



Universidade de Brasília
Faculdade de Tecnologia
Departamento de Engenharia Florestal
Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais - PG-EFL/UnB

**Mudanças na paisagem e estresse biológico:
alterações cromossômicas, energéticas e epigenéticas em *Boana albopunctata*
em área agrícola e conservada no Distrito Federal.**

Millena de Albuquerque Saturnino

Brasília, DF
Agosto, 2017

Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais - PG-EFL/UnB

**Mudanças na paisagem e estresse biológico:
alterações cromossômicas, energéticas e epigenéticas em *Boana albopunctata*
em área agrícola e conservada no Distrito Federal.**

Aluna: Millena de Albuquerque Saturnino
Orientador: Reuber Albuquerque Brandão
Co-orientador: Cesar Koppe Grisolia

Dissertação apresentada ao
Departamento de Engenharia
Florestal como parte dos
requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Florestais

Brasília, DF
Agosto, 2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

“MUDANÇAS NA PAISAGEM E ESTRESSE BIOLÓGICO: ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS, ENERGÉTICAS E EPIGENÉTICAS EM *BOANA ALBOPUNCTATA* EM ÁREA AGRÍCOLA E CONSERVADA NO DISTRITO FEDERAL”

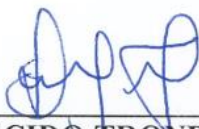
MILLENA DE ALBUQUERQUE SATURNINO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS, DO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL, DA FACULDADE DE TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE.

APROVADA POR:



Prof. Dr. REUBER ALBUQUERQUE BRANDÃO (Departamento de Engenharia Florestal – EFL/UnB);
(Orientador)



Prof. Dr. ERALDO APARECIDO TRONDOLI MATRICARDI (Departamento de Engenharia Florestal – EFL/UnB);
(Examinador Interno)



Prof. Dr. PAULA CABRAL ETEROVICK (Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais – PUC/MG);
(Examinadora Externa)

Prof. Dra. EDER PEREIRA MIGUEL (Departamento de Engenharia Florestal – EFL/UnB).
(Examinador Suplente)

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

ASA254 Albuquerque Saturnino, Millena
Mudanças na paisagem e estresse biológico: alterações cromossômicas, energéticas e epigenéticas em *Boana albopunctata* em área agrícola e conservada no Distrito Federal. / Millena Albuquerque Saturnino; orientador Reuber Albuquerque Brandão; co-orientador Cesar Koppe Grisolia. -- Brasília, 2017.
66 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade de Brasília, 2017.

1. Perda de Hábitat. 2. Anuros como Bioindicadores. 3. Anormalidades Eritrocíticas. 4. Condição Corporal. 5. Estabilidade do Desenvolvimento. I. Albuquerque Brandão, Reuber, orient. II. Koppe Grisolia, Cesar, co-orient. III. Título.

À minha mãe e ao meu irmão Adriano,
sem vocês isso não seria possível.

"Não quero ser o grande rio caudaloso
Que figura nos mapas.
Quero ser o cristalino fio d'água
Que canta e murmura na mata silenciosa."

Helena Kolody
(in Sinfonia da Vida)

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Beth, que me propiciou uma das coisas mais importantes nessa vida, a liberdade de escolha. O seu amor me torna uma pessoa melhor e mais confiante para encarar o mundo. Muito obrigada por me apoiar incondicionalmente e pela paciência em entender e aceitar meus momentos de desordem emocional. Eu amo você, meu tudo!

Ao meu irmão Adriano que age sempre com sensatez e equilíbrio, muito obrigada pelo apoio, querido. Talvez hoje tudo ainda seja meio nebuloso e distante, mas o que nos une é, sempre foi e sempre será mais importante que os percalços da vida, eu te amo e te admiro demais!

Ao meu pai, Ricardo (*in memoriam*), a sua força, alegria, simplicidade e honestidade sempre me guiarão, eu divido essa conquista com o universo para que chegue até você.

A toda a minha família oficial, Dudu, Lena, tia Márcia, tio Marcelo, tio Ricardo, tia Eliane, tio Tainã, Claudinha, Nana, Cadinho, João, Pedro, Ananda e Ana, obrigada por acreditarem em mim. E também a toda a minha gigante família não oficial de amigos tão queridos que me amparam de todas as formas possíveis e fazem a caminhada ser mais leve e ao mesmo tempo mais intensa, com vocês sempre terá valido à pena: Taíssa, Igor, Priscila, Nathy, Lela, Vivi, Fefê, Samy, Tots, Mari, Tutu(uuu), Massamu, Jxuxju, Cathy, Luana, Gegê, Ari, Gabi, Catito, Hugão (meu mestre), Isa, Ana e tantos outros que eu não vou ter paciência e nem espaço no HD pra mencionar, VOCÊS SÃO FUNDAMENTAIS!

Ao meu orientador Reuber, que me abriu um mundo de possibilidades e me fez perceber que o meu esforço nunca terá sido em vão. Obrigada por permitir que eu explorasse todas as possibilidades desse mundo infinito que é a ciência e obrigada também pela paciência em entender as minhas crises e limitações.

Ao meu coorientador Cesar e toda a equipe do GTox que me receberam de braços abertos e me ensinaram e ajudaram tanto.

Ao departamento de Engenharia Florestal pela estrutura, ao Yuri sempre tão calmo frente às minhas atribulações, ao professor Henrique Chaves que me fez descobrir uma paixão pelos recursos hídricos. Agradeço imensamente também ao professor Eraldo, sempre tão solícito diante das minhas dúvidas. Ao Itamar pela força nas coletas de campo e parceria!

A todo o pessoal do LAFUC, em especial Vic, Andrea, Bia (contagem infinita de células), Dani, Emayre, Tarcísio (seu moço cabuloso da estatística), Tatá e Carol pelo

apoio na análise da Assimetria Flutuante e também por me ouvir, aconselhar e ajudar na loucura desse processo de (des)construção que é o mestrado!!!

A todos da Villa Triacca e em especial ao Ronaldo Triacca por ter permitido a realização das coletas na sua fazenda.

Ao SisBIO, IBRAM, CEUA/UnB e a Nárjara pela concessão das licenças para realização dessa pesquisa.

Ao diretor técnico da COOPA-DF por ter me enviado informações necessárias a esse trabalho.

A professora Paula Eterovick que disponibilizou seu tempo em avaliar esse trabalho, dando dicas de como melhorar e publicar.

E a CAPES e UnB pela concessão da bolsa que possibilitou a realização deste projeto!

Sumário

1. Resumo	5
2. Abstract	6
3. Introdução.....	7
3.1. Mudanças na paisagem do Distrito Federal nos últimos anos.....	9
3.2. Anfíbios como Indicadores da Qualidade Ambiental	10
3.3. Efeitos das Alterações na Paisagem no Desenvolvimento de Anuros	11
3.3.1. Alterações Eritrocíticas Nucleares.....	13
3.3.2. Condição Corporal.....	14
3.3.3. Assimetria Flutuante	15
3.4. Hipóteses.....	17
3.5. Objetivo Geral	18
3.6. Objetivos Específicos.....	18
4. Materiais e Métodos.....	18
4.1. Licenças e Autorizações.....	18
4.2. Áreas de Estudo.....	18
4.2.1. Estação Ecológica de Águas Emendadas – ESECAE	20
4.2.2. Programa de Assentamento Dirigido do Distrito Federal (PAD-DF).....	22
4.3. Coleta de Dados.....	23
4.3.1. Análise da Paisagem	24
4.3.2. Alterações Eritrocíticas Nucleares.....	24
4.3.3. Condição Corporal.....	25
4.3.4. Assimetria Flutuante	25
4.4. Análises dos Dados	26
4.4.1. Análise da Paisagem	26
4.4.2. Alterações Eritrocíticas Nucleares.....	27
4.4.3. Condição Corporal.....	28
4.4.4. Assimetria Flutuante	28
5. Resultados	30
5.1. Análise da Paisagem	30
5.2. Alterações Eritrocíticas Nucleares.....	33
5.3. Condição Corporal	34
5.4. Assimetria Flutuante	35
6. Discussão.....	38

6.1. Análise da Paisagem	38
6.2. Alterações Eritrocíticas Nucleares.....	38
6.3. Condição Corporal.....	39
6.4. Assimetria Flutuante	41
6.5. Relação entre as Mudanças na Paisagem e Estresse Biológico em <i>Boana albopunctata</i>	42
7. Conclusão	43
8. Referências Bibliográficas	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: SÍNTESE DE DADOS DA EVOLUÇÃO TEMPORAL DA COBERTURA E USO DO SOLO NO DISTRITO FEDERAL (ADAPTADO DE UNESCO, 2002).	9
TABELA 2: FÓRMULAS UTILIZADAS NO CÁLCULO DAS MÉTRICAS DE ÁREA DA PAISAGEM (ADAPTADO DE MCGARIGAL & MARKS 1995).	27
TABELA 3: CLASSES DE USO E OCUPAÇÃO DO SOLO E SEU RESPECTIVO QUANTITATIVO DE ÁREA NA ESTAÇÃO ECOLÓGICA DE ÁGUAS EMENDADAS (ESECAE).....	31
TABELA 4: CLASSES DE USO E OCUPAÇÃO DO SOLO E SEU RESPECTIVO QUANTITATIVO DE ÁREA NO PROGRAMA DE ASSENTAMENTO DIRIGIDO DO PAD-DF	32
TABELA 5: RESULTADO DAS MÉTRICAS DA PAISAGEM SELECIONADAS, APÓS O TESTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON ($R < 0,8$) DA ÁREA TOTAL E DE CADA CLASSE DE FRAGMENTO PARA OS DOIS LOCAIS DE ESTUDO	33
TABELA 6: RESULTADO DO TESTE DE LEVENE PARA HOMOGENEIDADE DAS VARIÂNCIAS ENTRE OS DOIS LOCAIS DE ESTUDO.....	36
TABELA 7: RESULTADO DA ANOVA DE DOIS FATORES (LADO E INDIVÍDUO) MODELO MISTO DAS MEDIDAS REPETIDAS DOS CARACTERES DE CADA POPULAÇÃO. G.L., GRAUS DE LIBERDADE; QM, QUADRADO MÉDIO.	36
TABELA 8: RESULTADO DOS TESTES PARA ANTISSIMETRIA (TESTE T DA CURTOSE E OBLIQUIDADE E TESTE DE NORMALIDADE SHAPIRO-WILK) DE D-E	37
TABELA 9: RESULTADO DOS TESTES PARA ASSIMETRIA DIRECIONAL (TESTE T PAREADO) DA DIFERENÇA ENTRE OS LADOS DIREITO E ESQUERDO (D-E). N, NÚMERO AMOSTRAL; FA8A, ÍNDICE DE ASSIMETRIA FLUTUANTE (PALMER & STROBECK, 2003)	37
TABELA 10: MATRIZ DE CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE OS CARACTERES. COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO R ABAIXO DA DIAGONAL PRINCIPAL; VALORES DE P ACIMA	37

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: A) ERITRÓCITO NORMAL, COM NÚCLEOS OVAIS, B) ERITRÓCITO COM MICRONÚCLEO, C) ERITRÓCITO BINUCLEAR, D) NÚCLEO COM BROTAMENTO; E) NÚCLEO RENIFORME E F) NÚCLEO EM FORMATO DE GANCHO (FONTE: ALKALADI ET AL., 2015)	13
FIGURA 2: TIPOS DE ASSIMETRIA; A) ASSIMETRIA FLUTUANTE, B) ASSIMETRIA DIRECIONAL, C) ANTISSIMETRIA (ADAPTADO DE PALMER, 1994).	17
FIGURA 3: LOCALIZAÇÃO DAS DUAS ÁREAS DE ESTUDO, ESECAE (VERDE) E PAD-DF (VERMELHO).	19
FIGURA 4: LOCAL DE COLETA NA ESTAÇÃO ECOLÓGICA DE ÁGUAS EMENDADAS (PONTO AMARELO) E ÁREA DE ABRANGÊNCIA EM RAIO DE 2,5KM).....	21
FIGURA 5: LOCAL DE COLETA (LIMITE DA FAZENDA EM LARANJA) REGIÃO AGRÍCOLA DO PAD-DF (PONTO AMARELO) E ÁREA DE ABRANGÊNCIA EM RAIO DE 2,5KM).....	23
FIGURA 6: OCUPAÇÃO E USO DO SOLO NUM RAIO DE 2,5KM DO LOCAL DE COLETA NA ESTAÇÃO ECOLÓGICA DE ÁGUAS EMENDADAS	31

FIGURA 7: OCUPAÇÃO E USO DO SOLO NUM RAIO DE 2,5KM DO LOCAL DE COLETA NO PROGRAMA DE ASSENTAMENTO DIRIGIDO DO DISTRITO FEDERAL.	32
FIGURA 8: GENOTOXICIDADE DAS CÉLULAS AMOSTRADAS POR LOCAIS DE ESTUDO	34
FIGURA 9: RESÍDUOS DA REGRESSÃO LINEAR ENTRE OS VALORES DO COMPRIMENTO ROSTRO-CLOACAL (CRC) E MASSA CORPORAL DOS INDIVÍDUOS DO PAD-DF(LARANJA) E DA ESECAE (AZUL).	35

1. Resumo

Anfíbios, devido a características ecológicas, fisiológicas e reprodutivas, são considerados bons bioindicadores de qualidade ambiental, em diferentes níveis de organização. Com o avanço da produção agrícola no Cerrado, a vegetação nativa vem sendo rapidamente perdida e diversos ambientes estão sujeitos à massiva aplicação de agrotóxicos. O Distrito Federal é grande produtor de grãos, principalmente de soja, com 70 mil hectares de lavouras, que utilizam agrotóxicos de forma intensa, principalmente o herbicida glifosato. Desta forma, é importante avaliar como a alteração da paisagem se reflete na qualidade de vida dos organismos, avaliando respostas ao estresse. Utilizei o hilídeo *Boana albopunctata* para acessar o efeito de estresses biológicos, comparando uma área fortemente agrícola e uma Unidade de Conservação de Proteção Integral (UC), sobre a ocorrência de alterações nucleares em eritrócitos, condição corporal e assimetria flutuante. Não foram observadas diferenças significativas na proporção de alterações citológicas entre os dois locais de estudo, o que pode significar uma boa capacidade metabólica de xenobióticos da espécie, algum mecanismo genético que impeça tais alterações ou ainda que a concentração dos contaminantes agrícolas não atingiu níveis suficientes para causar tais alterações. A condição corporal dos indivíduos da área agrícola foi maior que na UC, provavelmente em decorrência de relaxamento ecológico. Não foi verificada assimetria flutuante nos indivíduos amostrados, por algum mecanismo epigenético da espécie que atue na manutenção da estabilidade do desenvolvimento ou porque o nível de estresse ambiental da área agrícola não foi suficiente para causar erros no desenvolvimento. Isso mostra que, por ser uma espécie generalista, abundante e boa colonizadora, *Boana albopunctata* não demonstrou sensibilidade às mudanças ambientais causadas pelas atividades antrópicas, levantando questionamentos sobre seu potencial como bioindicador de estresse biológico.

Palavras-chave: Perda de Hábitat; Anuros como Bioindicadores; Anormalidades Eritrocíticas; Condição Corporal; Estabilidade do Desenvolvimento.

2. Abstract

Amphibians due to their ecological, physiological and reproductive characteristics, have been considered good environmental bioindicators, at different organizational levels. I used *Boana albopunctata* to assess the effect of biological stressors, comparing an agricultural area and an Integral Protection Conservation Unit (UC) focusing the occurrence of erythrocyte changes, body condition and fluctuating asymmetry. There were no significant differences in the proportion of chromosomal changes between the two study sites. Probably the species have a good metabolic capacity of xenobiotics, some genetic mechanism that prevents erythrocyte changes, or that the agricultural contaminants' concentration are not enough to cause cytological changes. The body condition of the individuals in the agricultural area was higher than in UC, and could be caused by ecological release. I didn't detect fluctuating asymmetry in the sampled individuals. *Boana albopunctata* probably have some epigenetic mechanism that maintain development stability or because the stress level caused by landscape changes was not enough to cause errors in the species development.

Keywords: Habitat Loss; Anurans as Bioindicators; Erythrocyte Abnormalities; Body condition; Development Stability.

3. Introdução

Os anfíbios apresentam características esperadas em bons indicadores de estresse biológico (IZECKSOHN & CARVALHO E SILVA, 2001; BLAUSTEIN et al., 2003; BEEBEE & GRIFFITHS, 2005; BRANDÃO & ARAÚJO, 2008; BURLIBASA & GAVRILA, 2011; GONÇALVES et al., 2013) Mudanças decorrentes de impactos ambientais, como fragmentação e perda de hábitat, além da poluição em decorrência de agrotóxicos utilizados na agricultura, afetam anuros de diferentes formas (p. ex. DELGADO-ACEVEDO & RESTREPO, 2008; ETEROVICK et al., 2016; COSTA & NOMURA, 2017) Alterações nas paisagens podem implicar na redução no valor adaptativo de certas espécies (ALFRED & RICHARDS, 1999; CRNOBRNJA-ISAILOVIC et al., 2005). Uma forma de estimar essa redução é através do uso de indicadores de estresse em sistemas biológicos, tais quais Alterações Eritrocíticas Nucleares, Assimetria Flutuante e Condição Corporal.

Mudanças na paisagem podem causar estresse biológico em anuros (p. ex. RODRIGUES et al., 2005; DELGADO-ACEVEDO & RESTREPO, 2008; GONÇALVES et al., 2012; MOREIRA et al., 2012; GONÇALVES et al., 2013; LINS, 2013; ETEROVICK et al., 2016). Estresse biológico é qualquer mudança de origem ambiental ou genética que diminua o valor adaptativo de um indivíduo (CRNOBRNJA-ISAILOVIC et al., 2005). Essas mudanças podem ser de origem natural ou antrópica, tais como alterações climáticas, fragmentação e perda de habitats, exposição a poluentes e agrotóxicos, mudanças na composição da comunidade local, introdução de predadores, variação na disponibilidade de recurso, além da diminuição da variabilidade genética (PARSONS, 1992; ALFRED & RICHARDS, 1999; LENS et al., 2002; CRNOBRNJA-ISAILOVIC et al., 2005). No entanto, os estudos ecológicos sobre estresse e adaptação de espécies geralmente focam nos impactos das alterações humanas sobre os ecossistemas, pela intensa exploração dos recursos naturais e pela degradação do meio ambiente. (RICKLEFS, 2009), levando à diminuição da qualidade ambiental, impactando organismos.

A análise das paisagens é essencial para compreender diferentes níveis da qualidade do ambiente e os processos ecológicos associados. Desta forma, a ecologia de paisagens incorpora a importância do padrão espacial e da escala de análise em diversos estudos ecológicos (METZGER et al., 2007), incorporando a dinâmica da heterogeneidade espacial, escalas das interações ecológicas e o intercâmbio de

processos ao longo de paisagens heterogêneas nos componentes bióticos e abióticos, além de permitir o manejo dessa heterogeneidade espacial (RISSER et al. 1984).

A ecologia de paisagens é o estudo da estrutura, função e dinâmica das paisagens (áreas heterogêneas compostas por ecossistemas interativos; FORMAN & GODRON, 1986). A estrutura da paisagem analisa a distribuição de energia, materiais e espécies, em relação a tamanhos, formas e configurações dos ecossistemas. A função corresponde às interações entre elementos espaciais, transferências de energia, materiais e espécies ao longo das componentes dos ecossistemas. Já a dinâmica da paisagem corresponde à alteração na estrutura e função do mosaico ecológico ao longo do tempo (FORMAN & GODRON 1986; VOLOTÃO, 1998).

As paisagens naturais podem ser degradadas pelas atividades agropecuárias (KILNK & MACHADO, 2005). O que se observa, de fato, é uma forte pressão do sistema produtivo sobre os recursos naturais em busca de matéria prima, levando ao comprometimento não só da oferta, como da qualidade desses recursos, para as comunidades naturais (TILMAN, 1999). Essa devastação ambiental, crescente e acelerada, leva à perda da biodiversidade, além de comprometer gravemente os processos ecológicos (GOULART & CALLISTO, 2003). O modelo do agronegócio industrial degrada o habitat pelo desmatamento, fragmentação, erosão, uso inadequado da água para irrigação, despejo de esgoto e carreamento de agroquímicos até os corpos d'água, degradando os ecossistemas em diferentes escalas (RATTER et al., 1997; BITTENCOURT & GOBBI, 2006).

O setor agrícola desempenha um papel importante no desempenho econômico do Brasil (OCDE/FAO, 2015). Nos últimos anos, a explosão do agronegócio (os valores de exportações brasileiras ligadas a esse setor cresceram cerca de 300% entre 2000 e 2009; LOURENÇO & LIMA, 2009), o aumento da área plantada e a busca por maior produtividade foram os responsáveis pelo incremento no consumo de agrotóxicos no Brasil, o maior consumidor mundial de agrotóxicos (ANVISA, 2015). A soja é destaque dentre os produtos exportados e contribui bastante para o consumo de agrotóxicos, em especial o glifosato, principal produto utilizado na produção desse grão (BRITO et al., 2002; OCDE/FAO, 2015).

A despeito do que alguns setores pregam, o Brasil utiliza agrotóxicos de forma abusiva e ainda emprega diversos produtos químicos já banidos em outros países devido ao risco que representam à saúde humana e aos ecossistemas (MOREIRA et al., 2012).

Mesmo agrotóxicos considerados relativamente seguros, como o glifosato ([N-(fosfonometil) glicina]; classe toxicológica IV e risco ambiental III; IUPAC, 2007), têm sido apontados como perigosos desativadores endócrinos (HAYES et al., 2006), demonstrando que estamos subestimando inadvertidamente o risco associado a tais substâncias bioexógenas e potencialmente carcinogênicas (GOVINDARALULU et al., 2008). Tal situação deve ser cuidadosamente monitorada, já que o glifosato é utilizado em larga escala nas monoculturas de soja transgênica irrigada, a principal cultura agrícola, em termos de área ocupada, do Distrito Federal, com 70 mil hectares plantados (CONAB, 2017). A presença dessas substâncias no ambiente é mais frequente, também, em decorrência do uso indiscriminado desses produtos e o descarte inadequado de suas embalagens (MOREIRA et al., 2012).

3.1. Mudanças na paisagem do Distrito Federal nos últimos anos

O bioma Cerrado é a savana com maior biodiversidade do mundo e também a mais ameaçada, devido à alta expectativa de expansão da fronteira agrícola e de crescimento das áreas de pastagem (KLINK & MACHADO 2005; MYERS et al. 2000).

A ocupação do território do DF aconteceu de forma desordenada, sem levar em conta princípios básicos de uso potencial da terra e de produção agropecuária sustentada e equilibrada com a oferta ambiental (FONSECA, et al, 2001). Desde 1954, o DF perdeu quase 60% de sua vegetação nativa, enquanto a área agrícola cresceu de 0,02% para quase 50% do DF (Unesco 2002; Tabela 1). Dessa forma, surgiram vários problemas ambientais, como erosão, assoreamento dos cursos d'água, redução da disponibilidade e da qualidade da água, contaminação de mananciais por produtos químicos utilizados na agricultura, frequentes inundações, além da diminuição abrupta da flora e fauna aquática e terrestre (FONSECA, et al, 2001).

Tabela 1: Síntese de dados da evolução temporal da cobertura e uso do solo no Distrito Federal (Adaptado de UNESCO, 2002).

Ano	Vegetação Nativa (%)	Área Agrícola (%)	Área Urbana (%)	Outros (%)
1954	99,92	0,02	0,02	0,04
1984	68,90	20,80	3,68	6,62
1994	55,15	36,79	4,84	3,22
2001	43,18	47,56	7,39	1,87

3.2. Anfíbios como Indicadores da Qualidade Ambiental

Bioindicadores são espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas, cuja presença, abundância e condições são indicativos biológicos de uma determinada condição ambiental (GOULART & CALLISTO, 2003). Também podem ser indicadores ecológicos quando representam o impacto da mudança ambiental em um habitat, comunidade ou ecossistema, ou de biodiversidade, ao indicar a diversidade de um subconjunto taxonômico, ou de toda a diversidade, dentro de uma área (McGEOH, 1998). O uso de organismos bioindicadores também visa gerar alertas precoces de riscos potenciais à saúde humana (RABINOWITZ et al. 2005) ou dos ecossistemas.

Anfíbios anuros são excelentes bioindicadores (VITT et al. 1990) devido ao fato de apresentarem pele permeável, baixa mobilidade, ciclo de vida curto e por possuírem ciclo de vida bimodal (girinos aquáticos e adultos terrestres), dependendo da qualidade tanto de ambientes terrestres quanto aquáticos (BEEBEE & GRIFFITHS, 2005; BLAUSTEIN et al., 2003; BURLIBASA & GAVRILA, 2011; GONÇALVES et al., 2013). As características ecológicas, fisiológicas e reprodutivas dos anfíbios levam este grupo a uma forte associação com ambientes úmidos e essas características, provavelmente, limitam a capacidade de dispersão destes organismos (GULVE, 1998). Além disso, como a maior parte das espécies depende, obrigatoriamente, de corpos d'água para a reprodução (SANTORO & BRANDÃO 2014), mudanças na qualidade da água e dos ecossistemas associados podem representar o fracasso da reprodução e a extinção local de algumas espécies (BRANDÃO & ARAUJO 2008). O uso de anfíbios como indicadores de qualidade ambiental pode ser baseado em mudanças de parâmetros ecológicos, como diversidade, riqueza e abundância (p.ex. BRANDÃO & ARAUJO 2008); mudanças em parâmetros da paisagem e uso de hábitat (p.ex. BECKER et al., 2007; BECKER et al. 2009); parâmetros demográficos (p.ex. TOLEDO et al., 2014); mudanças na estabilidade de desenvolvimento (p.ex. EISEMBERG & BERTOLUCI 2016; ETEROVICK et al., 2015; 2016) e parâmetros genéticos, como queda da heterozigotidade (p.ex. ETEROVICK et al., 2016) ou presença de micronúcleos e DNA danificado (p.ex. GONÇALVES et al., 2013) A ordem Anura é composta por cerca de 6.766 espécies com ampla distribuição no planeta, sendo que 1039 espécies ocorrem no Brasil. O Cerrado apresenta 256 espécies, sendo aproximadamente 192 típicas do bioma e 128 endêmicas

(AmphibiaWeb, 2017; VALDUJO et al., 2012, SEGALLA et al., 2016; BERNECK et al., 2017).

Os representantes da família Hylidae, comumente chamados de “pererecas”, apresentam grande variedade de modos reprodutivos, principalmente quanto ao microhabitat de ovoposição (HADDAD et al., 2013). A maioria das espécies dessa família deposita ovos diretamente na água, porém, algumas desovam em folhas suspensas sobre a água ou em câmaras subterrâneas (HADDAD & PRADO, 2005).

Boana albopunctata, espécie oportunista e abundante, utiliza os mais variados tipos de ambientes e de corpos d’água, como lagoas, açudes e formações campestres úmidas, podendo ser encontrada tanto em ambientes conservados, quanto alterados (HADDAD et al., 2013). A espécie é amplamente distribuída, ocorrendo nas regiões central, sul e sudeste do Brasil, nordeste da Argentina, leste da Bolívia, Paraguai e norte do Uruguai (BRANDÃO & ARAUJO, 2001; FROST, 2009). A sua reprodução no Cerrado é quase contínua ao longo do ano, provavelmente pelo fato da espécie se reproduzir em corpos hídricos permanentes (MUNIZ et al., 2008). Possui modo reprodutivo do tipo 1 (HADDAD et al., 2013) com ovos depositados diretamente sobre a água em corpos hídricos lânticos e girinos exotróficos (HADDAD & PRADO, 2005).

Com base nessas características, *Boana albopunctata* foi selecionada para testar o efeito de diferentes estressantes ambientais, visto a ampla ocorrência da espécie em ambientes fortemente agrícolas e também conservados, ser de grande porte, com grande flexibilidade ecológica, comum em ambientes lânticos de todo o Cerrado e presente em todas localidades estudadas do (BRANDÃO et. al. 2016).

3.3. Efeitos das Alterações na Paisagem no Desenvolvimento de Anuros

A fragmentação e perda de hábitat, em consequência da substituição da vegetação nativa pelo avanço da fronteira agrícola, pecuária, mineração e urbanização que, muitas vezes, vem junto com a prática de queimadas, estão entre as principais causas de declínio dos anfíbios, bem como as mudanças climáticas, incidência de radiação ultravioleta e contaminantes agroquímicos (BECKER et al., 2007). Esse grupo sofre também devido ao isolamento de populações, endogamia e efeitos de borda de habitats fragmentados (ALFRED & RICHARDS, 1999). Outras causas de declínio dos

anfíbios são os efeitos dos agrotóxicos, doenças infecciosas, mudanças climáticas, espécies invasoras ou comércio de animais silvestres (SILVANO & SEGALLA, 2005) e isolamento de populações em detrimento da instalação de usinas hidroelétricas (BRANDÃO & ARAÚJO, 2008).

Como alguns anuros podem viver em habitats agrícolas, eles são frequentemente expostos a altas doses de agroquímicos (CANDIOTI et al., 2010) e, com o aumento de contaminantes antropogênicos nos últimos anos, estudos focando a bioacumulação e os efeitos tóxicos desses contaminantes na sobrevivência desses organismos vem aumentando (RIVERO, 2007). A ação mutagênica de agrotóxicos é bem conhecida, podendo levar à ocorrência de Alterações Eritrocíticas Nucleares (AENs) em animais expostos a essas substâncias (CAMPANA et al., 2003).

A presença de poluentes no ambiente aquático, o qual geralmente é fonte de nutrientes para o ecossistema, pode levar à bioacumulação dessas substâncias ao longo da cadeia trófica, reduzindo populações e interferindo em todo o ecossistema (PESSOA et al., 2006). Os poluentes resultantes do deflúvio superficial agrícola são constituídos de sedimentos, nutrientes, agroquímicos e dejetos animais (GBUREK & SHARPLEY, 1997). Esses poluentes não estão presentes apenas nos agrotóxicos, pois fertilizantes também apresentam riscos para os anfíbios, especialmente aqueles à base de nitrato (ROUSE et al., 1999), como o NPK.

Além dos agrotóxicos, outros agentes estressores podem afetar os organismos, desde o nível molecular (AENs) até populações e comunidades inteiras (RIVERO, 2007). Dependendo da espécie, perturbações causadas por variações térmicas na precipitação, incidência solar, emissão de gases tóxicos, poluição hídrica ou atmosférica, alteração química e física do solo, exposição à radiação, disponibilidade de alimentos e exposição a ruídos (LIJTEROFF et al., 2008), podem acarretar em mudanças fisiológicas, morfológicas, adaptativas ou até mesmo extinguir espécies mais sensíveis (RICKLEFS, 2009).

Ainda que os mecanismos por trás das mudanças observadas na dinâmica das comunidades de anuros sejam pouco conhecidos, avaliar mudanças fenotípicas que possam afetar a performance individual e a habilidade em permanecer em ambientes cada vez mais variáveis é uma abordagem cada vez mais relevante (DELGADO-ACEVEDO & RESTREPO, 2008). Situações onde o estresse ambiental é severo, especialmente durante estágios críticos do desenvolvimento dos organismos, podem

gerar fenótipos anormais e, dependendo da gravidade e frequência desse estresse, toda ou grande parte da população é afetada, modificando sua variabilidade fenotípica e genotípica (WADDINGTON, 1956; HOFFMAN & PARSONS, 1991). Exemplo disso é a Assimetria Flutuante que é a diferença entre os lados direito e esquerdo de caracteres que deveriam possuir simetria bilateral (PALMER & STROBECK, 1986) e a Condição Corporal, utilizada para avaliar o estado nutricional dos organismos (JAKOB et al., 1996, GREEN, 2001).

3.3.1. Alterações Eritrocíticas Nucleares

Agentes genotóxicos (substâncias químicas capazes de causar danos cromossômicos ou no DNA; PHILLIPS & ARLT, 2005) podem levar à formação de Alterações Eritrocíticas Nucleares (LUZHNA et al., 2013). Essas anomalias são formadas quando determinada quantidade de material nuclear fica levemente atrasada na mitose, durante a divisão celular, fazendo com que o núcleo resultante não seja oval, mas apresente cromatina deformada (BOMBAIL et al., 2001). Existem alguns tipos de anormalidades nucleares, como a ocorrência de micronúcleo, o núcleo segmentado, o núcleo com protuberância ou brotamento, núcleo geminado ou célula binuclear, núcleo reniforme, núcleo com vacúolo ou invaginação e núcleo em formato de gancho (Figura 1, CARRASCO, 1990; ALKALADI et al., 2015; GONÇALVES et al., 2012).

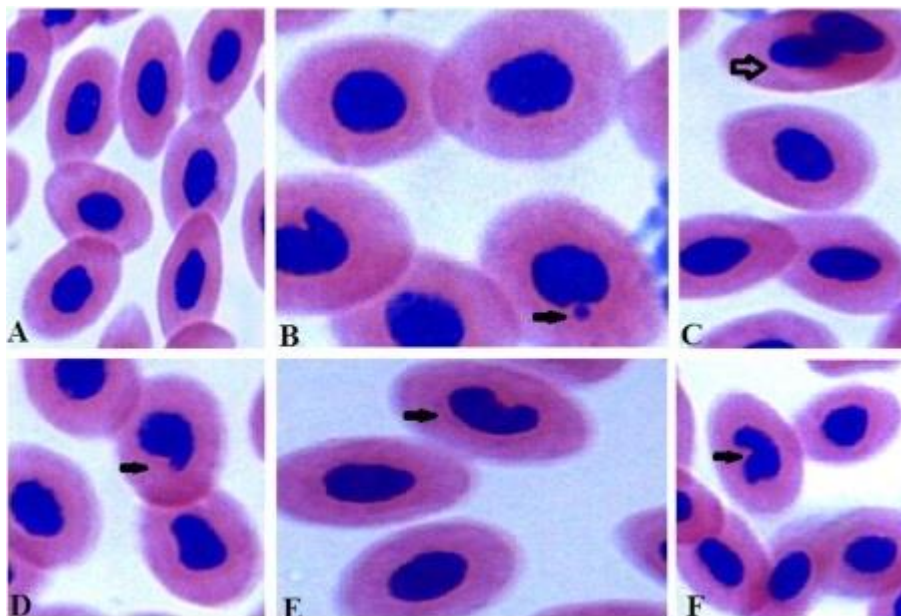


Figura 1: A) eritrócito normal, com núcleos ovais, B) eritrócito com micronúcleo, C) eritrócito binuclear, D) núcleo com brotamento; E) núcleo reniforme e F) núcleo em formato de gancho (FONTE: ALKALADI et al., 2015)

Os micronúcleos são estruturas visíveis no citoplasma de células interfásicas, resultantes de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que, por não se ligarem corretamente às fibras do fuso mitótico durante o processo de divisão celular, não são incluídas no núcleo das células filhas (HEDDLE et al., 1983). É uma porção citoplasmática de cromatina, de forma redonda ou ovalada, que se localiza perto do núcleo (ANDRADE et al., 2005; GRISOLIA et al., 2009). A sua formação resulta da quebra na molécula de DNA dias ou semanas após a ação de agentes mutagênicos, quando as células estão em divisão mitótica (ANDRADE et al., 2005) e ocorre devido a eventos aneugênicos (em cromossomos inteiros) ou clastogênicos (em fragmentos de cromossomo) ou, ainda, pela interação de agentes físicos, químicos ou biológicos com estruturas não genômicas (GRISOLIA et al., 2009). Não se sabe ao certo sobre o mecanismo que leva à formação das outras alterações no núcleo de eritrócitos (SERRANOGARCIA & MONTERO-MONTOYA, 2001).

O uso de análises citogenéticas, para avaliar os efeitos de agentes genotóxicos, como contagem de micronúcleos e outras alterações nucleares de eritrócitos, são bastante promissoras devido ao seu baixo custo e alta sensibilidade (RUSSO et al., 2004). Alguns estudos descreveram a presença de alterações eritrocíticas nucleares (AENs), além do micronúcleo, em células de peixe (AYLLON & GARCIA-VAZQUEZ, 2000; ÇAVAS & ERGENE-GOZUKARA, 2005) e de anuros (GONÇALVES et al. 2012, 2013, 2014), expostas a substâncias genotóxicas.

3.3.2. Condição Corporal

A condição corporal, ferramenta de manejo em Biologia da Conservação (ANDERSON & NEUMANN, 1996), é um indicativo de estresse ambiental, disponibilidade de presas e também da qualidade ambiental (SZTATECSNY & SCHABETSBERGER, 2005; BANCILÃ et al., 2010). Pode ser entendida como um duplê da reserva energética dos organismos (SCHULTE-HOSTEDDE et al., 2005). Ambientes ecologicamente empobrecidos podem apresentar menor disponibilidade de recursos alimentares, afetando o crescimento ou o acúmulo de tecidos de reserva nos organismos (JAKOB et al., 1996; SHINE & MADSEN, 1997; WIKELSKI & TRILLMICH, 1997). Isso se reflete em diferenças na qualidade corporal destes animais quando comparados com animais de ambientes melhor conservados (PEIG & GREEN 2009). A condição corporal

é comumente aplicada em estudos de estresse ambiental (KIRK & GOSLER, 1994; KITASKY et al., 1999; SZTATECSNY & SCHABETSBERGER, 2005; DELGADO-ACEVEDO & RESTREPO, 2008; BANCILÃ et al., 2010; LINS, 2013).

A condição corporal é avaliada pela relação entre a massa corporal e o tamanho do indivíduo, tendo como premissa, portanto, a relação linear entre essas duas variáveis (GREEN, 2001) O tamanho corporal é influenciado por pressões seletivas e demandas ecológicas da população e, ao mesmo tempo, influencia diferentes parâmetros da história de vida de um indivíduo (WIKELSKI & TRILLMICH, 1997). Embora maior tamanho corporal signifique mais força e potencial para forrageamento e fuga de predadores, também significa maior demanda energética, sendo necessária maior ingestão de alimentos (WIKELSKI & TRILLMICH, 1997).

O uso de índices de condição corporal visa gerar estimativas do estado nutricional dos animais, relacionados à sua condição fisiológica, atuando como indicativo da saúde do animal (JAKOB et al., 1996, GREEN, 2001). Por avaliar, basicamente, o acúmulo de tecidos de reserva, tais índices partem da premissa de que animais com mais tecidos de reserva (maior estoque energético), possuem vantagens em relação a animais com menor estoque (JAKOB et al., 1996; SHULTE-HOSTEDDE et al., 2005). Além da gordura, o acúmulo de outros componentes na estrutura corporal do organismo, como proteínas, água e tecido ósseo, também acabam sendo quantificados nos índices de qualidade corporal (SHULTE-HOSTEDDE et al., 2005).

Como a saúde de um organismo influencia fortemente sua habilidade de forrageamento, fuga de predadores, resistência imunológica, dentre outros efeitos, seu sucesso reprodutivo e sua sobrevivência são afetados (DOBSON & MICHENER, 1995; WAUTERS & DHONT, 1995; JAKOB et al., 1996; SHINE et al., 2001). Em última análise, a condição corporal dos organismos é uma forma indireta de avaliar a qualidade do hábitat.

3.3.3. Assimetria Flutuante

A estabilidade do desenvolvimento é a capacidade de um organismo “tamponar” eventuais perturbações que afetam o desenvolvimento de um fenótipo geneticamente pré-determinado (MARKOW, 1995). Como o fenótipo dos organismos é resultado

também da seleção natural (ZAKHAROV, 1992; BALMFORD et al., 1993; PALMER 1994), a manutenção de um fenótipo “normal”, tende a atribuir maior aptidão aos organismos. A manutenção deste fenótipo mais apto, mesmo em condições adversas, é garantida por processos epigenéticos, que promovem a estabilidade do desenvolvimento (PALMER, 1994). No entanto, os efeitos produzidos por estresses severos costumam ser cumulativos. Desta forma, a capacidade dos organismos em diminuir a produção de erros randômicos no genoma é afetada. Erros que alteram a eficiência da expressão gênica afetam a estabilidade do desenvolvimento dos organismos em uma população (PARSONS, 1992; CRNOBRNJA-ISAILOVIC et al., 2005) e a aptidão dos indivíduos afetados.

Como a morfologia “ideal” não é conhecida, desvios na produção de características simétricas (semelhança entre os lados esquerdo e direito de organismos que deveriam possuir simetria bilateral) são utilizados para prever erros na estabilidade do desenvolvimento, tendo em vista que as estruturas de ambos os lados do corpo de um organismo estão sob o controle genético de um mesmo genoma em um mesmo ambiente (PALMER, 1994). Por isso, tais características devem possuir simetria bilateral morfologicamente idênticas (PALMER & STROBECK, 1986).

Entendendo assimetria como a não bilateralidade entre dois lados do corpo, ela pode ser de três tipos (Figura 2; PALMER, 1994).

- Assimetria Flutuante: não é decorrente de uma predeterminação genética, refletindo perturbações ambientais durante o desenvolvimento do organismo. A distribuição da frequência das diferenças entre os lados direito e esquerdo é normal, com média igual a zero;
- Assimetria Direcional: acontece quando um caractere é sempre maior de um lado do que do outro (p. ex: coração dos mamíferos, que apresenta o lado esquerdo maior que o direito). Possui distribuição de frequência normal, com média diferente de zero; e
- Antissimetria: a maioria dos indivíduos de uma população não é simétrica para um determinado caractere, mas o lado maior do que esperado alterna-se aleatoriamente entre os indivíduos de uma população (p. ex: quela dos caranguejos do gênero *Uca*). A frequência de distribuição é bimodal ou platicúrtica com média igual a zero.

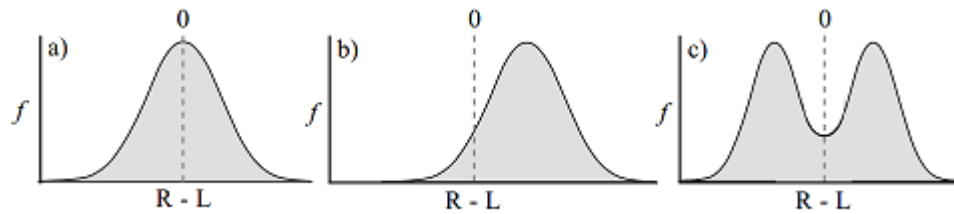


Figura 2: Tipos de assimetria; a) Assimetria Flutuante, b) Assimetria Direcional, c) Antissimetria (Adaptado de Palmer, 1994).

Enquanto a Assimetria Direcional e a Antissimetria podem ser transmitidas por gerações esporádicas adquiridas pelos progenitores e passadas para as proles (ou seja, apresentam uma predeterminação genética), a Assimetria Flutuante é adquirida pela exposição prolongada a perturbadores ambientais, causando erros no desenvolvimento dos organismos expostos a condições adversas ((MATHER, 1953; LEARY & ALLENDORF, 1989), podendo ser utilizada para descrever e avaliar impactos ambientais (BAGLIANO, 2012) e pode ser avaliada através da mensuração de várias características em ambos os lados dos indivíduos, para determinar se um fator estressante externo afeta o desenvolvimento ontogenético dos mesmos (SILVA et al., 2007).

Estudos conduzidos com diversos organismos apontam Assimetria Flutuante associada a diferentes tipos de estresses ambientais (p.ex. JI et al., 2002, LENS et al., 2002, WAUTERS et al., 1996), incluindo anfíbios expostos a agrotóxicos (p.ex. COSTA & NOMURA, 2016 e COSTA & NOMURA, 2017; ETEROVICK, 2016).

Desta forma, é possível que indivíduos de *Boana albopunctata* procedentes de ambientes afetados por intensa atividade agrícola no Distrito Federal (e, desta forma, mais expostos a fatores estressantes), apresentem maior quantidade de alterações nucleares, menor qualidade corporal e maior proporção de assimetria flutuante que indivíduos procedentes de uma unidade de conservação de proteção integral.

3.4. Hipóteses

- H₁: Existem diferenças entre o ambiente degradado e o conservado em alterações (i) citológicas nucleares; (ii) de condição corporal; e (iii) de assimetria flutuante em *Boana albopunctata*;

- H_0 : Não há diferença (i) nas alterações citológicas nucleares; (ii) na qualidade corporal; e (iii) na assimetria flutuante em indivíduos da espécie provenientes de uma Unidade de Conservação de Proteção Integral e da área agrícola.

3.5. Objetivo Geral

Avaliar se há alterações citológicas, energéticas e epigenéticas em *Boana albopunctata* causadas pelo estresse biológico, sob diferentes condições ambientais, entre áreas agrícolas e conservadas no Distrito Federal.

3.6. Objetivos Específicos

- Discutir diferenças na paisagem entre um ambiente conservado e um agrícola;
- Avaliar diferenças na ocorrência de alterações citológicas nucleares entre uma paisagem degradada e uma Unidade de Conservação de Proteção Integral;
- Avaliar diferenças na qualidade corporal entre um ambiente conservado e outro com forte atividade agrícola;
- Avaliar diferenças na simetria entre um ambiente conservado e outro com forte atividade agrícola na paisagem original;
- Discutir o impacto de mudanças na paisagem na qualidade de vida e sobrevivência de anfíbios.

4. Materiais e Métodos

4.1. Licenças e Autorizações

O presente trabalho foi desenvolvido sob licença para pesquisa do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO, Licença #49560-4), licença do Comitê de Ética para Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA-UnB, Licença #30456/2016) e licença oficial para acesso, pesquisa e coleta de anuros na Estação Ecológica de Águas Emendadas, fornecida pelo IBRAM (Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos do Distrito Federal – Brasília Ambiental, Licença #04/2017).

4.2. Áreas de Estudo

Os dois locais de estudo são no Distrito Federal, localizado no bioma Cerrado, que é caracterizado por um mosaico de formações vegetacionais, com fisionomias

abertas e fechadas (EITEN, 1972). O clima da região apresenta duas estações bem definidas, uma chuvosa entre Outubro e Abril e uma seca, de Maio a Setembro, com precipitação média anual de 1.500 mm (DIAS, 1992). Os solos do DF são, em sua maioria, distróficos, com baixo pH uma alta concentração de alumínio, com predomínio de latossolos (LOPES & COX, 1977A; FURLEY & RATTER, 1988).

Foram escolhidas duas áreas com condições ambientais diferentes, que serão os tratamentos deste estudo, sendo uma fazenda localizada no PAD-DF (Programa de Assentamento Dirigido do Distrito Federal), representando o local onde a paisagem está fortemente descaracterizada do original, principalmente pelo desmatamento para implantação de monocultura mecanizada, especialmente a soja transgênica, com uso intenso de agrotóxicos e irrigação por pivô central, e a Unidade de Conservação de Uso Integral, Estação Ecológica de Águas Emendadas (ESECAE), voltada para a pesquisa científica e a preservação ambiental (Figura 3).

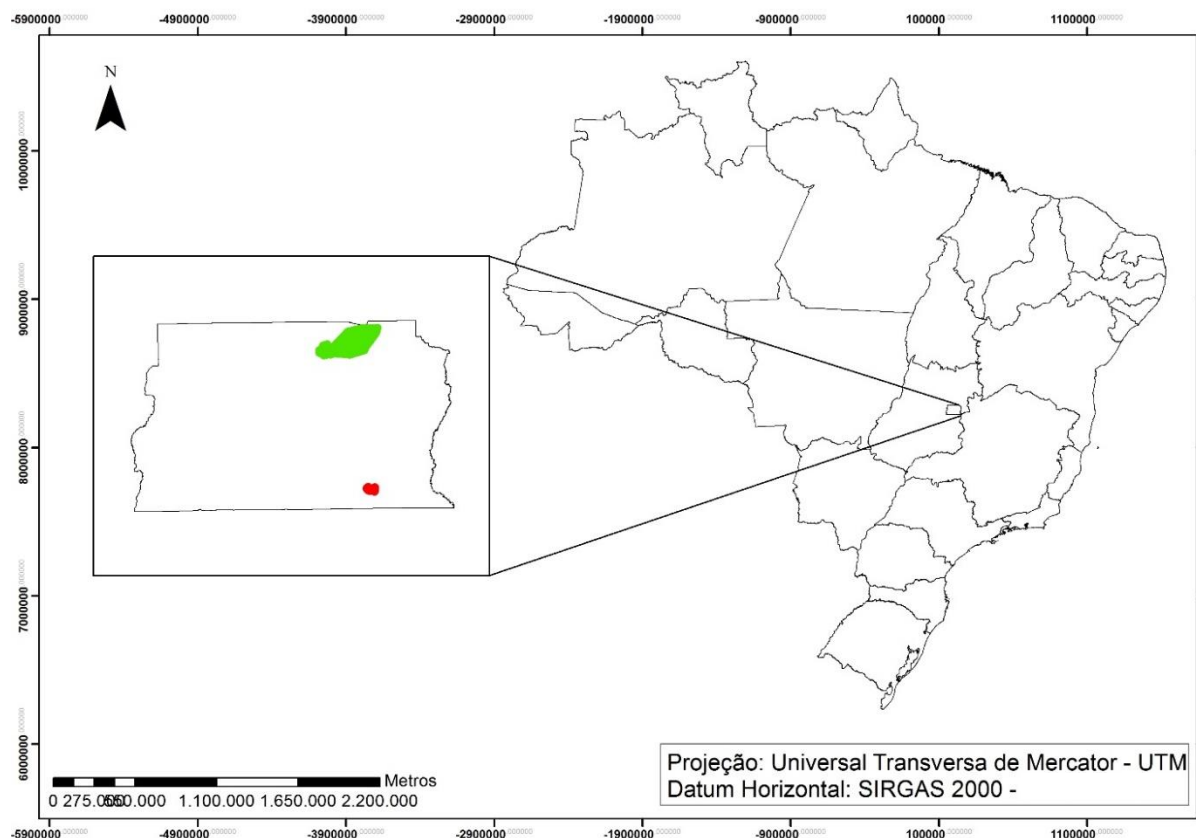


Figura 3: Localização das duas áreas de estudo, ESECAE (verde) e PAD-DF (vermelho).

Como é necessário estipular uma escala espacial relevante para a espécie e para os fenômenos em questão (WIENS, 1996), estipulei um raio de 2,5km ao redor dos

pontos de coleta para a análise da paisagem, criando uma região onde o uso do solo possui influência direta sobre a ecologia dos anfíbios e na dinâmica dos seus ecossistemas. Além disso, essa é uma região que tende a manter uma unidade genética populacional (ETEROVICK et al., 2016).

4.2.1. Estação Ecológica de Águas Emendadas – ESECAE

A Estação Ecológica de Águas Emendadas (ESECAE), situada à nordeste do Distrito Federal, na Região Administrativa de Planaltina, é uma Unidade de Conservação de Proteção Integral (UC) voltada para a manutenção dos ecossistemas livres de alterações causadas por interferência humana, admitido apenas o uso indireto dos seus atributos naturais (BRASIL, 2000).

Essa UC abriga um interessante fenômeno geomorfológico de dispersão das águas, a partir de uma mesma nascente. Cursos d'água que são afluentes de duas grandes Bacias Hidrográficas, as bacias Tocantins e Paraná partem da mesma vereda em direções opostas. Para o norte, o Córrego Vereda Grande deságua no Rio Maranhão, afluente do Rio Tocantins. O Córrego do Brejinho vai na direção sul desaguardando nos rios São Bartolomeu, Corumbá e Paranaíba, cujas águas desembocam no Rio Paraná e na Bacia do Rio Prata (RIBEIRO & MARINHO-FILHO 2005; SEDUMA, 2008).

A unidade possui 10.500 hectares (Figura 4), destinados exclusivamente à realização de pesquisas básicas aplicadas à Ecologia, à proteção do ambiente natural e ao desenvolvimento da educação ambiental conservacionista (RIBEIRO & MARINHO-FILHO, 2005).

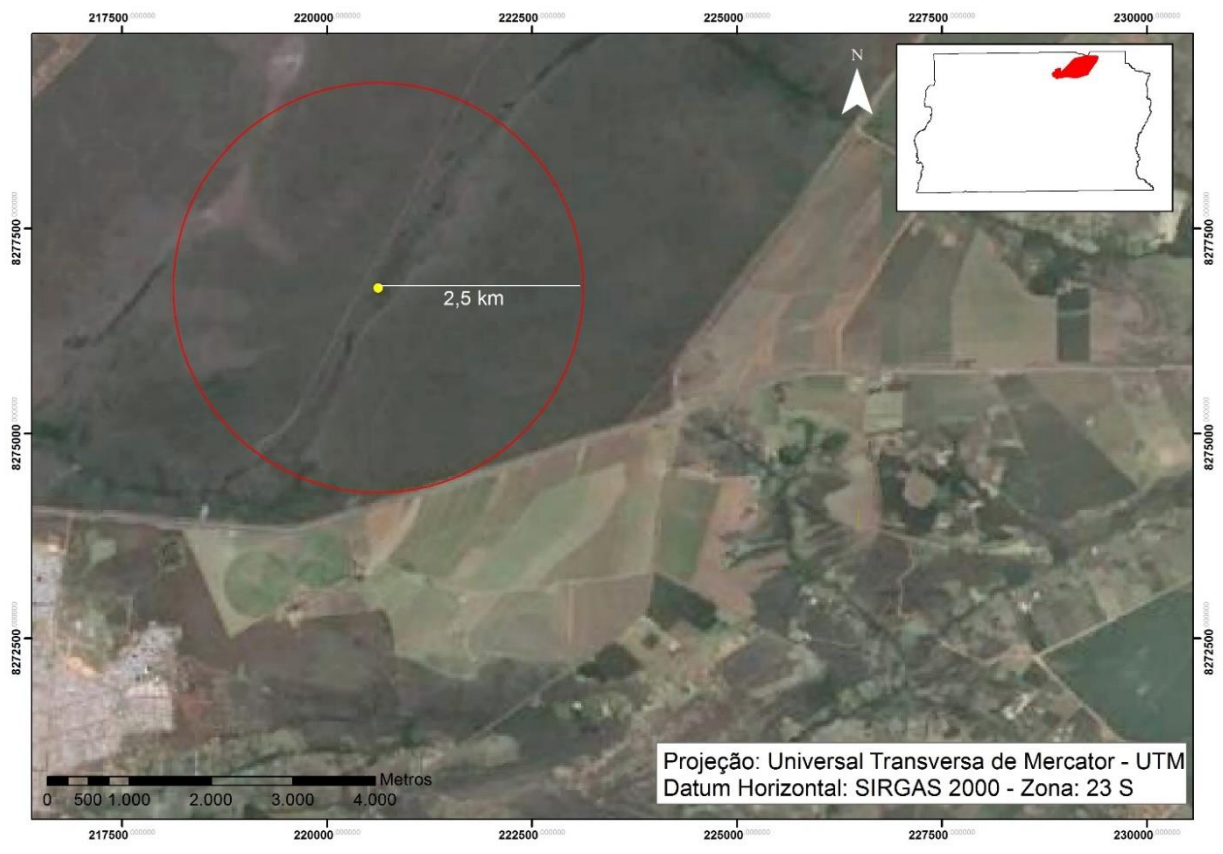


Figura 4: Local de coleta na Estação Ecológica de Águas Emendadas (ponto amarelo) e área de abrangência em raio de 2,5km).

4.2.2. Programa de Assentamento Dirigido do Distrito Federal (PAD-DF)

O PAD-DF (Programa de Assentamento Dirigido do Distrito Federal), localizado na Região Administrativa do Paranoá, foi criado pelo Governo do Distrito Federal, através da Secretaria de Agricultura e Produção e executado pela Fundação Zoobotânica do Distrito Federal, em 1977. Seu objetivo foi incorporar ao processo produtivo áreas rurais do Distrito Federal, até então inteiramente inexploradas (GHESTI, 2009).

A região do PAD-DF possui cerca de 61.000 hectares, caracterizada basicamente pelo plantio de cereais, de oleaginosas, cultivo de hortifrutigranjeiros, bovinocultura e avicultura, através do assentamento de produtores em Chácaras Isoladas, Núcleos Rurais, Colônias Agrícolas e Agrovilas. Há predomínio do cultivo de soja nessa região, que já ocupou a 24ª posição de maior produtor agrícola do país, dentre os 5.645 municípios do Brasil, segundo a Pesquisa Agrícola Municipal realizada pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), em 2005.

Na região ocorre aplicação sistêmica do herbicida Glifosato. Segundo dados fornecidos pelo diretor técnico da COOPA-DF (Cooperativa Agropecuária do Distrito Federal), as variedades de soja transgênicas cultivadas na região são a W 712, W 796, W 787 e a Pionner 90y30. A relação dos agrotóxicos utilizados, em ordem de volume (litros por hectare), é a seguinte: Glifosato, Dual Gold, Select, 2,4D (herbicidas); Prêmio, Acefato, Belt, Dipel, Piretróides (inseticidas); Priori, Opera, Locker, Nativo, Aprouch (fungicidas). O fertilizante utilizado é o NPK, com dosagem de 500 kg/ha, principalmente nas formulações 5:20:20 e 2:20:20. É utilizado o Sistema de Plantio Direto, com aplicação dos fertilizantes no plantio (na cova) e 20 dias após (adubação de cobertura). Os herbicidas, inseticidas e fungicidas são aplicados no período vegetativo e reprodutivo da soja (Dezembro e Janeiro), que coincidem com o período de concentração da atividade reprodutiva de *Boana albopunctata* (HADDAD et al., 2013; CONAB, 2017).

A fazenda na qual foram realizadas as coletas possui 330,22 hectares, onde há predomínio de monocultura de soja geneticamente modificada, irrigada por pivôs centrais (Figura 5).

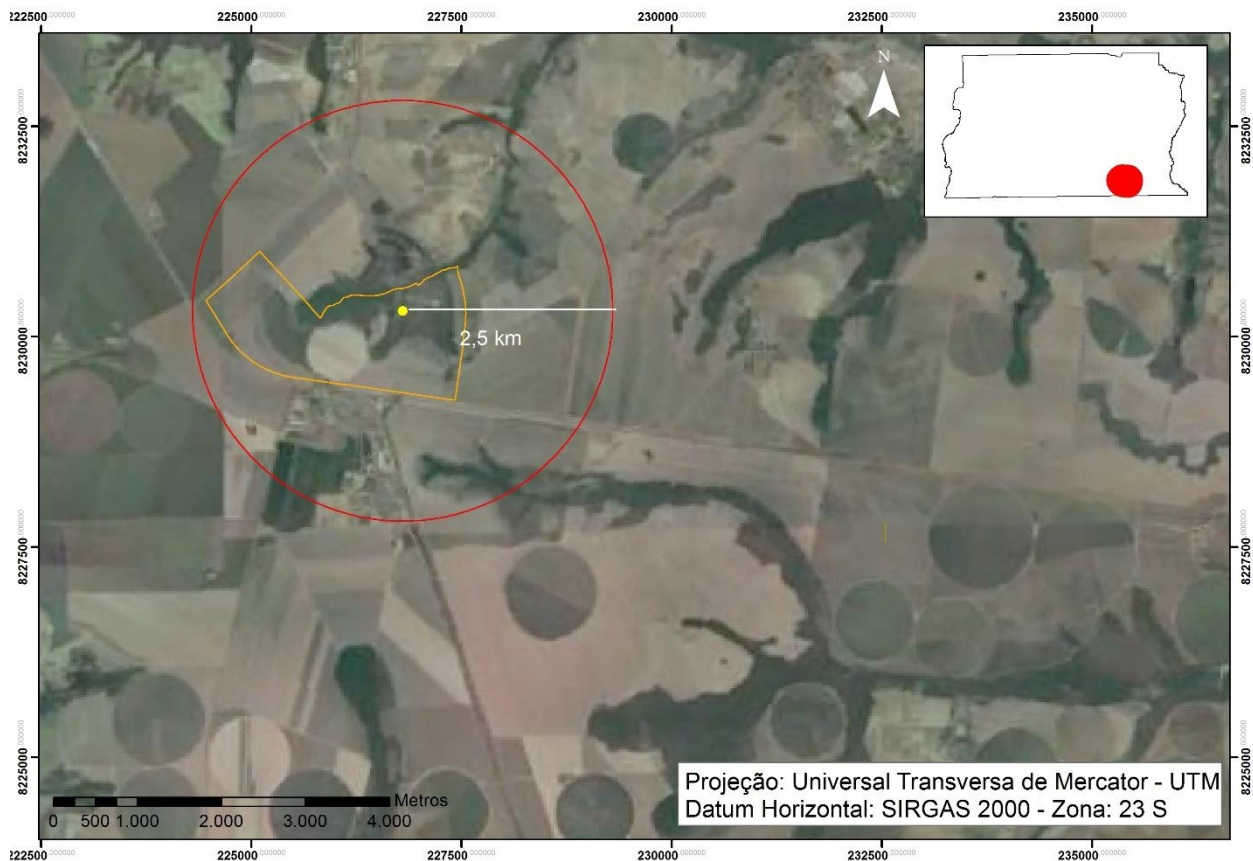


Figura 5: Local de coleta (limite da fazenda em laranja) região agrícola do PAD-DF (ponto amarelo) e área de abrangência em raio de 2,5km).

4.3. Coleta de Dados

As coletas foram realizadas no período chuvoso de 2015-2016 e 2016-2017 a partir do horário crepuscular. Os animais foram coletados próximos a corpos d'água identificados previamente com a classificação de ortofotocartas da Terracap (Agência de Desenvolvimento de Brasília) de 2011 (Datum SIRGAS 2000, Projeção Transversa de Mercator, com 3 bandas espectrais RGB e resolução espacial de um metro).

Na região do PAD-DF, o local de coleta foi uma lagoa artificial localizada a jusante de uma lavoura de soja, enquanto na ESECAE os animais foram coletados na vereda formadora dos Córregos Vereda Grande e Brejal, onde encontra-se o marco das Águas Emendadas. É importante citar que a escolha do ponto de coleta na ESECAE se deu devido à área de abrangência, estabelecida no raio de 2,5km, estar completamente ocupada por vegetação nativa do Cerrado.

A metodologia utilizada para a coleta foi a busca ativa por captura manual, através da identificação da espécie por vocalização específica. **Capturei 50 indivíduos** em cada área de estudo. Logo após a coleta, os espécimes foram acondicionados, um a um, em sacos plásticos transparentes e umedecidos a fim de evitar choques mecânicos, desidratação e estresse. Eles foram mantidos vivos para serem conduzidos ao Laboratório de Fauna e Unidades de Conservação (LAFUC) da Universidade de Brasília, onde foram triados.

4.3.1. Análise da Paisagem

A determinação da estrutura da paisagem, na área de abrangência dos locais de coleta, foi feita pela determinação das classes de uso e ocupação do solo da base de dados do Zoneamento Ecológico Econômico do Distrito Federal (ZEE-DF, 2009) com os devidos ajustes manuais feitos no software ArcGIS® versão 10.2.2. As classes foram posteriormente transformadas para o formato *raster*, através da calculadora de atributos do ArcGIS®.

4.3.2. Alterações Eritrocíticas Nucleares

Para a análise das Alterações Eritrocíticas Nucleares (AENs) retirei uma gota de sangue de cada indivíduo por punção cardíaca e fiz um esfregaço em lâmina apropriada. Após 24 horas de desidratação, fixei o material com metanol 100% e pigmentei com corante *Giemsa*. A fixação e coragem das lâminas foi realizada no Laboratório de Genética Toxicológica (GTox) da Universidade de Brasília. Para a coleta de sangue, anestesiéi os animais com injeção de cloridrato de quetamina intracelomática e apliquei overdose de quetamina intracardíaca, para eutanasiar os animais. Após isso, os animais foram fixados em formol 10% e conservados em álcool 70% para serem depositados na Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília (CHUNB) ao final do trabalho. O procedimento de anestesia e eutanásia dos animais seguiu a Resolução 1.000/2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

A frequência de ocorrência de AENs nas células sanguíneas dos animais coletados foi avaliada através da análise de 1.000 eritrócitos de cada indivíduo (CABAGNA et al. 2006). Cada lâmina recebeu um código, equivalente ao do número de campo do animal (Série RABrandão), as lâminas foram aleatorizadas e sorteadas para

serem observadas em microscópio óptico (Bel Photonics®), visando minimizar vieses associados à ordem de análise. Todas as contagens foram feitas por um único pesquisador, também para evitar ou padronizar possíveis erros.

4.3.3. Condição Corporal

Em laboratório medi o peso de cada animal, utilizando dinamômetro portátil (Pesola®, precisão 0,5 g) e o comprimento rostro-cloacal (CRC) com paquímetro digital (Western®, precisão 0,01 mm). Todas as medições foram realizadas por mim, para evitar ou padronizar possíveis erros, além do uso do mesmo dinamômetro e paquímetro para todas as medições, de todos os indivíduos.

4.3.4. Assimetria Flutuante

A Assimetria Flutuante foi avaliada em cada indivíduo fixado, através da medição do comprimento de caracteres bilaterais (i.e. presente no lado direito e esquerdo do animal) a saber: mão, maior dedo da mão, tibia-fíbula, fêmur, pé e maior dedo do pé e diâmetro do tímpano, com o auxílio de um mesmo paquímetro digital (Western®, precisão 0,01 mm) e pela mesma pessoa. A escolha desses caracteres se deu pela relativa facilidade de medição, permitindo alta repetibilidade. Outro ponto importante é que eles devem apresentar baixa plasticidade fenotípica já que, dificilmente, algum lado do animal será mais usado que o outro ou irá experimentar uma condição micro ambiental diferente (PALMER & STROBECK, 2003).

Foram tomadas cinco medidas repetidas de cada variável morfológica, todas realizadas por mim, sempre com a mão direita, zerando completamente o paquímetro entre cada medida. Assim como na avaliação da Condição Corporal, essas precauções objetivaram diminuir ou padronizar os possíveis erros. Além disso, no momento da medição, não se sabia de qual localidade o indivíduo pertencia, para evitar tendenciosidades. As cinco medidas do mesmo indivíduo foram tomadas no mesmo dia, alternando entre o lado direito e esquerdo, sem alternar entre indivíduos. A utilização de cinco medições seguidas no mesmo indivíduo ou de duas medições com um intervalo de tempo entre os indivíduos não geraram resultados diferentes na assimetria flutuante em estudos similares, possibilitando o uso de qualquer um dos dois métodos de medição (LINS, 2013).

4.4. Análises dos Dados

Todas as análises foram feitas no software RStudio®, com nível de significância de 5%.

4.4.1. Análise da Paisagem

As classes de uso e ocupação do solo em formato *raster* foram utilizadas para o cálculo das métricas da paisagem (algoritmos que quantificam as características espaciais específicas de manchas, classes de manchas ou do mosaico inteiro da paisagem; COUTO, 2004), pela extensão Patch Grid do software ArcGIS® para as classes de uso do solo de cada uma das áreas de estudo. As classes de uso foram obtidas da base de dados

Foram selecionadas apenas as métricas referentes às áreas da paisagem, pois eram de conceituação mais simples, que fazem sentido para a espécie estudada, sendo as mais adequadas ao presente estudo. As métricas de área quantificam a composição da paisagem ao mesmo tempo que são afetadas pela configuração da mesma, sendo as mais importantes em estudos de fragmentação de habitat, já que a fragmentação afeta tanto a área de um habitat, como a sua configuração (

Tabela 2; McGARIGAL & MARKS 1995):

- Total da área core (TCA, em hectares): área central, nuclear ou core de um fragmento. Considerado o melhor indicativo da qualidade dos fragmentos (MCGARIGAL et al., 2002).
- Área da classe (CA, em hectare): é uma medida da composição da paisagem, o quanto da paisagem é composta por apenas uma classe de fragmento (McGARIGAL & MARKS 1995).
- Porcentagem de cada classe na paisagem (PLAND): porcentagem da paisagem ocupada por cada classe de fragmento (McGARIGAL & MARKS 1995).

Tabela 2: Fórmulas utilizadas no cálculo das métricas de área da paisagem (Adaptado de McGARIGAL & MARKS 1995).

Métrica	Variável	Fórmula
Porcentagem de cada classe na paisagem (%)	PLAND	$PLAND = Pi \frac{\sum_{j=1}^n a_{ij}}{A} \times 100$ <p>Em que: Pi = proporção da classe na paisagem; aij = área de cada classe.</p>
Área de classe (ha)	CA	$CA = \sum_{j=1}^n a_{ij} \times \left(\frac{1}{10000}\right)$ <p>Em que: aij = área de cada classe</p>
Total da área central (ha)	TCA	$TCA = \sum_{j=1}^a a_{ijc} \times \left(\frac{1}{10000}\right)$ <p>Em que: aijc = área central total de cada classe</p>

Para evitar vieses e problemas de homocedasticidade entre os dados, realizei correlações par-a-par entre as variáveis, para verificar se as métricas tinham uma alta correlação (Coeficiente de Correlação de Pearson maior que 0.8; METZGER, 2006, RIITTERS et al., 1995).

4.4.2. Alterações Eritrocíticas Nucleares

Contabilizei células normais, com núcleos intactos em formato oval, bem como aquelas com algum tipo de Alteração Eritrocítica Nuclear - AEN (núcleo segmentado, núcleo com protuberância ou brotamento, núcleo geminado ou célula binuclear, núcleo reniforme, núcleo com vacúolo ou invaginação). As AEN foram contabilizadas conjuntamente, sem distinção entre elas.

Obtive a proporção de células com alguma alteração dentre o total de células analisadas para cada indivíduo. Essa proporção foi transformada para atender às

premissas de normalidade e homocedasticidade dos dados (ZAR, 2010), de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Variável transformada (rad)} = \arcsin * (\text{proporção})^{-1/2}$$

Essa variável transformada foi utilizada para determinar as diferenças na distribuição das proporções das alterações entre a população proveniente da área agrícola e a do ambiente conservado, através do teste de Mann-Whitney.

4.4.3. Condição Corporal

Para medir a condição corporal dos organismos, avaliei os resíduos da relação linear entre massa corporal e comprimento rostro-cloacal (CRC). Esse método remove o efeito do tamanho corporal nos resultados (o qual pode ser, por exemplo, efeito da idade dos organismos). O índice é calculado utilizando os resíduos da regressão linear das medidas de massa corporal e CRC, onde indivíduos que apresentem resíduos negativos possuem condição corporal abaixo do que a esperada, conforme previsto pela reta de regressão, podendo estar subnutridos, pois possuem massa corporal menor que o esperado para um determinado tamanho corporal. Por outro lado, os indivíduos com valores de resíduo positivos apresentam condição corporal melhor que a esperada para a população, com massa maior que o esperado para determinado tamanho do corpo (JAKOB et al., 1996).

Testei a normalidade do comprimento rostro-cloacal (CRC) e da massa corporal de todos os indivíduos com teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO & WILK 1965). Fiz uma análise de regressão linear entre os valores de (CRC) e da massa corporal de todas os indivíduos agrupados por local.

Testei a normalidade dos resíduos da regressão linear entre comprimento rostro-cloacal (CRC) e massa com o teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO & WILK 1965) e as diferenças entre os resíduos dos indivíduos procedentes da Estação Ecológica e da Área Agrícola com ANOVA.

4.4.4. Assimetria Flutuante

A partir do conjunto de variáveis, isto é, medidas repetidas de um mesmo lado, para cada caractere e entre os lados direito e esquerdo, testei a presença de *outliers*

com o teste de Grubbs. Também inspecionei os dados para detectar possíveis erros de medição, conforme passo-a-passo proposto por Palmer & Strobeck (2003). Em estudos de morfometria, principalmente os de Assimetria Flutuante, a presença de *outliers* pode mascarar os resultados e devem ser removidos (PALMER, 1994).

Após a retirada de outliers e indivíduos ou caracteres que apresentaram alguma injúria ou problema de medição, fiz um teste de Levene para comparar a homogeneidade das variâncias para cada caractere entre os locais de estudo, sendo retirados das análises posteriores os caracteres que apresentaram heterogeneidade das variâncias (PALMER & STROBECK 2003)

Para verificar se uma possível Assimetria Flutuante é maior que a diferença entre os lados em decorrência do erro de medição, realizei uma ANOVA de dois fatores para cada caractere e para cada localidade, utilizando as réplicas das medições como variáveis dependentes e lado (direito e esquerdo) como fator fixo, e indivíduo, como fator aleatório, como variáveis independentes: (PALMER & STROBECK, 1986, 2003; PALMER, 1994). Análise de variância também foi utilizada para detectar a presença de assimetria direcional e de alometria (variação entre os lados direito e esquerdo devido ao tamanho do caractere (PALMER, 1994; PALMER & STROBECK, 1986, 2003)).

Fiz correlações de Pearson para retirar as variáveis semelhantes. Quando os pares de caracteres apresentarem correlação significativa ou coeficiente de correlação de Pearson “r” maior que 0,50 serão removidos das análises futuras (LINS, 2013).

Avaliei a ocorrência de assimetria flutuante utilizando o índice FA8a (vide equação abaixo), que consiste na média do valor modular do logaritmo da razão entre os lados direito e esquerdo. Este índice retira o efeito alométrico do tamanho do corpo sobre o tamanho do caractere e da variação na assimetria flutuante (PALMER & STROBECK, 2003).

$$FA8a \text{ (população): } \textit{média} | \ln(D/E) | = \textit{média} | \ln(D) - \ln(E) |$$

Ainda seguindo o protocolo de Palmer e Strobeck (2003), realizei testes t pareados das medidas do lado direito (D) e esquerdo (E), visando verificar a consistência e magnitude da direção da diferença entre os lados direito e esquerdo (D-E) entre os indivíduos, para detectar assimetria direcional (PALMER, 1994). Para caracteres com assimetria direcional, verifiquei se a diferença entre os lados é menor que o índice FA8a já que, nesses casos, a predisposição para um lado ser maior que o outro é menor que

uma possível assimetria flutuante, de forma que a assimetria direcional não seja contabilizada como assimetria flutuante (PALMER & STROBECK, 2003).

Testei a ocorrência de antissimetria através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e testes t para obliquidade (assimetria da distribuição de frequência) e curtose (quantidade de dispersão dos dados amostrais identificada pelo pico ou achatamento da curva de distribuição das frequências; ZAR, 2010) da distribuição de D-E para cada população.

Os caracteres que apresentaram antissimetria (não normalidade ou curtose e obliquidade significativas) ou assimetria direcional maior que FA8a foram retirados das análises posteriores, conforme recomendado por Palmer e Strobeck (2003).

No teste t para detectar antissimetria, obliquidade e curtose, apliquei a correção sequencial de Bonferroni para minimizar a ocorrência de Erro Tipo 1, pois, em estudos com grande número de caracteres ou de amostras, a ocorrência de resultados “falso-positivos” é comum (PALMER, 1994; PALMER & STROBECK, 2003, ZAR, 2010).

5. Resultados

Foram coletados 50 indivíduos de *Boana albopunctata* em cada área de estudo, totalizando 100 indivíduos, dos quais apenas dois eram fêmeas, uma coletada em Águas Emendadas e outra no PAD-DF.

5.1. Análise da Paisagem

As duas paisagens apresentam graus de conservação bem distintos. A fazenda localizada no PAD-DF está bem descaracterizada do original, com lavouras de soja irrigadas por pivô central e praticamente nenhum remanescente de vegetação nativa, ao contrário da vereda da ESECAE, que está com a vegetação nativa totalmente preservada. As classes de uso e ocupação do solo no *buffer* de 2,5km da ESECAE são as “Formações Campestres Secas”, “Formações Campestres Úmidas”, “Formações Savânicas” e “Formações Florestais” (Figura 6, Tabela 3), e as do PAD-DF são “Formações Campestres Secas”, “Formações Savânicas” e “Formações Florestais”, “Ocupação Antrópica”, “Agricultura”, “Estradas” e “Reflorestamento” (Figura 7, Tabela 4). Essa classificação foi feita conforme proposto por Ribeiro e Walter (2008), com uma

adaptação para a fitofisionomia vereda, incluída em Formações Campestres Úmidas (BRANDÃO & ARAÚJO, 2001).

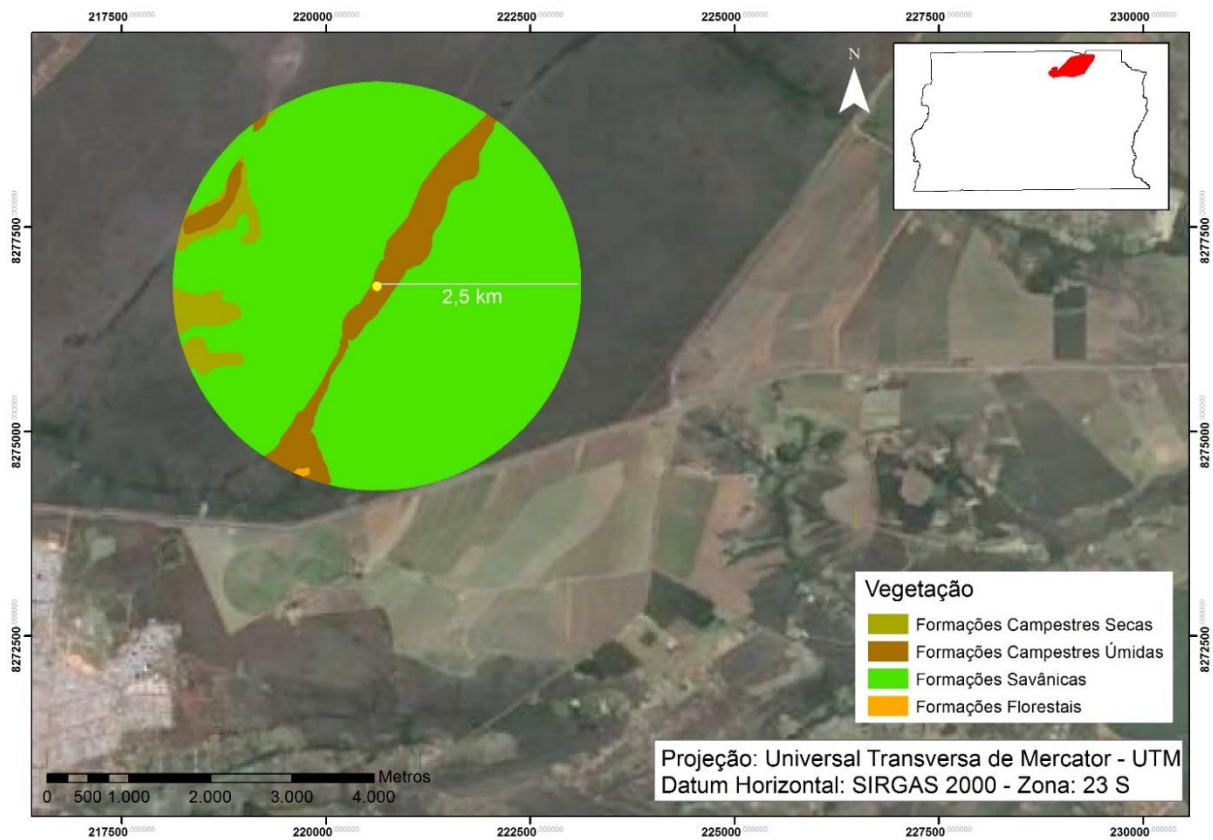


Figura 6: Ocupação e uso do solo num raio de 2,5km do local de coleta na Estação Ecológica de Águas emendadas

Tabela 3: Classes de uso e ocupação do solo e seu respectivo quantitativo de área na Estação Ecológica de Águas Emendadas (ESECAE)

Classe de Uso – ESECAE	Área (ha)	Área (%)
Formações Campestres Secas	79,97	4,07
Formações Campestres Úmidas	176,63	9,00
Formações Savânicas	1.705,50	86,86
Formações Florestais	1,42	0,07
Total	1.963,52	100,00

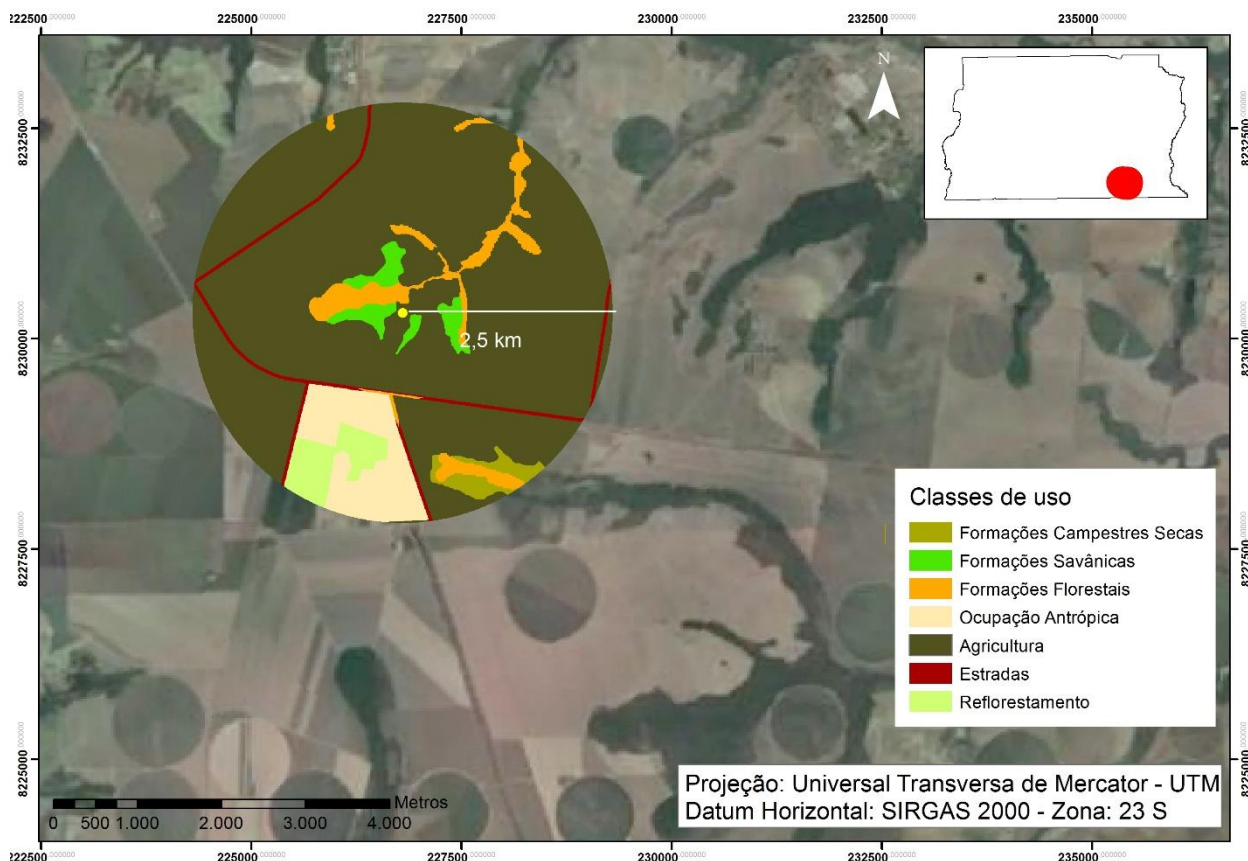


Figura 7: Ocupação e uso do solo num raio de 2,5km do local de coleta no Programa de Assentamento Dirigido do Distrito Federal.

Tabela 4: Classes de uso e ocupação do solo e seu respectivo quantitativo de área no Programa de Assentamento Dirigido do PAD-DF

Classe de Uso - PAD-DF	Área (ha)	Área (%)
Formações Campestres Secas	30,29	1,54
Formações Savânicas	47,70	2,43
Formações Florestais	97,52	4,97
Ocupação Antrópica	137,00	6,98
Agricultura	1.544,14	78,64
Estradas	47,07	2,40
Reflorestamento	59,77	3,04
Total	1.963,49	100,00

As classes de uso de solo diferiram bastante entre os dois locais de estudo. Enquanto na Estação Ecológica de Águas Emendadas, a zona de influência está totalmente ocupada por vegetação nativa, com diferentes proporções por cada itofisionomia (sendo 86% ocupado por Formações Savânicas, Tabela 3), no Programa

de Assentamento Dirigido do Distrito Federal, a vegetação nativa foi praticamente substituída por agricultura (78,64% da área total do PAD-DF, Tabela 4).

As métricas de área selecionadas não apresentaram Coeficiente de Correlação de Pearson maior que 0,8 (Tabela 5), garantindo sua independência na estrutura da paisagem.

Tabela 5: Resultado das métricas da paisagem selecionadas, após o teste de Correlação de Pearson ($r < 0,8$) da área total e de cada classe de fragmento para os dois locais de estudo

Local	Classe	Métricas		
		Área		
		TCA (ha)	PLAND (%)	CA (ha)
ESECAE	Área Total	1.937,24	-	-
	Formações Campestres Secas	74,67	4,07	79,97
	Formações Campestres Úmidas	170,03	9,00	176,63
	Formações Savânicas	1.691,34	86,86	1.705,50
	Formações Florestais	1,20	0,07	1,42
PAD-DF	Área Total	1.902,98	-	-
	Formações Campestres Secas	27,45	1,54	30,29
	Formações Savânicas	44,10	2,43	47,70
	Formações Florestais	87,27	4,97	97,52
	Ocupação Antrópica	133,20	6,98	137,00
	Agricultura	1.518,02	78,64	1.544,14
	Estradas	35,37	2,40	47,07
Reflorestamento	57,58	3,04	59,77	

As métricas diferenciaram os dois locais de estudo. Apesar do total da área core (TCA) ser semelhante entre os dois, a classe que mais contribui para o incremento da área core na ESECAE é “Formações Savânicas” (1.691, 34 ha), enquanto que no PAD-DF é “Agricultura” (1.518, 02 ha). A porcentagem de cada classe (PLAND) mostra que apenas 8,94% da paisagem do PAD-DF corresponde a classes de vegetação nativa (somando os valores para as Formações Campestres Secas, Savânicas e Florestais), ao passo que, na ESECAE, esse valor é de 100%.

5.2. Alterações Eritrocíticas Nucleares

Ao todo, foram analisadas 132.739 células, sendo que destas, 3,97% apresentaram algum tipo de alteração eritrocítica nuclear. Na Estação Ecológica de Águas Emendadas, 3,71% dos eritrócitos estavam alterados, enquanto no Programa de Assentamento Dirigido do Distrito Federal a frequência de alterações foi de 3,94%.

Apesar do valor absoluto de células alteradas ter sido maior no PAD-DF, a área agrícola apresentou frequência média de alterações menor que a ESECAE (PAD-DF: $0,1994 \pm 0,0384$; ESECAE: $0,2028 \pm 0,0394$; Figura 8)

Não houve diferenças na proporção de células alteradas entre a área agrícola e a unidade de conservação ($W = 0,6599$; $p = 0,0655$).

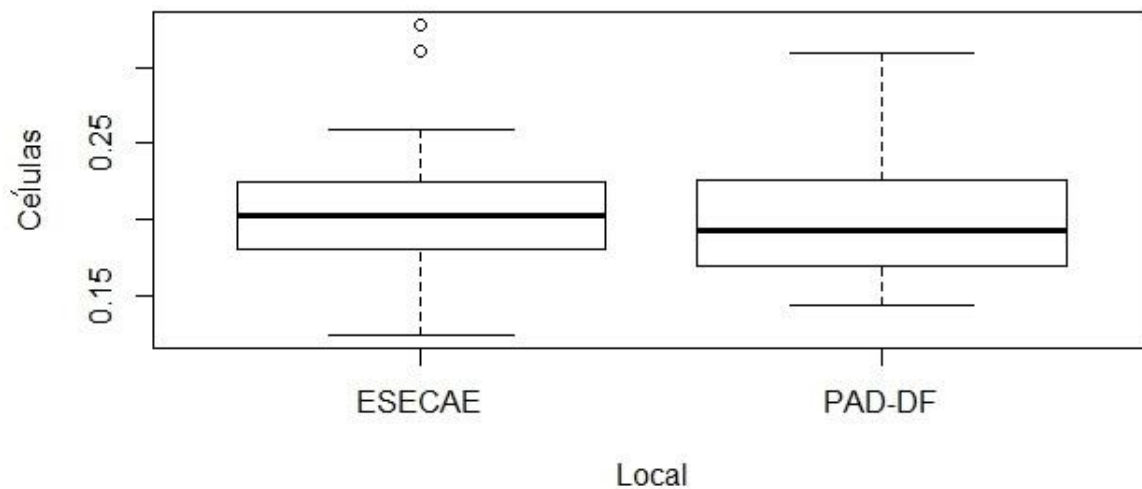


Figura 8: Genotoxicidade das células amostradas por locais de estudo

5.3. Condição Corporal

Existe relação linear positiva entre CRC e massa para indivíduos das duas localidades ($Y = -3,43 + 0,24x$; $r^2 = 0,20$; Figura 9) permitindo utilizar os resíduos dessa regressão como índices de condição corporal individual.

Não encontrei *outliers* para nenhum indivíduo nos valores de comprimento rostro-cloacal (CRC) e massa corporal.

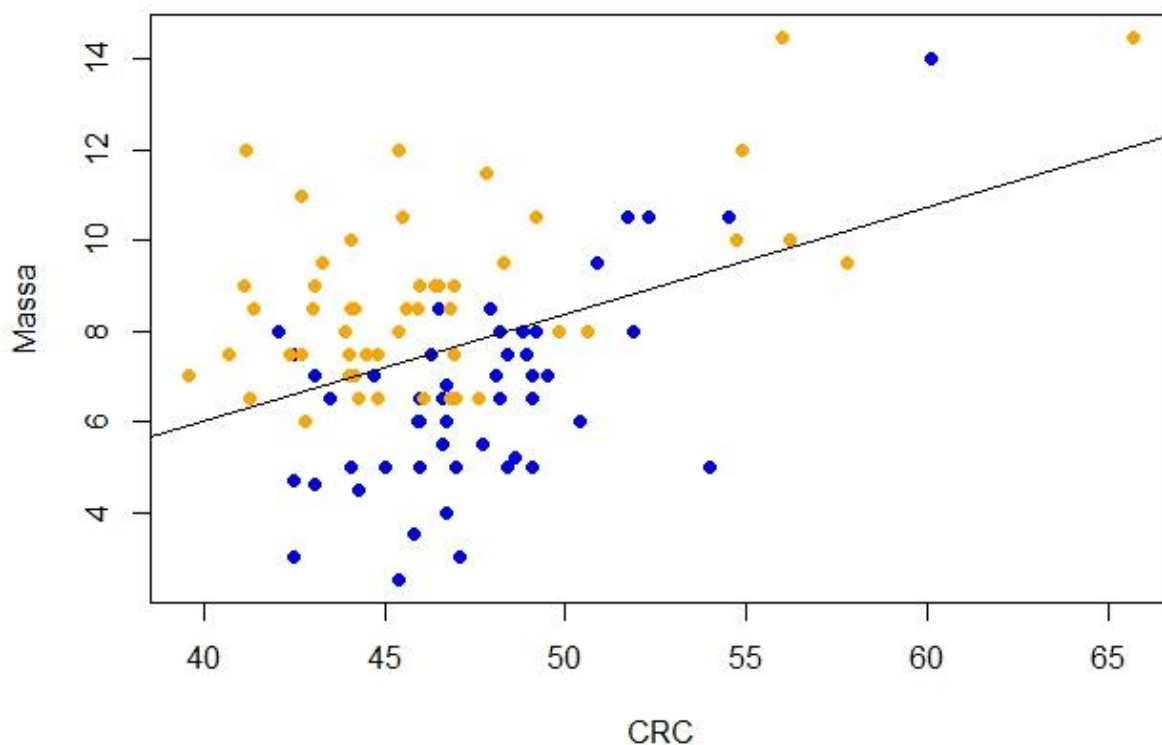


Figura 9: Resíduos da regressão linear entre os valores do comprimento rostro-cloacal (CRC) e massa corporal dos indivíduos do PAD-DF (laranja) e da ESECAE (azul).

Houve diferença na qualidade corporal dos indivíduos de *B. albopunctata* coletados na ESECAE e no PAD-DF ($F = 53,07$; $p < 0.001$). Os indivíduos do PAD-DF apresentaram condição corporal melhor, com média dos resíduos igual a $1,25 \pm 1,63$, enquanto os indivíduos da ESECAE apresentaram média dos valores de resíduo negativos ($-1,22 \pm 1,75$),

5.4. Assimetria Flutuante

Os 100 indivíduos coletados tiveram o comprimento dos caracteres mão, maior dedo da mão, fêmur, tibia-fíbula, pé e maior dedo do pé e diâmetro do tímpano medidos. Um indivíduo da ESECAE teve suas medidas de mão e maior dedo da mão retiradas das análises por apresentar lesão nesses caracteres. O teste de Grubbs encontrou apenas um *outlier* para uma repetição no lado direito do tímpano de um indivíduo do PAD-DF, que foi retirada da análise. O teste de Levene mostrou que o tímpano, a mão e o maior

dedo do pé não apresentavam homogeneidade das variâncias entre os locais de estudo (Tabela 6), portanto foram também retirados das análises posteriores (PALMER & STROBECK, 2003).

Tabela 6: Resultado do teste de Levene para homogeneidade das variâncias entre os dois locais de estudo.

Caractere	F	p
Tímpano	12,487	<0,001
Mão	2,877	<0,05
Maior dedo da mão	1,148	0,3286
Fêmur	1,273	0,2824
Tíbia-fíbula	1,258	0,2877
Pé	0,789	0,5004
Maior dedo do pé	20,250	<0,001

Os caracteres maior dedo da mão, fêmur, tíbia-fíbula e pé apresentaram assimetria não direcional (antissimetria e assimetria flutuante) significativa maior que o erro de medição para ambas as localidades estudadas (interação significativa entre lado e indivíduo; Tabela 7). O teste de obliquidade mostrou que os caracteres tíbia-fíbula e pé dos indivíduos do PAD-DF apresentaram obliquidade, mas esses resultados não permaneceram significativos após a Correção Sequencial de Bonferroni. Oposto foi observado pelo teste de curtose, que indicou leptocurtose para todos os caracteres das duas populações, sendo que os valores continuaram significativos mesmo após a Correção Sequencial de Bonferroni. Já o teste de normalidade de Shapiro-Wilk revelou que a distribuição das diferenças entre os lados direito e esquerdo de nenhum desses quatro caracteres é normal, o que pode ser um indicativo de antissimetria (

Tabela 8).

Tabela 7: Resultado da ANOVA de dois fatores (lado e indivíduo) modelo misto das medidas repetidas dos caracteres de cada população. g.l., graus de liberdade; QM, quadrado médio.

Variável	Local	Lado (L)				Indivíduo (I)				Interação L x I				Erro	
		Q.M.	g.l.	F	p	Q.M.	g.l.	F	p	Q.M.	g.l.	F	p	Q.M.	g.l.
Maior Dedo da Mão	ESECAE	1,358	1	0,672	0,416	15,909	48	7,876	<0,001	2,020	48	11,285	<0,001	0,179	392
	PAD-DF	6,209	1	2,104	0,153	11,665	49	3,953	<0,001	2,951	49	15,370	<0,001	0,192	400
Fêmur	ESECAE	18,900	1	3,287	0,076	38,250	49	6,652	<0,001	5,750	49	11,275	<0,001	0,510	400
	PAD-DF	5,260	1	1,422	0,239	34,100	49	9,216	<0,001	3,700	49	6,607	<0,001	0,560	400
Tíbia-fíbula	ESECAE	5,530	1	9,373	<0,05	53,900	49	91,356	<0,001	0,590	49	14,750	<0,001	0,040	400
	PAD-DF	6,640	1	13,833	<0,05	49,110	49	102,313	<0,001	0,480	49	1,455	<0,05	0,330	400
Pé	ESECAE	27,519	1	20,552	<0,05	22,680	49	16,938	<0,001	1,339	49	8,987	<0,001	0,149	400
	PAD-DF	64,660	1	26,073	<0,05	21,000	49	8,468	<0,001	2,480	49	15,500	<0,001	0,160	400

Tabela 8: Resultado dos testes para antissimetria (teste t da curtose e obliquidade e teste de normalidade Shapiro-Wilk) de D-E

Variável	Local	N	(D-E)								
			Obliquidade			Curtose			Correção Sequencial de Bonferroni	Shapiro-Wilk	
			Cauda	Ts	P	Curtose	Ts	p	p	W	p
Maior Dedo da Mão	ESECAE	49	-0,227	-0,668	0,504	4,379	6,555	<0,001	<0,05	0,977	<0,001
	PAD-DF	50	0,017	0,052	0,959	3,067	4,633	<0,001	<0,05	0,994	<0,05
Fêmur	ESECAE	50	-0,138	-0,411	0,681	2,970	4,488	<0,001	<0,05	0,993	<0,05
	PAD-DF	50	0,470	1,395	0,163	3,687	5,571	<0,001	<0,05	0,983	<0,001
Tíbia-fíbula	ESECAE	50	-0,295	-0,877	0,380	3,034	4,583	<0,001	<0,05	0,977	<0,001
	PAD-DF	50	0,980	2,911	<0,001	4,957	7,489	<0,001	<0,05	0,935	<0,001
Pé	ESECAE	50	-0,104	-0,308	0,758	3,428	5,180	<0,001	<0,05	0,988	<0,001
	PAD-DF	50	1,264	3,756	<0,001	6,611	9,988	<0,001	<0,05	0,930	<0,001

O teste t pareado foi significativo para todos os caracteres das duas populações, indicando uma predisposição para uma assimetria direcional, em que o maior dedo da mão e fêmur da população da ESECAE tiveram o lado direito maior que o esquerdo, enquanto nos outros, o lado esquerdo era maior (Tabela 9). Como as correlações entre os caracteres foi significativa para todos os pares (Tabela 10), o índice FA8a foi utilizado para corroborar o resultado do teste t, que acusou assimetria direcional para todos os caracteres (Tabela 9).

Tabela 9: Resultado dos testes para assimetria direcional (teste t pareado) da diferença entre os lados direito e esquerdo (D-E). N, número amostral; FA8a, índice de assimetria flutuante (Palmer & Strobeck, 2003)

Variável	Local	N	FA8a	AD		
				D-E	Ts	p
Maior Dedo da Mão	ESECAE	49	0,0639	-0,105	14,572	<0,001
	PAD-DF	50	0,0398	0,205	-14,596	<0,001
Fêmur	ESECAE	50	0,0105	-0,389	-22,871	<0,001
	PAD-DF	50	0,0378	0,250	-56,944	<0,001
Tíbia-fíbula	ESECAE	50	0,0765	0,210	11,348	<0,001
	PAD-DF	50	0,0354	0,230	3,151	<0,05
Pé	ESECAE	50	0,0109	0,469	14,137	<0,001
	PAD-DF	50	0,0407	0,719	71,900	<0,001

Tabela 10: Matriz de correlação de Pearson entre os caracteres. Coeficiente de correlação r abaixo da diagonal principal; valores de p acima

Variável	Maior Dedo da Mão	Tíbia-fíbula	Pé	Fêmur
Maior Dedo da Mão		<0,001	<0,001	<0,001
Tíbia-fíbula	0,437		<0,001	<0,001
Pé	0,425	0,855		<0,001
Fêmur	0,404	0,771	0,706	

6. Discussão

6.1. Análise da Paisagem

O solo na Estação Ecológica de Águas Emendadas está ocupado por vegetação nativa do bioma Cerrado, com diferentes formações e fitofisionomias, o que era esperado devido à ESECAE ser Unidade de Conservação de Proteção Integral (UCPI), voltada exclusivamente para pesquisas e preservação da biodiversidade. Isso mostra a importância de UCPIs para a efetiva conservação da biodiversidade (FRANÇOSO et al. 2015).

Valores maiores de área core indicam melhor qualidade da paisagem, correspondendo à área total do habitat preservado e, quanto maior for esse valor, menor o efeito de borda (CALEGARI et al., 2010; McGARIGAL & MARKS 1995). As métricas evidenciaram que na Estação Ecológica de Águas Emendadas a paisagem está mais preservada e com maior qualidade ambiental. A maior classe da ESECAE corresponde a “Formações Savânicas”, enquanto no PAD-DF a classes mais representativa é “Agricultura”. Como as classes maiores são as mais importantes para determinar como ocorre a manutenção da biodiversidade e dos processos ecológicos em larga escala em uma paisagem (FORMAN & GODRON, 1986), a Estação Ecológica de Águas Emendadas oferece condições mais propícias para os processos ecológicos e para a manutenção da biodiversidade que a PAD-DF.

6.2. Alterações Eritrocíticas Nucleares

A ausência de diferença nas alterações eritrocíticas nucleares entre os dois locais de estudo sugere que não há uma relação direta entre o uso de agrotóxicos e fertilizantes na área agrícola e a quantidade de alterações citológicas encontradas, resultado semelhante foi obtido por Rodrigues et al. (2005).

Esse resultado sugere que as concentrações dos produtos químicos utilizados no PAD-DF não foram suficientes para causar danos genéticos (RODRIGUES et al., 2005, GOVINDARAJULU 2008). Outra possibilidade é que *Boana albopunctata* apresente uma eficiente capacidade metabólica de xenobióticos, ou algum mecanismo genético que bloqueie os efeitos mutagênicos do glifosato e/ou outras substâncias. A curta meia-vida

do glifosato (principal ingrediente ativo utilizado nas culturas de soja no PAD-DF) também podem contribuir para a permanência da espécie na paisagem agrícola.

Apesar do glifosato ser um dos agrotóxicos menos tóxicos, segundo a IUPAC (2017), a relação entre classificação toxicológica e os efeitos ecotoxicológicos não é linear (MOREIRA et al., 2012). O risco de danos genéticos não depende apenas do potencial genotóxico dos agrotóxicos, mas também da capacidade individual de reação contra efeitos adversos desses agentes (SRAM 1998). Mesmo a exposição prolongada a agrotóxicos pouco tóxicos pode causar efeitos deletérios (DALLEGRAVE et al., 2003; GASNIER et al., 2009; CORREIA & MOREIRA, 2010). O mesmo ocorre pela exposição crônica ou aguda à metais pesados, herbicidas e pesticidas, resultando em diversas anormalidades genotóxicas, mutagênicas, teratogênicas e reprodutivas em anfíbios (CAMPANA et al., 2003; UNRINE et al., 2007; YIN et al., 2008; PELZER et al., 2008; LIU et al., 2011, GONÇALVES et al., 2014; NIKOLOFF et al., 2014).

O Glifosato foi um dos 14 ingredientes ativos de agrotóxicos colocados em reavaliação pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) em 2008. Em nota emitida em 2013, a Fiocruz concluiu que as evidências de mutagenicidade, toxicidade, carcinogenicidade do glifosato eram insuficientes para banir tal produto. Em 2015, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer classificou o glifosato como “provável carcinógeno humano”. A Anvisa entende que essa classificação é conflitante, tendo em vista que as agências reguladoras da Austrália, Canadá, Estados Unidos e Europa consideram a substância não-carcinogênica (ANVISA, 2017). Isso demonstra a necessidade de análises mais detalhadas e concisas sobre o efeito do glifosato não só para a saúde humana, mas para outras espécies expostas a esse agrotóxico, como os anfíbios anuros. Até pelo fato de outros estudos terem demonstrado o efeito citotóxico e/ou mutagênico do glifosato em diferentes espécies (GASNIER et al., 2009; GONÇALVES et al., 2013 e GONÇALVES et al., 2014).

6.3. Condição Corporal

Observei que os indivíduos do PAD-DF apresentaram condição corporal melhor que os indivíduos da ESECAE. Essa diferença indica que *Boana albopunctata* apresenta vantagens em paisagens alteradas pela atividade humana. Espécies generalistas e oportunistas, como é o caso de *Boana albopunctata*, podem se beneficiar da ausência de competidores (BOLNICK et al., 2010) e/ou menor diversidade de predadores,

especialmente serpentes, que podem ser negativamente afetadas por atividades humanas (KJOSS & LITVAITIS, 2000; READING et al., 2010). Apesar de que uma condição corporal melhor em indivíduos provenientes de áreas com mais distúrbios ambientais não é o esperado (p. ex.: MAZEROLLE 2001; NECKEL-OLIVEIRA & GASCON 2006; DELGADO-ACEVEDO & RASTEPO, 2008).

A ausência de competidores permite que novas oportunidades de recursos passem a ser disponíveis para os organismos que permanecem em ecossistemas empobrecidos (HECNAR & MICLOSKEY, 1997), um processo conhecido como relaxamento ecológico (ou relaxamento competitivo, definido por Grant (1972) como uma expansão do nicho na ausência de competidor), que pode levar a mudanças ecológicas e evolucionárias, sendo um reflexo do deslocamento de caracteres (PFENNIG & PFENNIG, 2009). Esse processo é bem conhecido em ecossistemas insulares (ou isolados), onde organismos que permanecem nessas comunidades simplificadas tendem a apresentar maior amplitude de nicho ecológico quando comparados a populações em comunidades ricas (TERBORGH et al., 1997; BRANDÃO, 2002, AMORIM et al., 2017).

Os efeitos da fragmentação e perda de habitat sobre assembleias de anuros são conhecidos, levando ao decréscimo em abundância populacional e riqueza de espécies em fragmentos isolados (FUNK et al. 2005) e a um incremento do nicho de espécies generalistas que, conseqüentemente, ampliam sua distribuição, podendo até mesmo substituir espécies mais especializadas (HADDAD & SAZIMA 1992; KATS & FERRER 2003). Espécies mais sensíveis à fragmentação podem ter desaparecido do PAD-DF, visto a grande diferença na riqueza da comunidade presente na ESECAE (27 espécies; BRANDÃO & ARAUJO, 1998) contra quatro encontradas no PAD-DF (*Boana albopunctata*, *Dendropsophus minutus*, *Rhinella schneideri* e *Scinax fuscovarius*), Espécies pouco abundantes, especialistas, que requerem grandes área de vida, com baixo poder reprodutivo e de dispersão, devem ser as mais afetadas pela fragmentação e perda de hábitat (FAHRIG, 2003) Acredito que as espécies mais vulneráveis às mudanças na paisagem observadas entre a ESECAE e o PAD-DF já foram extintas localmente, visto que a sistemática substituição da vegetação nativa em detrimento principalmente da agricultura no PAD-DF já está em curso desde a década de 80 (UNESCO, 2002).

A disponibilidade de recursos, juntamente com a densidade populacional e a competição, estão relacionadas diretamente com a qualidade corporal (KIRK & GOSLET, 1994; SHINE & MADSEN, 1997; WIKELSKI & TRILLMICH, 1997), ou seja, quanto maior a oferta de recurso de um local, maior a expectativa do estado nutricional dos indivíduos ali presentes. Sendo que a oferta de recursos, nem sempre ocorre por uma melhor qualidade do hábitat, podendo estar relacionada com a diminuição da densidade populacional e da competição, como o observado no PAD-DF.

6.4. Assimetria Flutuante

O índice de Assimetria Direcional encontrado para *B. albopunctata* não tem sugestão nos estudos sobre a história natural da espécie e nem registro na literatura. Porém, outros estudos mostraram a possibilidade de ocorrência de assimetria direcional (MALASHICHEV 2002; LINS 2013; ETEROVICK et al., 2016) ou lateralidade (DILL, 1977; BISAZZA et al., 1996) para algumas espécies de lagartos e anuros. *Bufo bufo* apresenta uso assimétrico de membros do lado direito para retirar materiais estranhos da cabeça e *Rhinella marina* tende a rotacionar para o lado esquerdo quando mergulha (BISAZZA et al., 1996). As espécies de lagartos do Cerrado *Gymnodactylus amarali* *Cnemidophorus ocellifer* apresentaram assimetria direcional (LINS 2013) e *Bokermannohyla saxicola* apresentou assimetria direcional para o lado direito na tíbia-fíbula e no fêmur (ETEROVICK et al. 2016).

Essas evidências reforçam o entendimento do processo de lateralidade no cérebro de diferentes espécies e grupos taxonômicos (BISAZZA et al., 1996). A lateralidade pode estar relacionada a preferências de uso de um lado do corpo, como também a padrões de desenvolvimento e metamorfose, mas precisa ser corroborada por outros estudos (ETEROVICK et al., 2016).

A presença de leptocurtose também foi observada em outros estudos de assimetria flutuante (ver EISEMBERG & BERTOLUCI (2016). Não detectei assimetria flutuante em nenhuma das duas populações de *Boana albopunctata* amostradas, sugerindo que a espécie não sofre efeitos de instabilidade de desenvolvimento frente à fragmentação e perda de hábitat e agentes contaminantes da área agrícola. Isso indica a presença de mecanismo epigenético que favorece a espécie ou que os níveis de estresse não foram suficientes para causar a assimetria flutuante, ao contrário do observado em estudos semelhantes (ver DELGADO-ACEVEDO & RASTEPO, 2008;

COSTA & NOMURA 2015 e 2017). Além disso, a assimetria flutuante está comumente relacionada a estresse biológico de origem genética, geralmente associada à diminuição da variabilidade genética de uma população (PARSONS, 1992). Assimetria flutuante associada a gargalos genéticos são esperados em ambientes fortemente fragmentados e isolados (SARRE, 1996; LINS 2013), sendo um método simples, barato e eficiente para mensurar o valor adaptativo de indivíduos expostos a situações estressantes (SARRE & DEARN, 1991; SARRE et al., 1994).

Alguns estudos, apesar de detectarem assimetria flutuante e diferenças entre locais com diferentes graus de distúrbios na paisagem, falharam ao tentar relacionar essa assimetria com as alterações antrópicas observadas (DELGADO-ACEVEDO & RESTREPO 2008; EISEMBERG & BERTOLUCI 2016).

6.5. Relação entre as Mudanças na Paisagem e Estresse Biológico em *Boana albopunctata*.

Os dois locais de estudo apresentam grandes diferenças. O Programa de Assentamento Dirigido do Distrito Federal (PAD-DF) está completamente descaracterizado do original e fortemente suscetível aos efeitos de fragmentação de hábitat. A contribuição da perda de hábitat, em particular a fragmentação, nas mudanças fenotípicas em anuros são pouco conhecidas (DELGADO-ACEVEDO & RASTEPO, 2008), por ser um fenômeno complexo que pode afetar diretamente populações de anfíbios, através da eliminação de habitats favoráveis para reprodução e forrageamento (TOCHER et al., 1997), modificação nas condições microclimáticas que influenciam processos fisiológicos (MARSH & PEARMAN, 1997) e ruptura na conectividade dos habitats que afetam a dispersão desse grupo (FUNK et al., 2005; BECKER et al., 2007; BECKER et al. 2009) e indiretamente, por mudanças na abundância de predadores, parasitas, patógenos e presas (LIPS, 1999). Ameaças aos anfíbios envolvem alterações tanto em habitats aquáticos quanto terrestres. A maioria das espécies usam os corpos d'água só para reprodução, de forma que o período que passam na água representa uma porção pequena de sua história de vida (BEEBEE & GRIFFITHS, 2005; SANTORO & BRANDÃO 2014). Os anfíbios possuem ampla distribuição e hábitos geralmente crípticos e, como relativamente pouco se sabe sobre a sua história natural quando não estão agregados nos corpos de água, não entendemos uma importante parte de sua história natural, o que limita a conservação destes animais (LANNOO et al., 2005). O motivo pelo qual sapos percorrem longas distâncias é desconhecido, bem como as

vantagens evolutivas disso, no entanto, esse conhecimento é necessário para maximizar os esforços conservacionistas, identificando quais fragmentos são requeridos pelos anfíbios (SZTATECSNY & SCHABETSBERGER, 2005).

Os impactos de estresse biológico podem variar de acordo com a espécie, devido às diferentes necessidades ecológicas ou exigências ambientais, que definem a sensibilidade do grupo aos efeitos da fragmentação (GEHRING & SWIHART, 2003). Alguns autores ainda sugerem que há grupos que podem, inclusive, alterar seus comportamentos frente à fragmentação, como forma de aproveitar ou lidar com seus efeitos (ESTRADA et al., 1999; ONDERDONK & CHAPMAN, 2000; JEPSEN & TOPPING, 2004), o que foi observado nos indivíduos de *Boana albopunctata* amostrados na região agrícola do PAD-DF.

Normalmente, as espécies reagem de forma diferente à ação de contaminantes, de forma que a abundância das espécies pode ser alterada, pois os genótipos mais suscetíveis podem ser eliminados devido aos impactos dos genotóxicos, elevando a taxa metabólica e a carga genética (GRISOLIA, 2005). Isso desencadeia relações de competição e predação, podendo levar à extinção de espécies mais sensíveis (apenas quatro espécies observadas no PAD-DF contra 27 inventariadas na ESECAE). Mudanças na alimentação, no comportamento predador-presa ou mudanças no desenvolvimento (metamorfose ou desenvolvimento das gônadas) também podem impactar a abundância de espécies levando ao declínio. Todos esses fatores podem ser observados pela ação de agentes contaminantes (BOONE et al., 2005).

7. Conclusão

A alteração da paisagem, que leva à fragmentação e perda de hábitat e o uso de contaminantes agrícolas no PAD-DF, não influenciou no surgimento de alterações citológicas e nem na assimetria flutuante de *Boana albopunctata*, o que levou a rejeitar as hipóteses de que haveria diferenças na proporção de alterações eritrocíticas nucleares e na estabilidade do desenvolvimento entre os organismos provenientes das duas áreas de estudo.

Para a condição corporal, a hipótese que haveria diferença entre as populações da ESECAE e do PAD-DF foi aceita. No entanto, o resultado foi o contrário do esperado, pois os indivíduos do PAD-DF apresentaram qualidade corporal maior que os de Águas

Emendadas. Esse resultado pode ter sido causado pela simplificação do hábitat e da diminuição da riqueza de espécies, diminuindo também a competição e predação na área mais alterada.

O índice de condição corporal, apesar de ter apresentado resultado contrário ao esperado, foi eficiente na mensuração de diferenças entre populações, tendo em vista que o relaxamento ecológico pode ser visto como consequência de alterações na paisagem original.

O fato de *B. albopunctata* não apresentar diferença na proporção de alterações citológicas nem tampouco assimetria flutuante e estar com um estado nutricional superior na área agrícola sugere que esta espécie pode não ser um bom bioindicador de estresse ambiental. Aparentemente, a espécie está sobrevivendo bem frente às mudanças ambientais do PAD-DF, chamando atenção para o senso comum de que anuros são bons bioindicadores ambientais (VITT et al. 1990). Verificamos que nem todo anuro é um indicador biológico eficaz, e que esse senso comum carece de evidência (p.ex. PECHMANN & WILBUR 1994).

Assim, é importante que estudos focando o estresse biológico e ambiental em anfíbios considerem a realização de experimentação em laboratório, onde seja controlada a intensidade do estresse biológico. Outras espécies observadas no PAD-DF podem indicar se o padrão encontrado neste estudo se repetem, bem como análises de concentração de agrotóxicos e fertilizantes na água e nos tecidos corporais dos anuros encontrados na área agrícola, para poder compreender como o uso de contaminantes agrícolas afetam a qualidade de vida e sobrevivência dos anuros.

8. Referências Bibliográficas

ALFORD, R. A.; RICHARDS, S. J. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 30, p. 133-165, 1999.

ALKALADI, A; NASR, A.M.; NASR, E. D.; MOHAMED, A.; ZINADAH, O. A. A., Hematological and biochemical investigations on the effect of vitamin E and C on *Oreochromis niloticus* exposed to zinc oxide nanoparticles. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2015.

AMORIM, M. E. ; SCHOENER, T. W. ; SANTORO, G. ; LINS, A. C. R. ; PIOVIA-SCOTT, J. ; BRANDAO, R. A. . Lizards on Newly Created Islands Independently and Rapidly Adapt in Morphology and Diet. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America**, 2017.

AmphibiaWeb. **Information on Amphibian Biology and Conservation**. Berkeley, Califórnia, 2017 Disponível em: <http://amphibiaweb.org/>. Acesso em: 05 de junho de 2017.

ANDERSON, R.O., NEUMANN, R.M. Length, weight, and associated structural indices. In: MURPHY, B.R., WILLIS, D.W. (Eds). **Fisheries Techniques**, 2ª Ed, American Fisheries Society, p. 447-482, 1996.

ANDRADE, M. G. S.; REIS, S. R. A.; ROBINSON, W. M.; BORGES-OSÓRIO, M. R. Micronúcleo: um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal. **Revista Odonto Ciência**, v. 20, p. 137–141, 2005.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) – Relatório de Atividades 2013 a 2015**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+2013-2015+VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8> Acesso em 5 de janeiro de 2017.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Reavaliação de agrotóxicos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/> Acesso em 30 de junho de 2017

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research**, v. 467, p. 177-186, 2000.

BAGLIANO, R. V. Principais organismos utilizados como bioindicadores relatados com uso de avaliadores de danos ambientais. **Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v..2 n.1, 2012.

BALMFORD, A.; JONES, I. L.; THOMAS, A. L. R. On avian asymmetry: evidence of natural selection for symmetrical tails and wings in birds. **Proceedings of the Royal Society of London Series B**, v. 252, p. 245-251, 1993.

BANCILÃ, R. I.; HARTEL, T.; PLAIA, R.; SMETS, J. COGALNICEANU, D. Comparing three body condition indices in amphibians: a case study of yellow-bellied toad *Bombina variegata*. **Amphibia-Reptilia**, v.31, p. 558-562, 2010.

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

BECKER, C.G.; FONSECA, C.R.; HADDAD, C.F.; BATISTA, R.F.; PRADO, P. I., Habitat split and the global decline of amphibians. **Science**, v. 318, p. 1775–1777, 2007.

BECKER, C.G., FONSECA, C.R., HADDAD, C.F., PRADO, P. I. Habitat split as a cause of local population declines of amphibians with aquatic larvae. **Conservation Biology**, v. 24, p. 287–294, 2009.

BERNECK, B.V.M.; GIARETTA, A.A.; BRANDÃO, R.A.; CRUZ, C.A.G.; HADDAD, C.B.F. The first species of *Aplastodiscus* endemic to the Brazilian Cerrado (Anura, Hylidae). **ZooKeys**, v. 642, p. 115-130, 2017.

BISAZZA, A., CANTALUPO, C., ROBINS, A., ROGERS, L.J., VALLORTIGARA, G. Right-pawedness in toads. **Nature**, v. 379, p. 408, 1996.

BITTENCOURT, S. & GOBBI, E.F. **Carga máxima de fósforo admissível ao reservatório Piraquara II, uma aplicação do processo TMDL**. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 30, n. 6, p. 595-603, 2006.

BLAUSTEIN, A. R.; ROMANSIC, J. M.; KIESECKER, J. M.; HATCH, A. C. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. **Diversity and Distributions** v. 9, p. 123–140, 2003.

BOLNICK, D. I.; INGRAM, T.; STUTZ, W.E.; SNOWBERG, L.K.; LAU, O. L.; PAULL, J. S. Ecological release from interspecific competition leads to decoupled changes in population and individual niche width. **Proceedings. Biological Sciences**, v. 277, p.1789-1797, 2010.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assay to butterflyfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland, **Chemosphere**, v. 44, p. 383-392, 2001. BOONE, M. D.; COWMAN, D.; DAVIDSON, C.; HAYES, T.; HOPKINS, W.; RELYEA, R.; SCHIESARI, L.; SEMLITSCH, R. Evaluating the Role of Environmental Contamination in Amphibian Population Declines In: GASCON, C.; COLLINS, J. P.; MOORE, R. D.; CHURCH, D. R.; MCKAY, J. E.;

MENDELSON III, J. R. (Eds.) **Amphibian conservation action plan proceedings** IUCN/SSC Amphibian Conservation Summit, p. 32-35, 2005.

BRANDÃO, R.A.; ARAUJO, A.F.B. A Herpetofauna associada às Matas de Galeria no Distrito Federal. In: RIBEIRO, J. F., FONSECA, C. E. L., SOUSA-SILVA, J. C. (Eds.) **Cerrado: caracterização e recuperação de Matas de Galeria**. Embrapa Cerrados, p. 561-604, 2001.

BRANDÃO, R. A. **Monitoramento das populações de lagartos (Sauria) no Aproveitamento Hidrelétrico de Serra da Mesa, Minaçu, Goiás**. Tese de Doutorado. Brasília: Universidade de Brasília, 2002.

BRANDÃO, R.A.; ARAUJO, A.F.B. Changes in anuran species richness and abundance resulting from hydroelectric dam flooding in Central Brazil. **Biotropica**, v. 40, p. 263–266, 2008.

BRANDÃO, R. A.; MACIEL, S. & ÁLVARES, G. F. R. **Guia dos Anfíbios do Distrito Federal**. 2016. Disponível em www.lafuc.com. Acesso em 22 de março de 2016

BRASIL, Presidência da República. **Lei Federal 9.985 de 18 de julho de 2000**. Institui o Sistema Nacional de Unidades e Conservação. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br> Acesso em 20 de maio de 2015.

BRITO, NATILENE MESQUITA; JÚNIOR, OZELITO POSSIDÔNIO DE AMARANTE; RIBEIRO; MARIA LÚCIA; SANTOS, TERESA CRISTINA RODRIGUES DOS. Métodos de extração e determinação do herbicida Glifosato: breve revisão. **Revista Química Nova**, Vol. 25, nº 3, São Paulo – SP, maio, 2002.

BURLIBASA, L. GAVRILA, L. Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity. **Applied Ecology and Environmental Research**, 2011.

CABAGNA, M. C.; LAJMANOVICH, R. C.; PELTZER, P. M. Induction of micronuclei in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the pyrethroid insecticide cypermethrin. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 88, p. 729–737, 2006.

CALEGARI, L.; MARTINS, S. V.; GLERIANI, J. M.; SILVA, E.; BUSATO, L. C. Análise da dinâmica de fragmentos florestais no município de Carandaí, MG, para fins de restauração florestal. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 5, p. 871-880, 2010.

CAMPANA, M. A.; PANZERI, A. M.; MORENO V.J.; DULOUT, F. N. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 1, 2003.

CANDIOTI, V. J.; NATALE, G. S.; SOLONESKI S.; RONCO, A. E.; LARRAMENDY, M. L. Sublethal and lethal effects on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida. **Chemosphere**, v. 78, p. 249–255, 2010.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological Indicator of Chemical Contaminant Effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.**, v. 47, p. 2123-2136, 1990.

CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Resolução n.º 1.000**, de 11 de maio de 2012. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências.

Companhia Nacional do Abastecimento – CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira 2016-2017**, v. 4, n. 9, 2017.

CORREIA, F. V.; MOREIRA, J. C. Effects of glyphosate and 2,4-D on earthworms (*Eisenia foetida*) in laboratory tests. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 85, n. 3, p. 264-268, 2010.

COSTA, R. N.; NOMURA, F. Measuring the impacts of Roundup Original® on fluctuating asymmetry and mortality in a Neotropical tadpole. **Hydrobiologia**, v. 765, p. 85–96, 2016.

COSTA, R.N.; NOMURA, F. Agropastoral activities increase fluctuating asymmetry in tadpoles of two neotropical anuran species. **Ecological Society of Australia**, 2017.

COUTO P. Análise fatorial aplicada a métricas da paisagem definidas em FRAGSTATS. **Investigação Operacional**, v. 24, p. 109-137, 2004.

CRNOBRNJA-ISAILOVIC, J.; ALEKSIC, I.; BEJAKOVIC, D. Fluctuating asymmetry in *Podarcis muralis* populations from Southern Montenegro: detection of environmental stress in insular populations. **Amphibia-Reptilia**, v. 26, p. 149-158, 2005.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plants effluents. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 264-271, 2005.

DALLEGRAVE, E; MANTESE, F. D.; COELHO, R.S.; PEREIRA, J. D.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistarrats. **Toxicology Letters**, v. 142, p. 45-52, 2003.

DELGADO-ACEVEDO, J., RESTREPO, C. The contribution of habitat loss to changes in body size, allometry, and bilateral asymmetry in two Eleutherodactylus frogs from Puerto Rico. **Conservation Biology**, v. 22, p. 773–782, 2008

DILL, L.M. 'Handedness' in the pacific tree frog (*Hyla regilla*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 55, p.1926–1929, 1977.

DIAS, B. F. de S. Cerrados: Uma Caracterização o. In: DIAS B. F. de S, ed. **Alternativas de Desenvolvimento dos Cerrados: Manejo e Conservação dos Recursos Naturais Renováveis**. Brasília, DF, Brazil: FUNATURA, 1992.

DOBSON, F. S.; MICHENER, G. R. Maternal traits and reproduction in Richardson's ground squirrels. **Ecology**, v. 76, p. 851–862, 1995.

EISEMBERG C. C. & BERTOLUCI J. Fluctuating asymmetry in populations of the South American frog *Physalaemus cuvieri* (Leptodactylidae) in areas with different degrees of disturbance. **Journal of Natural History**, v. 50, p. 23–24, 2016.

ETEROVICK, P.C.; BAR, L. F. F.; SOUZA, J. B.; CASTRO, J. F. M.; LEITE, F. S.F.; ALFORD, R. A. Testing the relationship between human occupancy in the landscape and tadpole developmental stress. **Plos One**, 2015.

ETEROVICK, P. C.; SLOSS, B. L.; SCALZO, J. A. M.; ALFORD, R. A. Isolated frogs in a crowded world: Effects of human-caused habitat loss on frog heterozygosity and fluctuating asymmetry. **Biological Conservation**, v. 195, p. 52–59, 2016.

FONSECA, C. E. L.; RIBEIRO, J. F.; SOUZA, C. C.; REZENDE, R. P.; BALBINO, V. K. Recuperação da vegetação de Matas de Galeria: estudos de caso no Distrito Federal e Entorno. In: RIBEIRO, J. F., FONSECA, C. E. L., SOUSA-SILVA, J. C. (Eds.) **Cerrado: caracterização e recuperação de Matas de Galeria**. Embrapa Cerrados, p. 815-870, 2001.

FORMAN, R. T. T.; GODRON, M. **Landscape Ecology**. USA: J. Wiley, 1986.

FUNK, W. C., GREENE, A. E, CORN, P. S.; ALLENDORF, F. W. High dispersal in a frog species suggests that it is vulnerable to habitat fragmentation. **Biology Letters**, v. 1, n. 1, p.1-4, 2005.

FURLEY, P.A.; RATTER, J. A. Soil resources and plant communities of the Central Brazilian cerrado and their development. **Journal of Biogeography**, v. 15, p.97–108, 1988.

FRANÇOSO, R. D.; BRANDÃO, R. B.; NOGUEIRA, C. C.; SALMONA, Y. B.; A, MACHADO, R. B.; COLLI, G. R. Habitat loss and the effectiveness of protected areas in the Cerrado Biodiversity Hotspot. **Natureza & Conservação**, v. 13, n. 1, p. 35-40, 2015.

EITEN, G. The cerrado vegetation of Brazil. **Botanical Review**, [S.l.], v. 38, p. 139-148, 1972.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 34, p. 487-515, 2003.

FROST, D. **Amphibian species of the world: an online reference**. Versão 5.3. New York: American Museum of Natural History, 2009. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>> Acesso em 01 de Outubro de 2015.

GASNIER, C; DUMONT, C; BENACHOUR, N; CLAIR, E; CHAGNON, M. C.; SÉRALINI, G. E. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, v. 262, n. 3, p. 184-191, 2009.

GBUREK, W.J.; SHARPLEY, A.N. Hydrologic controls on phosphorus loss from upland agricultural watersheds. **Journal of Environmental Quality**, n. 27, p. 267-277, 1997.

GEHRING, T.M. & SWIHART, R.K. 2003. Body size, niche breadth, and ecologically scaled responses to habitat fragmentation: mammalian predators in an agricultural landscape. **Biological Conservation**. 109:283-295.

GHESTI, L. V. Programa de assentamento dirigido do Distrito Federal- PAD/DF. **Uma realidade que superou o sonho**. Brasília, 2009. Disponível em: <http://coopadf.com.br/o-pad-df> Acesso em 30 de setembro de 2015.

GONÇALVES, M. W.; OLIVIEIRA, H.H.P.; CARVALHO, W.F.; SILVA, D.M.; NOMURA, F.; BASTOS, R.P.; CRUZ, A.D. Análises Mutagênicas de Anuros em Áreas de Mineração de Níquel. **Estudos**, v. 339, n. 2, p. 115-121, 2012.

GONÇALVES, M. W.; CARVALHO, W. F.; DA CRUZ, A. D. Contrasting patterns of DNA damage by the comet assay in four species of the Hylidae family (Amphibia-Anura). **Research Journal of Biological Sciences**, v. 3, p. 1–7, 2013.

GONÇALVES, M. W.; VIEIRA, T. B.; MACIEL, N. M.; CARVALHO, W. F.; LIMA, L. S. F.;

GAMBALE, P. G.; CRUZ, A. D.; NOMURA, F.; BASTOS, R. P.; SILVA, D. M., **Detecting genomic damages in the frog *Dendropsophus minutus* preserved versus perturbed áreas**. Environmental Science and Pollution Research, 2014.

GOULART, M. D.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da Faculdade de Pará de Minas**, n. 1. 2003.

GOVINDARAJULU P. Literature review of impacts of Glyphosate herbicide on amphibians: What risks can the silvicultural use of this herbicide pose for amphibians in B.C.? **Ministry of Environment**, Victoria, BC. Wildlife Report No R-28, 2008.

GRANT, P. R. Convergent and divergent character displacement. **Biological journal of the Linnean Society**, v.4, n.1, p.39-68, 1972.

GREEN, A. J. Mass/length residuals: measures of body condition or generators of spurious results? **Ecology**, v. 82, n. 5, p. 1473–1483, 2001.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução**. Editora da Universidade de Brasília, 392 p., 2005.

GRISOLIA, C. K.; RIVERO-WENDT, C. L. G.; BARBOSA, F. D. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 138–143, 2009.

GRUBBS, F. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Technometrics**, v.11, p. 1-21, 1969.

GULVE, P. S. Distribution and extinction patterns within a northern metapopulation of the pool frog *Rana lessonae*. **Ecology**, Durham, v.29, n.1, p. 11-12, 1998

HADDAD, C. F. B.; SAZIMA, I. Anfíbios anuros da Serra do Japi. In: MORELLATO, (L.C.P. (ed.) **História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil** Editora da Unicamp/ Fapesp, Campinas, p.188-211, 1992.

HADDAD, C. F. B.; PRADO, C. P. A. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience** v. 55, n. p.:207-217, 2005.

HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F.; PRADO, C. P. A.; LOEBMANN, D.; GASPARINI, J. L.; SAZIMA, I. **Guia dos anfíbios da Mata Atlântica: diversidade e biologia**. São Paulo, Anolisbooks, 2013, 544p.

HAYES, T. B.; CASE, P.; CHUI, S. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian 18 declines: are we underestimating the impact? **Environmental Health Perspect**, n. 114, 2006.

HEDDLE, J.A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J. T.; NEWELL, G. W.; SALAMOVE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program **Mutation Research**. v. 123, n. 1, p. 61–188, 1983.

HECNAR S. J. & MCCLOSKEY R. T. Changes in the Composition of a Ranid Frog Community Following Bullfrog Extinction **The American Midland Naturalist**, v. 137, n. 1, p. 145-150, 1997.

HOFFMANN, A. A.; PARSONS, P. A. **Evolutionary Genetics and Environmental Stress**. Oxford University Press, Oxford, 1991.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático de Produção Agrícola**. 2005. Disponível Em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>
Acesso em 18 de abril de 2016.

União Internacional de Química Pura e Aplicada - IUPAC. **Pesticide properties** database, 2007. Acesso em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/> Acesso em 18/03/2017.

IZECKSOHN, E. & CARVALHO-E-SILVA, S.P. Anfíbios da Floresta Nacional Mário Xavier, município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil (Amphibia: Anura). **Contribuições Avulsas Sobre a História Natural do Brasil, Série Zoologia**, v. 39, p.1-3, 2001.

JAKOB, E. M.; MARSHALL, S. D.; UETZ, G. W. Estimating fitness: a comparison of body condition indices. **Oikos**, v. 77, n. 1, p. 61–67, 1996.

JI, X.; QIU, Q.-B.; DIONG, C.-H. **Influence of incubation temperature on hatchling success, energy expenditure for embryonic development, and size and morphology of hatchlings in the Oriental Garden Lizard, *Calotes versicolor* (Agamidae)**. Journal of Experimental Biology, v. 292, p. 649–659. 2002.

KATS, L. B. & FERRER, R. P. Alien predators and amphibian declines: review of two decades of science and transition to conservation. **Diversity and Distributions**, v. 9, n. 2, p. 99-110, 2003.

KIRK, D. A.; GOSLER, A. G. Body condition varies with migration and competition in migrant and resident South American vultures. **The Auk**, v. 111, n. 4, p. 933-944, 1994.

KITAYSKY, A. S., PIATT, J. F., WINGFIELD, J. C. AND ROMANO, M. The adrenocortical stress- response of black-legged kittwake chicks in relation to dietary restrictions. *Journal of Comparative Physiology B* v. 169, p; 303-310, 1999.

KJOSS, V. A.; LITVAITIS, J. A. Community structure of snakes in a human-dominated landscape. **Biological Conservation**, v. 98, p. 285-292, 2001.

KLINK, C. A., & MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

LANNOO, M; FUNK, C.; GADD, M.; HALLIDAY, T.; MITCHELL, J. Freshwater resources and associated terrestrial landscapes. In: GASCON, C.; COLLINS, J. P.; MOORE, R. D.; LEARY, R. F.; ALLENDORF, F. W. Fluctuating asymmetry as an indicator of stress: implications for conservation biology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 4, p. 214-217, 1989.

LENS, L.; VAN DONUZHNA, L.; KATHIRIA, P.; KOVALCHUK, O. Micronuclei in genotoxicity assessment: From genetics to epigenetics and beyond. **Frontiers in Genetics**, v. 4, n. JUL, p. 1–17, 2002.

LINS, A. C. R. **Condição corporal e assimetria flutuante de lagartos em áreas de Cerrado contínuas e fragmentadas na UHE Serra da Mesa, Minaçu, GO**. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, 2013.

LIJTEROFF, R., LIMA, L., PRIERI, B. **Uso de líquenes como bioindicadores de contaminación atmosférica em la ciudad de San Luis, Argentina..** v.3. n.1, p.3-6, 2008. Disponível em:http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018849992009000200006&lang=pt Acesso em 18 de dezembro de 2016.

LIU, W. Y.; WANG, C.Y.; WANG, T.S. Impacts of the herbicide butachlor on the larvae of a paddy field breeding frog (*Fejervarya limnocharis*) in subtropical Taiwan. **Ecotoxicology**, v. 20p. 377–384, 2011.

LOPES, A. S.; COX, F. R. Cerrado vegetation in Brazil: an edaphic gradient. **Agronomical Journal**, v. 69, p. 828–831, 1977.

LOURENÇO C, LIMA B. Evolução do agronegócio brasileiro, desafios e perspectivas. **Observatório Econômico. Latino-americano**, 2009. Disponível em: <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/br/09/clbl.htm> Acesso em 18 de abril de 2016.

LUZHNA, L.; KATHIRIA, P.; KOVALCHUK, O. Micronuclei in genotoxicity assessment: From genetics to epigenetics and beyond. **Frontiers in Genetics**, v. 4, n. JUL, p. 1–17, 2013.

McGARIGAL, K. & MARKS, B.J FRAGSTATS: spatial pattern analysis program for quantifying landscape structure. General Technical Report PNW-GTR-351, USDA Forest Service, **Pacific Northwest Research Station**, Portland, 1995.

McGARIGAL, K., CUSHMAN, S. A.; NEEL, M. C.; ENE, E. **Fragstats: Spatial pattern analysis program for categorical maps - version 3.3**. Computer software program produced by the authors at the University of Massachusetts, Amherst, 2002

McGEOCH, M. A. The selection, testing and application of terrestrial insects as bioindicators. **Biology Review**, v.73, p.181-201, 1998

MARKOW, T. A. Evolutionary ecology and developmental instability. **Annual Review of Entomology**, v. 40, p. 105–120, 1995.

MARSH, D. M.; PEARMAN, P. B. Effects of habitat fragmentation on the abundance of two species of Leptodactylidae frogs in the Andean montane forest. **Conservation Biology**, v.11, p.1323– 1328, 1997.

MATHER, K. Genetical control of stability in development. **Heredity**, v. 7, p. 297-336, 1953.

MAZEROLLE, M. J. Amphibian activity, movement patterns, and body size in fragmented peat bogs. **Journal of Herpetology** v. 35, p.13–20, 2001.

MYERS, N. R. A.; MITTERMEIER, C. G.; MITTERMEIER, G. A. B. da FONSECA; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

METZGER, J. P. Estrutura da paisagem: o uso adequado de métricas. *In*: Cullen JR., L., Rudran, R. & Valladares-Pádua, C. (eds). **Métodos de Estudos em Biologia da Conservação & Manejo da Vida Silvestre**. Editora UFPR. Curitiba. pp. 423-54, 2006

METZGER, J. P.; FONSECA, M. A.; OLIVEIRA FILHO, F. J. B.; MARTENSEN, A. C. O uso de modelos em ecologia das paisagens. **Revista Megadiversidade**, São Paulo, v.3, n. 1-2, 2007.

MOREIRA J. C.; PERES, F.; SIMÕES, A. C.; PIGNATI, W. A.; DORES, E. C.; VIEIRA, S. N.; STRÜSSMANN, C.; MOTT, T. Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do estado do Mato Grosso. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, p.1557–1568, 2012.

MOURA-LEITE, J. C.; BÉRNIL, R; MORATO, S. A. Método para caracterização da herpetofauna em estudos ambientais. *In*: **MAIA – Manual para avaliação de impactos ambientais. Programa de Impactos Ambientais de Barragens – PIAB**, 2º ed, p 1-5, 1993.

MUNIZ, K. P. R.; GIARETTA, A. A.; SILVA, W. R.; FACURE, K. G. Auto-ecologia de *Hypsiboas albopunctatus* (Anura, Hylidae) em área de Cerrado no sudeste do Brasil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 98, n. 2 Porto Alegre, 2008.

NECKEL-OLIVEIRA, S., AND C. GASCON. 2006. Abundance, body size and movement patterns of a tropical treefrog in continuous and fragmented forests in the Brazilian Amazon. **Biological Conservation** v. 128, p. 308–315, 2006.

NIKOLOFF, N.; NATALE, G.S.; MARINO, D. Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 100, p. 275–281, 2014.

Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico e Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – OCDE/FAO. **Agricultura Brasileira: Perspectivas e Desafios**, 2015.

PALMER, A. R. Fluctuating asymmetry analyses: A primer. *In*: Markow, T. A. (Ed.). **Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications**. Kluwer, Dordrecht, Netherlands, p. 335–364, 1994.

PALMER, A.R.; STROBECK, C. **Fluctuating Asymmetry Analyses Revisited**. *In*: **POLAK, M. Developmental Instability (DI): Causes and Consequences**. Oxford: Oxford University Press, p. 279-319, 2003.

PALMER, A.R.; STROBECK, C. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 17, n. 1986, p. 391–421, 1986.

- PARSONS, P. A. Fluctuating asymmetry: a biological monitor of environmental and genomic stress. **Heredity**, v. 68, p. 361-364, 1992.
- PECHMANN, J. H. K.; WILBUR, H. M. Putting Declining Amphibian Populations in Perspective: Natural Fluctuations and Human Impacts **Herpetologica**, v. 50, n. 1, p. 65-84, 1994.
- PEIG, J, GREEN, A. J. New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. **Oikos**, v. 118, p.1883–1891, 2009.
- PELTZER, P.M.; LAJMANOVICH, R.C.; SÁNCHEZ-HERNANDEZ, J.C. Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.70, p.185–97, 2008.
- KARIN S. PFENNIG DAVID W. PFENNIG Character displacement: ecological and reproductive responses to a common evolutionary problem **The Quarterly Review of Biology**, v. 84, n.3, p. 253–276, 2009.
- PESSOA, M. C. P. Y.; GOMES, M. A. F.; SCRAMIN, S.; SILVA, A. S.; GUSSAKOV, K. C. Vulnerabilidade natural das grandes bacias hidrográficas brasileiras à tendência de contaminação de água por agrotóxicos em função dos tipos de solos predominantes. **Pesticidas: ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 16. 2006.
- PHILLIPS, D. H & ARLT, V. M. **Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. Intitute of Cancer Research**, United Kingdom, 2009.
- PIANKA, E. R. & VITT, L. J. **Lizards: Windows to the Evolution of Diversity**. Berkley: University of California Press, 2003.
- RABINOWITZ, P.M.; GORDON, Z.; HOLMES, R. Animals as sentinels of human environmental health hazards: an evidence-based analysis. **Ecohealth**, v. 2, p. 26–37, 2005.
- RATTER, J. A.; RIVEIRO, J. F.; BRIDGEWATER S. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, p. 223–230, 1997.
- READING, C. J.; LUISELLI, M. L.; AKANI, G.C.; BONNET, X., AMORI, G. J. M. BALLOUARD; FLIPPI, NAULLEAU, G.; PEARSON, D.; RUGEIRO, L. Are snake populations in widespread decline? **Biology Letters**, v. 6, p. 777-780, 2010.

- RIBEIRO, R & MARINHO-FILHO, J. Estrutura da comunidade de pequenos mamíferos (Mammalia, Rodentia) da Estação Ecológica de Águas Emendadas, Planaltina, Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de zoologia**, n. 22, v. 4, 9p, 2005.
- RIBEIRO, J. F; WALTER, B. M. T. As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. In.: SANO, S. M; ALMEIDA, S. P; RIBEIRO, J. F. **Ecologia e flora**. Brasília: EMBRAPA, 2008. v. 1, p. 152-212.
- RICKLEFS, R. E.; COCHRAN, D. E PIANKA, E. R. A morphological analysis of the structure of communities of lizards in desert habitats. **Ecology** v. 62, n. 6, p.1474-1483, 1981.
- RICKLEFS, R.E. **A Economia da Natureza**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- RIVERO, C. L. G. **Perfil da frequência de micronúcleos e de danos no DNA de diferentes espécies de peixes do Lago Paranoá**. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, 2007.
- RISSER, P. G.; KARR, J. R.; FORMAN, R. T. T. Landscape ecology, directions and approaches. **Illinois Natural History Surveys Special Publications**, n.2, 1984.
- RIITTERS, K. H.; O'NEILL, R.V.; HUNSAKER, C. T.; WICKHAM, J. D.; YANKEE, D.H.; TIMMINS, S.P.; JONES, K. B.; JACKSON, B. L. **A factor analysis of landscape pattern and structure metrics**. Landscape Ecology, v. 10, n. 1, p. 23-40, 1995.
- RODRIGUES, F. A. C.; WEBER, O. L. S.; DORES, E. F. G. C.; KLATAU-GUIMARÃES, M. N.; TIDON, R.; GRISÓLIA, C. K. Ecogenotoxicologia dos agrotóxicos: avaliação comparativa entre ecossistema agrícola e área de proteção ambiental. **Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, Curitiba, v. 15, p. 73-84, 2005.
- ROUSE, J.D.; BISHOP, C.A.; STRUGER, J. Nitrogen Pollution: An Assessment of Its Threat to Amphibian Survival. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 10, 803p, 1999.
- RUSSO, C.; ROCCO, L.; MORESCALCHI, M.A.; STINGO, V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 168-174, 2004.

SANTORO, G. R. C. C.; BRANDÃO, R. A. Reproductive modes, habitat use and richness of anurans from Chapada dos Veadeiros region, Goiás, Brazil. **North-Western Journal of Zoology**, v. 10, p. 365–373, 2014.

SARRE, S.; DEARN, J. M. Morphological Variation and Fluctuating Asymmetry Among Insular Populations of the Sleepy Lizard, *Trachydosaurus rugosus* Gray (Squamata, Scincidae). **Australian Journal of Zoology**, v. 39, n. 1, p. 91-104, 1991.

SARRE, S., DEARN, J. M., & GEORGES, A. The application of fluctuating asymmetry in the monitoring of animal populations. **Pacific Conservation Biology**, v. 1, n. 2, p. 118-122, 1994.

SARRE, S. Habitat fragmentation promotes fluctuating asymmetry but not morphological divergence in two geckos. **Researches on Population Ecology**, v. 38, n. 1, p. 57, 1996.

SCHULTE-HOSTEDDE, A. I.; ZINNER, B.; MILLAR, J. S.; HICKLING, G. J. Restitution of mass–size residuals: validating body condition indices. **Ecology**, v. 86, n.1, p. 155–163, 2005.

SEDUMA – Secretaria de Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. **Águas Emendadas**. Brasília, 542 p, 2008.

SEGALLA, M. V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GRANT, T.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. A.; BERNECK, B.V.M.; LANGONE, J.A. Brazilian amphibians: List of species. **Herpetologia Brasileira**, v. 5, p.34-46, 2016.

SERRANO-GARCIA L, MONTERO-MONTOYA R. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 38, n. 1, p. 38–45, 2001.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, p. 591-611, 1965.

SHINE, R.; LEMASTER, M. P.; MOORE, I. T.; OLSSON, M. M.; MASON, R. T. Bumpus in the snake den: effects of sex, size, and body condition on mortality of red-sided garter snakes. **Evolution**, v. 55, n. 3, p. 598–604, 2001.

SHINE, R.; MADSEN, T. Prey abundance and predator reproduction: rats and pythons on a tropical Australian floodplain. **Ecology**, v. 78, n. 4, p. 1078–1086, 1997.

SILVA, D. P.; VITAL, M. V. C.; de MARCO Jr, P. **Assimetria flutuante como ferramenta de bioindicação: os efeitos da cidade de Manaus (AM) sobre *Erythemis peruviana***

(Rambur, 1842) (Insecta: Odonata) junto à bacia do Rio Amazonas. Anais do VIII 522 Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu, Minas Gerais, Brasil, 2007.

SILVANO, D. L. & SEGALLA, M. V. Conservação de anfíbios no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 79-86, 2005.

SRAM, R. J. Effect of Glutathione S-transferase M1 polymorphisms on biomarkers of exposure and effects. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, p.718—720, 1998.

SZTATECSNY, M., SCHABETSBERGER, R. Into thin air: vertical migration, body condition, and quality of terrestrial habitats of alpine common toads, *Bufo bufo*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 83, p. 788-796, 2005

TERBORGH, J. W.; LOPEZ, L.; TELLO, J.; YU, D.; BRUNI, A, R. Transitory states in relaxing ecosystems of land bridge islands. In: LAURENCE, W. F. and BIERREGAARD, Jr. R. O. **Tropical Forest Remnants - Ecology, Management and Conservation of Fragmented Communities**. Chicago: University of Chicago Press, p. 256-273, 1997.

TERRACAP – Companhia Imobiliária de Brasília. **Cartografia e geodésia, novo mapeamento do DF**, 2011. Disponível em: <http://www.terracap.df.gov.br/internet/index.php?sccid=355&sccant=344> . Acesso em 10 de julho de 2015.

TILMAN, D. Global environmental impacts of agricultural expansion: the need for sustainable and efficient practices. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 5995–6000, 1999.

TOLEDO L. F.; BECKER, C. G.; HADDAD, C. F.B.; ZAMUDIO, K. R. Rarity as an indicator of endangerment in neotropical frogs. **Biological Conservation** 179: 54–62, 2014.

TOCHER, M. D.; GASCON, C., ZIMMERMAN, B. L. Fragmentation effects on a central Amazonian frog community: a ten year study. In: LAURANCE, W. F., BIERREGAARD, R. O. (Eds.), **Tropical Forest Remnants: Ecology, Management, and Conservation of Fragmented Communities**. University of Chicago Press, Chicago, p124-137, 1997.

Unesco. **Vegetação do Distrito Federal: tempo e espaço – Uma avaliação multitemporal da perda de cobertura vegetal no DF e da diversidade florística da Reserva da Biosfera do Cerrado – Fase I**. 2ª ed., Brasília, 2002

- UNRINE, J. M.; HOPKINS, W. A.; ROMANEK, C. S.; JACKSON, B. P. Bioaccumulation of trace elements in omnivorous amphibian larvae: implications for amphibian health and contaminant transport. **Environmental Pollution**, 2007.
- VALDUJO, P.H.; SILVANO, D.L.; COLLI, G.; MARTINS, M. Anuran species composition and distribution patterns in Brazilian Cerrado, a Neotropical hotspot. **South American Journal of Herpetology**, v. 7, p. 63-78, 2012.
- VITT, L. J., J. P. CALDWELL, H. M. WILBUR, AND D. C. SMITH. Amphibians as harbingers of decay. **BioScience**, v. 40, p.418, 1990
- VOLOTÃO, C. F. S. **Trabalho de análise espacial – Métricas do Fragstats**. INPE, São José dos Campo, 1998.
- WADDINGTON, C. H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. **Nature**, v. 150, p. 563-565, 1942.
- WAUTERS, L. A.; DHONDT, A. A. Lifetime reproductive success and its correlates in female Eurasian red squirrels. **Oikos**, v. 72, p. 402–410, 1995.
- WAUTERS, L. A.; DHONDT, A. A.; KNOTHE, H.; PARKIN, D. T. Fluctuating asymmetry and body size as indicators of stress in red squirrel populations in woodland fragments. **Journal of Applied Ecology**, v. 33, n. 4, p. 735-740, 1996.
- WIENS, J. A. WILDLIFE in patchy environments: metapopulations, mosaics and management. In: McCullough, D. R. (ed) **Metapopulations and wildlife conservation**, p. 53-84, 1996.
- WIKELSKI, M.; TRILLMICH, F. Body size and sexual size dimorphism in marine iguanas fluctuate as a result of opposing natural and sexual selection: an island comparison. **Evolution**, v. 51, n. 3, p. 922–936, 1997.
- YIN, X.; ZHU, G.; LI, X. B.; LIU, S. Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian *Chinese toad* (Amphibian: Anura) by Comet assay and Micronucleus test. **Mutation Research**, v. 680 p. 2–6, 2009.
- ZAKHAROV, V. M. Population phenogenetics: Analysis of developmental stability in natural populations. **Acta Zoologica Fennica**, v. 191, p. 7-30, 1992.
- ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. Nova Jersey: Prentice Hall, 5ed, 2010.
- ZEE-DF – **Zoneamento ecológico e econômico do Distrito Federal**, 2009.