteres como traços morfológicos bilaterais: (NSD) distância narina-focinho, (ESD) distância olho-focinho, (EL) comprimento do olho, (EW) largura do olho; a variável RPN (posição relativa das narinas) é obtida pela equação: $PRN = ESD / NSD$. A escolha dos caracteres foi baseada em estudos prévios realizados por Costa & Nomura 2016. Cada conjunto de caracteres será medido duas vezes por três pessoas diferentes para evitar erros humanos de medição. Os mesmos girinos utilizados para assimetria flutuante terão seu comprimento total medido e seu estágio de desenvolvimento avaliado segundo Gosner (1960).

Para avaliar a existência de assimetria flutuante (AF) utilizaremos o protocolo proposto por Palmer & Strobeck (1986) com indivíduos submetidos ao tratamento com exposição subletal. Neste protocolo, D e E representam o lado direito e esquerdo do indivíduo, respectivamente (Palmer & Strobeck, 1986). Faremos o cálculo da $AF = |D - E|$ para cada característica morfológica utilizada (NSD; ESD; EL; EW; RPN). Cada característica morfológica será medida três vezes por duas pessoas diferentes para diminuir os erros de medição das larvas. Realizaremos um teste Kolmogorov-Smirnov (KS) para testar a normalidade na distribuição dos índices de AF. Para verificar se a AF é representada por desvios reais e não por erros de medição, e diferenciar a assimetria flutuante da assimetria direcional ou anti-assimetria realizaremos uma ANOVA de modelo misto (Palmer, 1994). Utilizaremos o coeficiente de correlação de Spearman para verificar se os índices de AF são independentes do estágio de desenvolvimento das larvas e do seu comprimento total. Por fim, realizaremos um GLM para verificar se existe influência dos tratamentos nos níveis de assimetria flutuante nos girinos de *Boana faber*. Realizaremos todas as análises no software R (Rstudio Team, 2015).

Para avaliar se a exposição ao glifosato e ao aumento da temperatura durante o desenvolvimento afetam a capacidade de fuga de predadores realizaremos um teste T para amostras independentes para verificar se existem diferenças na captura de girinos entre os dois tratamentos. Para verificar se houve mudança no oxigênio dissolvido, pH e temperatura da água entre os tratamentos serão realizadas ANOVA's *one way*.

IMPLICAÇÕES PARA CONSERVAÇÃO

Declínios populacionais e a extinção de diversas espécies de anfíbios se intensificaram de forma alarmante em todo o mundo (Blaustein et al. 2010). Estima-se que o grupo possua mais de 40% das espécies dentro de alguma categoria de ameaça e que milhares de espécies de anfíbios já tenham sido extintas (Hoffman et al. 2010). As mudanças climáticas têm sido apontadas como possíveis causadoras do declínio dos anfíbios (Wake & Vredenburg 2008), apesar de atualmente pressões antrópicas, como perda e degradação de habitats possam estar atuando de forma conjunta com alterações climáticas nos declínios populacionais dos anfíbios (Blaustein et al. 2010).

Uma grande parte dos estudos que buscam entender como estes estressores ambientais afetam as espécies, avaliam os efeitos dos estressores separadamente em condições que raramente representam o ambiente natural e o efeito sinérgico dos fatores. Além disso, muitos desses estudos avaliam apenas as respostas letais, dificultando a avaliação de como as populações podem responder à longo prazo e se tais ameaças podem afetar sua persistência (Duarte et al. 2012; Bach et al. 2018).

Os resultados obtidos a partir desse estudo podem auxiliar no entendimento de como os contaminantes em conjunto com o aumento da temperatura afetam aspectos morfológicos e a sobrevivência de girinos de uma espécie de anuro neotropical. A partir disso é possível delinear planos de manejo para conservação das espécies muito mais consistentes e realistas e legislações para regular o uso de agrotóxico.

FINANCIAMENTOS OBTIDOS OU FONTES QUE PRETENDE PEDIR FINANCIAMENTO: O projeto contará com recursos oriundos de dois projetos aprovados em editais competitivos: 1. CHAMADA CNPQ/ICMBIO/FAPs nº 18/2017 - Linha 1: Caatinga: Qual o efeito das queimadas sobre herpetofauna do Parque Nacional da Chapada Diamantina? 2. Projeto aprovado no edital Universal da FAPESB: Impacto das mudanças climáticas sobre os anfíbios das florestas montanas do corredor central da Mata Atlântica.

REFERÊNCIAS

- Altig, R., and R.W. McDiarmid. 1999. Diversity: Familial and Generic Characterizations. In: McDiarmid, R.W. & Altig, R. (Eds.) Tadpoles. *The Biology of Anuran Larvae*. University of Chicago Press, Chicago and London, p. 295–337.
- Bach, N. C., Marino, D. J., Natale, G. S., & Somoza, G. M. 2018. Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup ® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). *Chemosphere*, 202, 289-297.
- Blaustein, A. R., Walls, S. C., Bancroft, B. A., Lawler, J. J., Searle, C. L., & Gervasi, S. S. 2010. Direct and indirect effects of climate change on amphibian populations. *Diversity*, 2(2), 281-313.
- Broomhall, S. 2002. Efeitos do endossulfão e temperatura variável da água na sobrevivência e subsequente vulnerabilidade à predação em girinos de *Litoria citropa*. *Aquatic Toxicology*, 61 (3-4), 243-250.
- Broomhall, S. D. 2004. Egg temperature modifies predator avoidance and the effects of the insecticide endosulfan on tadpoles of an Australian frog. *Journal of Applied Ecology*, 41(1), 105-113.
- Costa R. N. & Nomura F. 2016. Measuring the impacts of Roundup Original® on fluctuating asymmetry and mortality in a Neotropical tadpole. *Hydrobiologia* 765: 85 – 96.
- Duarte, H., Tejedo, M. & Katzenberger, M. 2012. Can amphibians take the heat? Vulnerability to climate warming in subtropical and temperate larval amphibian communities. *Global Change Biology*, 18, 412–421.
- Frost, D. R. 2019. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Accessible at <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibian>> Downloaded on 15 september 2019.
- Gosner, K. L. 1960. A simplified table for staging anuran ambryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.
- Haddad, C. F. B., and C. P. A. Prado. 2005. Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *Bioscience*, 55: 207-217.

- Hansen M. 1995. Evolution and classification of the hydrophiloidea – a systematic review. In: Pakaluk J, Slipinski SA, editors. Biology, phylogeny, and classification of coleoptera; papers celebrating the 80th birthday of Roy A. Crowson. Warszawa: Museum i Instytut Zoologii PAN. p. 321–353.
- Hoffmann, M., C. Hilton-Taylor, A. Angulo, M. Bohm, T. M. Brooks, S. H. M. Butchart, K. E. Carpenter, J. Chanson, B. Collen, N. A. Cox, et al. 2010. The impact of conservation on the status of the world's vertebrates. *Science* 330:1503–1509.
- Hogg, I. D. Eadie, J. M., Williams, D. D. & Turner. D. 2001. Evaluating Fluctuating Asymmetry in a Stream-Dwelling Insect as an Indicator of Low-Level Thermal Stress: A Large-Scale Field Experiment. *Journal of Applied Ecology*. 38:1326- 1339.
- Huey, R. B., Kearney, M. R., Krockenberger, A., Holtum, J. A. M., Jess, M. & Williams, S. E. 2012. Predicting organismal vulnerability to climate warming: roles of behaviour, physiology and adaptation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367, 1665–1679.
- Katzenberger, M., Hammond, J., Duarte, H., Tejedo, M., Calabuig, C., & Relyea, R. A. 2014. Swimming with predators and pesticides: how environmental stressors affect the thermal physiology of tadpoles. *PloS one*, 9(5), e 98265.
- Lajmanovich, RC, Junges, CM, Attademo, AM, Peltzer, PM, Cabagna-Zenklusen, MC, & Basso, A. 2013. Toxicidade individual e por mistura de formulações comerciais contendo glifosato, metsulfurão-metil, bispiribac-sódio e picloram em girinos de *Rhinella arenarum*. *Água, Ar e Poluição do Solo*, 224 (3), 1404.
- Lima, M. S. C. S., Pederassi, J., & dos Santos Souza, C. A. 2013. Aspectos ecológicos da reprodução de *Hypsiboas faber* (Anura, Hylidae) na enseada de Sítio Forte, Ilha Grande, Angra dos Reis, Brasil. *Comunicata Scientiae*, 4(2), 195-202.
- Lutterschmidt WI, Hutchison VH. 1997. The critical thermal maximum: history and critique. *Can J Zool*. 75:1561–1574.
- Merritt RW, Cummins KW, Berg MB. 2008. An introduction to the aquatic insects of North America. Dubuque (Iowa): Kendal/Hunt Publishers. p. 862.
- Møller, A. P. 1997. Developmental stability and fitness: a review. *The American Naturalist*, 149(5), 916-932.
- Palmer, A. R., & Strobeck, C. 1986. Fluctuating asymmetry: Measurement, analysis, patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 17, 391-421.
- Palmer RA 1994. Fluctuating asymmetry analysis: a primer. In: MarkowTA (ed.) *Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications*. London: Kluwer Academic.

- Pörtner, H. O., & Farrell, A. P. 2008. Physiology and climate change. *Science*, 322(5902), 690-692.
- Rand, GM (Ed.). 1995. *Fundamentos da toxicologia aquática: efeitos, destino ambiental e avaliação de riscos*.
- Relyea, R. A. 2005. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological applications*, 15(2), 618-627.
- Relyea, R. A. 2012. New effects of Roundup® on amphibians: Predators reduce herbicide mortality; herbicides induce antipredators morphology. *Ecological Applications* 22 (2): 634 – 647.
- Rohr, JR e Palmer, BD. 2013. Mudança climática, múltiplos estressores e declínio de ectotérmicos. *Conservation Biology* , 27 (4), 741-751.
- Root TL, Price JT, Hall KR, Schneider SH, Rosenzweig C, Pounds JA. 2003. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature* 421:57–60.
- RStudio 2015. RStudio: Desenvolvimento Integrado para R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/> .
- Sanseverino, A. M. & Nessimian, J. L. 2008. Assimetria flutuante em organismos aquáticos e sua aplicação para avaliação de impactos ambientais. *Oecologia Bras.* 12(3), 382- 405.
- Schneider, CA, Rasband, WS, Eliceiri, KW. 2012. "NIH Image to ImageJ: 25 anos de análise de imagem". *Nature Methods* 9, 671-675.
- Tomkins, J. L., & Kotiaho, J. S. 2001. Fluctuating asymmetry. *Encyclopedia of life sciences / Macmillan Publishers*.
- Wake, D.B.; Vredenburg, V.T. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A review from the world of amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 11466- 1147.
- Weis, J.S., Smith, G., Zhou, T., Santiago-Bass, C. & Weis, P. 2001. Effects of contaminants on behavior: biochemical mechanisms and ecological consequences. *Bioscience*, 51, 209–217.
- Wilson CB. 1923. Water beetles in relation to pondfish culture, with life histories of those found in fishponds at Fairport, Iowa. *Bulletin United States Bureau Fish*, Washington. 39:231–345.