

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Zoologia

Iasodhara Rodrigues Freire

**ASSIMETRIA FLUTUANTE E ANOMALIAS COMO FERRAMENTAS DE
MEDIÇÃO DE IMPACTOS AMBIENTAIS EM GIRINOS DE *Pithecopus ayeaye*
LUTZ, 1966 (AMPHIBIA, ANURA: PHYLLOMEDUSIDAE)**

Belo Horizonte

2022

Iasodhara Rodrigues Freire

**ASSIMETRIA FLUTUANTE E ANOMALIAS COMO FERRAMENTAS DE
MEDIÇÃO DE IMPACTOS AMBIENTAIS EM GIRINOS DE *Pithecopus ayeaye*
LUTZ, 1966 (AMPHIBIA, ANURA: PHYLLOMEDUSIDAE)**

Versão Final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Leite Pezzuti

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Félix de Magalhães

Belo Horizonte

2022

043

Freire, Iasodhara Rodrigues.

Assimetria flutuante e anomalias como ferramentas de medição de impactos ambientais em girinos de *Pithecopus ayeaye* Lutz, 1966 (Amphibia, Anura: Phyllomedusidae) [manuscrito] / Iasodhara Rodrigues Freire. – 2022.

85 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Leite Pezzuti. Coorientador: Prof. Dr. Rafael Félix de Magalhães.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

1. Zoologia. 2. Impacto Ambiental. 3. Biomarcadores Ambientais. 4. Anfíbios /anormalidades. 5. Larva. I. Pezzuti, Tiago Leite. II. Magalhães, Rafael Félix de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 591



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

IASODHARA RODRIGUES FREIRE

Ao vigésimo oitavo dia do mês de outubro do ano de dois mil e vinte e dois, às nove horas, ocorreu a defesa de Mestrado da Pós-Graduação em Zoologia, de autoria da Mestranda Iasodhara Rodrigues Freire intitulada: **“Assimetria flutuante e anomalias como ferramentas de medição de impactos ambientais em girinos de *Pithecopus ayeaye* Lutz, 1966 (Amphibia, Anura: Phyllomedusidae)”**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Tiago Leite Pezzuti, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra para a candidata para apresentação de seu trabalho.

Esteve presente a Banca Examinadora composta pelos membros: Paula Cabral Eterovick, Renan Nunes Costa, e demais convidados. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata.

Após a arguição, apenas os Srs. Examinadores permaneceram na sala para avaliação e deliberação acerca do resultado final, a saber: o trabalho foi **APROVADO SEM ALTERAÇÕES**.

Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 28 de outubro de 2022

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Renan Nunes Costa, Usuário Externo**, em 10/11/2022, às 14:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543](#), de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Paula Cabral Eterovick, Usuário Externo**, em 15/11/2022, às 06:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543](#), de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Tiago Leite Pezzuti, Usuário Externo**, em 16/11/2022, às 09:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1888213** e o código CRC **5C3CAECE**.

Referência: Processo nº 23072.229818/2021-05

SEI nº 1888213



Dedico esta dissertação à minha mãe. Por todo carinho, amor e incentivo. Por ter sido meu maior exemplo de empatia e sororidade na vida, sem ao menos saber o que essas palavras significam. Por me mostrar que ações valem muito mais do que palavras. Por me ensinar a nunca desistir, por mais difícil que seja a caminhada. Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Tiago Pezzuti pela orientação e oportunidade de executar este projeto. Obrigada pela confiança e por todo carinho. Agradeço, também, ao Prof. Rafael Magalhães, por ter topado esta aventura de última hora. Você foi uma luz no fim do túnel. Obrigada pela paciência e prestatividade.

Agradeço à minha mãe, por tudo. Seu apoio foi essencial durante toda a minha vida. Você sempre foi meu exemplo de garra, lutando para que eu alcançasse os meus objetivos. Sem você, este sonho não seria possível.

A todos os amigos que a biologia me deu e que contribuíram com a minha formação. Ao Prof. Felipe Leite, por ter me proporcionado a oportunidade de trabalhar com herpetologia no Sagarana Lab. À Sophia Pussieldi, Camila Lopes e Kamilla Castelan, pela companhia e amizade durante a minha primeira experiência na herpetologia. Saudades dos nossos campos, em que fugíamos dos Neloires na universidade. Às “sagaranetes”, Ju (Julia Palhares), Xu (Juliana Borges) e Vih (Vitória Peixoto) pelos melhores momentos no laboratório e pelos melhores rolês da vida. Com vocês, tudo foi mais leve e divertido. Carrego vocês no meu coração sempre. Ao Zé Perereca (Gustavo Martins) pela amizade e apoio em campo, que foi muito importante para mim. Ao Octávio Lemos, um artista incrível e amigo maravilhoso. Por todo apoio, conversas e companhia nos campos da vida. Ao Renanzinho (Renan Bicalho), pela amizade e pelos melhores campos no Parque Estadual do Rio Doce. Pelas boas horas de trabalho em laboratório ao som de Adele, Red Hot e Rihanna versão forró. Saudades enormes de você, dos seus gostos musicais e de acordar o Hans de madrugada fazendo hambúrguer. Ao Hans Thomassen, por ter sido a pessoa mais importante na minha vida acadêmica e profissional. Agradeço imensamente por ter acreditado em mim sempre. Por todas as oportunidades que me proporcionou e que com toda certeza do mundo, foram as melhores. Sem o seu apoio eu nem estaria mais na herpetologia. Obrigada de todo o meu coração. À Vivi (Vivian Araújo) por ser a amiga mais meiga e encantadora que já conheci. Um dos maiores exemplos de mulher, mãe, cientista e feminista que tenho. À Gio (Giovanna), pela amizade e pelas nossas conversas entre as fotografias dos girinos. Sua companhia tornou minhas tardes no laboratório menos solitárias e mais agradáveis durante a pandemia. Às “girimoras” pela grande ajuda no meu projeto. À Carol (Caroline Oswald) e ao Igão (Igor Rodrigues) pela amizade e por me ajudarem em campo, contribuindo para a ampliação de amostragem do meu projeto. À Rachel Montesinos, pela

colaboração durante o comitê de acompanhamento. Ao Marco Aurélio Pacheco e ao André Pinheiro, pela amizade, pelos momentos divertidos dentro e fora de campo, e por me ajudarem com as análises de paisagem. Agradeço também a todos os amigos que foram importantes na minha formação, mas que não citei aqui.

Ao Laboratório de Herpetologia da UFMG, pelo apoio e estrutura. Ao Laboratório de Química Ambiental da UFSJ, principalmente a Fernanda e a Fátima, pela colaboração para as análises de qualidade de água. À Maria Eduarda Coelho, pela ajuda com o mapa de pontos de amostragem. À Nubia, pela ajuda durante as análises estatísticas do meu mestrado. Ao Laboratório de Biodiversidade do IF – Sul de Minas, pela colaboração em campo. A todos que colaboraram com o projeto “Conservação de *Pithecopus ayeaye*, espécies relacionadas e seus ecossistemas”. Aos colegas de turma e professores, pelas discussões e aprendizados proporcionados durante às aulas remotas. Ao grupo Mulheres na Ciência – ICB/UFMG pela rede de apoio, conversas e projetos desenvolvidos. À Universidade Federal de Minas Gerais, ao Instituto de Ciências Biológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia por permitir a realização do meu projeto. Ao CNPQ pela bolsa de mestrado concedida.

Resumo

A instabilidade do desenvolvimento (ID) consiste na incapacidade de um organismo seguir sua trajetória predeterminada de desenvolvimento e pode ser percebida através de alterações fenotípicas decorrentes de perturbações aleatórias. Informações sobre a ID podem ser obtidas através da análise de assimetria flutuante (AF) — diferenças entre os lados direito e esquerdo de estruturas morfológicas bilaterais, causadas por processos aleatórios durante o desenvolvimento. Os níveis de AF podem aumentar à medida em que as condições ambientais se tornam desfavoráveis. Além disso, a análise de anomalias nos organismos também pode fornecer informações sobre a qualidade do ambiente nos quais se desenvolveram, uma vez que podem ter suas taxas aumentadas quando os organismos experienciam fatores estressores. *Pithecopus ayeaye* é uma espécie endêmica de regiões de altitude do sudeste brasileiro, ao longo dos estados de Minas Gerais e São Paulo. A espécie se reproduz principalmente em riachos temporários em matrizes de campos rupestres, que possuem sua conservação ameaçada devido a atividades antrópicas. Considerando as perturbações que incidem sobre o ambiente da espécie, avaliamos como diferentes níveis de qualidade ambiental, representados por parâmetros indicadores de qualidade de água e ocupação humana do ambiente, refletem em diferenças de simetria e presença de anomalias nas larvas. Coletamos girinos e amostras de água de diferentes populações ao longo da área de ocorrência da espécie. Obtivemos a caracterização físico-química das drenagens e índices de uso antrópico do solo. Medimos oito traços morfológicos bilaterais nos indivíduos para a avaliação de AF e anomalias. As correlações entre as variáveis ambientais e os desvios morfológicos foram verificados através de modelos lineares generalizados (GLMs). Fatores ambientais como menor turbidez, alcalinidade e maior distância de áreas preservadas foram correlacionados com maiores níveis de AF nos girinos de *P. ayeaye*. Enquanto isso, temperaturas mais baixas, maior uso antrópico do solo no raio de 500 metros e maior concentração de fósforo total estiveram associados a um maior escore de anomalias. Observamos que populações de ambientes mais perturbados apresentaram um aumento dos níveis de ambos os desvios morfológicos, proporcionando medidas robustas e complementares de qualidade ambiental. Pelas evidências aqui apresentadas, apontamos *P. ayeaye* como uma possível espécie bioindicadora dos riachos temporários de campos rupestres, que são extremamente importantes para a manutenção da biodiversidade e da segurança hídrica do Cerrado.

Palavras-chave: Instabilidade do Desenvolvimento. Campos Rupestres. Impactos Ambientais. Anfíbios. Girinos. Assimetria Flutuante. Bioindicador.

Abstract

Developmental instability (ID) is the inability of an organism to follow its predetermined developmental trajectory and can be perceived through phenotypic changes resulting from random perturbations. Information on ID can be obtained by analyzing fluctuating asymmetry (AF) — differences between the right and left sides of bilateral morphological structures, caused by random processes during development. AF levels may increase as environmental conditions become unfavorable. In addition, the analysis of anomalies in organisms can also provide information about the quality of the environment in which they developed, since their rates can increase when organisms experience stressors. *Pithecopus ayeaye* is an endemic species of highland regions of southeastern Brazil, along the states of Minas Gerais and São Paulo. The species breeds mainly in temporary streams in *campos rupestres*, whose conservation is threatened due to human activities. Considering the disturbances that affect the species' environment, we evaluated how different levels of environmental quality, represented by indicators of water quality and human occupation of the environment, reflect differences in symmetry and the presence of anomalies in the larvae. We collected tadpoles and water samples from different populations throughout the species' range. We obtained the physicochemical characterization of the drainages and indices of anthropic use of the soil. We measured eight bilateral morphological traits in individuals for the assessment of FA and anomalies. Correlations between environmental variables and morphological deviations were verified using generalized linear models (GLMs). Environmental factors such as lower turbidity, alkalinity and greater distance from preserved areas were correlated with higher levels of FA in *P. ayeaye* tadpoles. Meanwhile, lower temperatures, higher anthropic land use within 500 meters and higher concentration of total phosphorus were associated with a higher anomaly score. We observed that populations from more disturbed environments showed an increase in the levels of both morphological deviations, providing robust and complementary measures of environmental quality. Based on the evidence presented here, we point to *P. ayeaye* as a possible bioindicator species of temporary streams of *campos rupestres*, which are extremely important for the maintenance of biodiversity and water security in the Cerrado.

Keywords: Development Instability. Rupestrian Grasslands. Environmental impacts. Amphibians. Tadpoles. Fluctuating Asymmetry. Bioindicator.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Distribuição de frequência da diferença entre lados correspondente a assimetria direcional (AD). Ao lado temos a ilustração de um coração humano, um órgão que apresenta AD. A linha tracejada no gráfico à esquerda representa o ponto com média zero, que seria esperado em caso de simetria. D = lado direito, E = lado esquerdo, f = frequência das observações..... 22
- Figura 2.** Distribuição de frequência da diferença entre lados correspondente a antissimetria (AT). Ao lado temos machos de caranguejo-violinistas, que apresentam as pinças de um lado ou de outro mais desenvolvidas. A linha tracejada no gráfico à esquerda representa o ponto com média zero, que seria esperado em caso de simetria. D = lado direito, E = lado esquerdo, f = frequência das observações..... 23
- Figura 3.** Distribuição de frequência da diferença entre lados correspondente a assimetria flutuante (AF). Ao lado temos dois anuros, em que um é bilateralmente simétrico e o outro apresenta um pequeno desvio de simetria. A linha tracejada no gráfico à esquerda representa o ponto com média zero, que seria esperado em caso de simetria. D = lado direito, E = lado esquerdo, f = frequência das observações. 24
- Figura 4.** Exemplos de ambientes reprodutivos de *Pithecopus ayeaye* em diferentes locais de ocorrência da espécie. **(A)** São Roque de Minas – MG; **(B)** Araxá – MG; **(C)** São João Batista do Glória – MG; **(D)** São João del-Rei – MG. 28
- Figura 5.** Pontos de coleta de amostras de água e girinos de *Pithecopus ayeaye*..... 29
- Figura 6.** Fórmula utilizada para obtenção do índice de qualidade de água (IQA), em que $\prod$ corresponde ao multiplicatório; q_i é a qualidade da i ésima variável, w_i o peso da i ésima qualidade e o i refere-se ao número de ordem da variável. 30
- Figura 7.** Representação gráfica do uso do solo dos pontos de amostragem de *Pithecopus ayeaye*, utilizando um raio de 500 metros. A cor verde representa ambientes naturais e a amarela, ambientes antropizados..... 32
- Figura 8.** Representação gráfica do uso do solo dos pontos de amostragem de *Pithecopus ayeaye*, utilizando um raio de 1000 metros. A cor verde representa ambientes naturais e a amarela, ambientes antropizados..... 33
- Figura 9.** Disco oral do girino de *Pithecopus ayeaye*..... 35

Figura 10. Medidas das narinas do girino de <i>Pithecopus ayeaye</i>	35
Figura 11. Medidas dorsais do girino de <i>Pithecopus ayeaye</i>	36
Figura 12. Fórmula utilizada para transformar as coordenadas obtidas no TPS Dig em medidas em milímetros.	36
Figura 13. Análises de erro de posicionamento e digitalização de marcos anatômicos do bico córneo de <i>Pithecopus ayeaye</i> , para posterior análise de assimetria flutuante através da morfometria geométrica.....	37
Figura 14. Digitalização dos marcos anatômicos e pontos de curva do bico córneo de <i>Pithecopus ayeaye</i> . A. Digitalização dos pontos das extremidades distais dos processos laterais e pontos de curva sobre o contorno da estrutura. B. Pontos de curva transformados em marcos anatômicos.	38
Figura 15. Indivíduo de <i>Pithecopus ayeaye</i> com: (A) dentículos faltantes em todas as fileiras; (B) dentículos intactos.	40
Figura 16. Indivíduo de <i>Pithecopus ayeaye</i> com: (A) interrupção na fileira de dentículos A1; (B) fileira de dentículos intactas.....	40
Figura 17. Indivíduo de <i>Pithecopus ayeaye</i> com: (A) ausência de queratinização dos dentículos em todas as fileiras; (B) dentículos perfeitamente queratinizados.	40
Figura 18. Indivíduo de <i>Pithecopus ayeaye</i> com: (A) deformação no bico córneo; (B) bico córneo intacto.....	41
Figura 19. Indivíduo de <i>Pithecopus ayeaye</i> com: (A) ausência de queratinização no bico córneo; (B) bico córneo perfeitamente pigmentado.....	41
Figura 20. Indivíduo de <i>Pithecopus ayeaye</i> com: (A) perda dos lábios; (B) lábios superior e inferior intactos.	41
Figura 21. Deformidades dos olhos em vista dorsal: (A) globo ocular esquerdo voltado ligeiramente para cima; (B) globo ocular direito deslocado em sua porção superior, voltado para dentro; (C) globo ocular direito voltado ligeiramente para cima e deslocado totalmente, voltado para dentro.....	42
Figura 22. Testes para avaliação da AF nos traços mensurados de <i>Pithecopus ayeaye</i>	43
Figura 23. Índice de assimetria flutuante corrigido adaptado de Dide & Rivera (2019).....	44

Figura 24. Curva altamente leptocúrtica devido ao grande número de indivíduos simétricos na população, um reflexo do significado biológico da assimetria flutuante.	45
Figura 25. Superimposição de Procrustes do bico córneo de <i>Pithecopus ayeaye</i> . Nesta etapa, removemos os efeitos de escala, posição e orientação da estrutura. Imagem adaptada de Klingenberg (2015).	46
Figura 26. Redução do índice de assimetria flutuante corrigida (AFcor) da distância olho-narina (DON) de <i>Pithecopus ayeaye</i> em relação ao aumento da turbidez dos corpos d'água.	52
Figura 27. Redução do índice composto de assimetria flutuante corrigida (CFAcor) de <i>Pithecopus ayeaye</i> em relação ao aumento da turbidez dos corpos d'água.	53
Figura 28. Aumento do índice de assimetria flutuante corrigida (AFcor) do diâmetro horizontal das narinas (DHN) de <i>Pithecopus ayeaye</i> em relação ao aumento do valor de pH dos corpos d'água.	54
Figura 29. Aumento do índice de assimetria flutuante corrigida (AFcor) do diâmetro do olho (DO) de <i>Pithecopus ayeaye</i> em relação a maior distância dos corpos d'água a áreas preservadas.	55
Figura 30. Redução do score de anomalias de <i>Pithecopus ayeaye</i> em relação ao aumento da temperatura dos corpos d'água.	55
Figura 31. Aumento do score de anomalias de <i>Pithecopus ayeaye</i> em relação a maior uso antrópico do solo no raio de 500 metros.	56
Figura 32. Aumento do escore de anomalias de <i>Pithecopus ayeaye</i> em relação a maior concentração de fósforo total nos corpos d'água.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das anomalias encontradas nos girinos de <i>Pithecopus ayeaye</i> e classificação dos escore. ¹ indica a nomenclatura proposta por Drake et al. (2007), ² Tolledo et al. (2014) e *indicadas em nosso trabalho.	39
Tabela 2. Resultados da <i>two way</i> ANOVA de todos os traços morfológicos mensurados.	48
Tabela 3. Resultados dos pressupostos para as análises de assimetria flutuante: teste t, normalidade e dependência do tamanho e estágio de desenvolvimento ($p < 0.01$, em negrito).	49
Tabela 4. Escore de anomalias de diferentes populações de <i>Pithecopus ayeaye</i>	50
Tabela 5. Modelo linear generalizado (GLM) com o maior peso para cada variável resposta. Neles estão relacionados os efeitos das variáveis ambientais sobre os desvios de desenvolvimento observados em girinos de <i>Pithecopus ayeaye</i>	51
Tabela 6. Resultado da Procrustes ANOVA da variação da forma do bico córneo de <i>Pithecopus ayeaye</i>	57
Tabela S1. Coordenadas geográficas dos pontos de amostragem da área de estudo. ...	78
Tabela S2. Parâmetros e pesos para o cálculo do IQA.....	78
Tabela S3. Parâmetros físico-químicos e índice de qualidade de água (IQA) dos corpos d'água de <i>Pithecopus ayeaye</i> . POP = população; T = temperatura (°C); Turb = turbidez (NTU); OD = concentração de oxigênio dissolvido (mg/L); DBO = demanda bioquímica de oxigênio (mg/L); N = concentração nitrogênio total (mg/L); Colif = concentração de coliformes totais (mg/L); P = concentração de fósforo total (mg/L); SolT = concentração de sólidos totais (mg/L); pH¹ = pH medido em laboratório; pH² = pH medido em campo; IQA = índice de qualidade de água; Clas. IQA = Classificação da qualidade da água segundo os valores de IQA.	79
Tabela S4. Uso do solo no raio de 500 metros ao redor de cada ponto de amostragem.	80
Tabela S5. Uso do solo no raio de 1000 metros ao redor de cada ponto de amostragem.	80
Tabela S6. <i>Outliers</i> detectados e removidos pelo teste de Grubbs. Na primeira etapa, temos os <i>outliers</i> referentes às medições originais dos lados direito e esquerdo. Na segunda etapa, temos os <i>outliers</i> referentes às diferenças entre as médias dos lados.....	81

Tabela S7. Resumo da ocorrência de anomalias nos girinos de *Pithecopus ayeaye*. **DF** = Dentículos Faltantes, **AQD** = Ausência de Queratinização dos Dentículos, **IFD** = Interrupção das Fileiras de Dentículos, **PL** = Perda Total dos Lábios, **ABC** = Quebras, lacunas, perda ou outras deformidades na aresta de corte do bico córneo (Anomalias), **AQBC** = Ausência de Queratinização do Bico Córneo, **PO** = Posição dos Olhos e **AF** = Anomalia no focinho.⁸²

Tabela S8. Resultado da seleção de modelos para cada variável morfológica. Em negrito, temos o melhor modelo. 84

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AD	Assimetria Direcional
AF	Assimetria Flutuante
AFcor	Assimetria Flutuante Corrigida
AICc	Critério de Informação Akaike corrigido
AT	Antissimetria
CCTUFMG	Centro de Coleções Taxonômicas da Universidade Federal de Minas Gerais
CF	Coliformes Fecais
CFA	Coeficiente de Assimetria Flutuante
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DHN	Diâmetro horizontal das narinas
DNF	Distância narina-focinho
DO	Diâmetro do olho
DOF	Distância olho-focinho
DON	Distância olho-narina
DTC	Dentículos
DVN	Diâmetro vertical das narinas
ED	Estabilidade do Desenvolvimento
GLM	Modelo Linear Generalizado
ID	Instabilidade do Desenvolvimento
LTRF	Labial Teeth Row Formulae (Fórmula Oral das Fileiras de Dentículos)
SolT	Sólidos Totais
Turb	Turbidez
VIF	Fatores de Inflação de Variância
wAICc	Peso de Akaike

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1. Área de estudo e coleta de espécimes	27
2.2. Coleta de amostras de água.....	29
2.3. Análise das amostras e obtenção de variáveis quantitativas do ambiente	29
2.4. Análise de paisagem e obtenção dos índices de uso antrópico do solo.....	30
2.5. Análise de assimetria flutuante	34
2.6. Análise de anomalias	38
2.7. Análises estatísticas.....	42
2.7.1. Medidas morfométricas e merísticas.....	42
2.7.2. Morfometria Geométrica.....	45
2.7.3. Correlações entre parâmetros ambientais, desvios de simetria e anomalias.....	46
3. RESULTADOS.....	47
3.1. Parâmetros microambientais, índice de qualidade de água e uso antrópico do solo ...	47
3.2. Assimetria flutuante – Traços morfométricos e merísticos	48
3.3. Anomalias	49
3.4. Correlações entre parâmetros ambientais e desvio de desenvolvimento	50
3.5. Assimetria flutuante – Morfometria geométrica	57
4. DISCUSSÃO.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
APÊNDICE	75
MATERIAL SUPLEMENTAR	7

1. INTRODUÇÃO

A estabilidade do desenvolvimento (ED) consiste na capacidade intrínseca de um organismo em corrigir disfunções e erros que interfiram no processo ontogenético, garantindo assim a expressão predeterminada de seus fenótipos (Palmer & Strobeck 2003; Zakharov et al. 2020). A ED não pode ser medida, uma vez que a expressão de uma forma “ideal” é raramente conhecida (Palmer 1994; Møller & Manning 2003). Contudo, ambos os lados de estruturas bilaterais são considerados réplicas que compartilham o mesmo genótipo e ambiente (Finnerty 2004; Graham et al., 2010), que sob condições adequadas de desenvolvimento, são presumivelmente simétricos e correspondem a uma forma “ideal” (Palmer 1994; Dongen 2006; Benítez et al. 2020).

Em condições desfavoráveis, os distúrbios que incidem sobre o sistema de desenvolvimento agem localmente, acumulando seu efeito em cada lado de forma isolada, resultando na variação de simetria dos indivíduos (Palmer, 1996; Dongen, 2006). Da mesma forma, essas perturbações podem afetar e até mesmo interromper processos durante o desenvolvimento, ocasionando alterações fenotípicas como malformações (Møller & Manning, 2003). Essas variações são tratadas como ruídos que refletem a instabilidade do desenvolvimento (ID) (Zakharov et al., 2020). A ID consiste na inabilidade de um organismo em seguir uma trajetória de desenvolvimento precisa, que pode ser percebida através de alterações fenotípicas decorrentes de perturbações durante o desenvolvimento (Palmer 1994; Markow 1995). Assim, informações sobre a ID podem ser obtidas através da análise da diferença entre os lados de organismos bilaterais e pequenas anomalias, como a perda ou malformação de uma estrutura corporal (Møller & Manning, 2003; Graham et al., 2010).

Animais bilateralmente simétricos apresentam três tipos de assimetria que podem ocorrer conjuntamente em um mesmo traço: assimetria direcional, antissimetria e assimetria flutuante (Valen, 1962). As três assimetrias diferenciam-se basicamente pela distribuição de frequência da diferença entre os lados em uma população, mas também se distinguem por suas propriedades estatísticas e biológicas (Klingenberg, 2015; Benítez et al., 2020).

A assimetria direcional (AD) consiste em um padrão de variação em que um lado de um traço é significativamente diferente do outro e a direcionalidade da assimetria (i.e., lado direito ou esquerdo) geralmente é a mesma nos indivíduos dentro da população estudada (Valen 1962; Palmer 1994). Nesse tipo de assimetria, a distribuição de frequência da diferença entre os lados na população é normal, com a média sendo estatisticamente diferente de zero (Palmer & Strobeck, 2003). A AD é comumente vista em órgãos internos de mamíferos, como o coração, que possui o lado esquerdo maior que o lado direito, ou os pulmões, que apresentam três lobos do lado direito e apenas dois do lado esquerdo (Figura 1; Valen 1962; Klingenberg 2015).

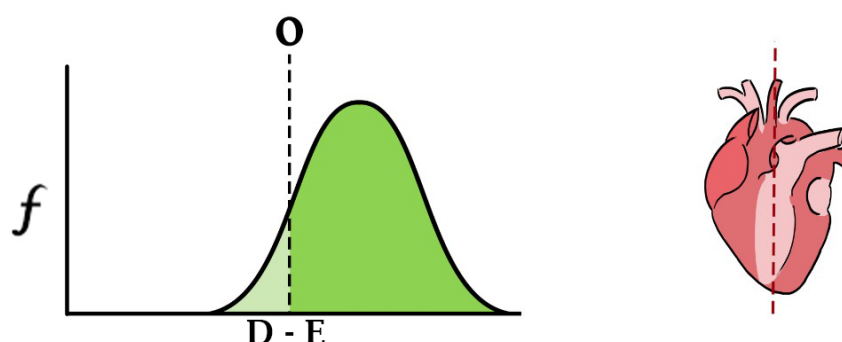


Figura 1. Distribuição de frequência da diferença entre lados correspondente a assimetria direcional (AD). Ao lado temos a ilustração de um coração humano, um órgão que apresenta AD. A linha tracejada no gráfico à esquerda representa o ponto com média zero, que seria esperado em caso de simetria. D = lado direito, E = lado esquerdo, f = frequência das observações.

Na antissimetria (AT), um ou mais lados de um traço se desenvolvem significativamente mais do que outro, mas a magnitude da assimetria na população é igual para os dois lados (Palmer, 1994). Os indivíduos podem ser assimétricos tanto para esquerda, quanto para direita em frequências semelhantes, sendo que organismos perfeitamente simétricos são menos comuns. A AT pode ser observada na população humana, no caso de indivíduos destros e canhotos (Valen, 1962), em que indivíduos ambidestros constituem a menor parte da população. Esse padrão também pode ser visto em caranguejos-violinistas, em que machos apresentam variação no tamanho das pinças, sendo mais desenvolvidas do lado direito ou esquerdo na população (Figura 2; Sanseveriano & Nessimian, 2008). A distribuição de frequência da variação entre lados é

dada sobre uma média zero e é bimodal ou platicúrtica (Valen, 1962; Palmer & Strobeck, 2003).

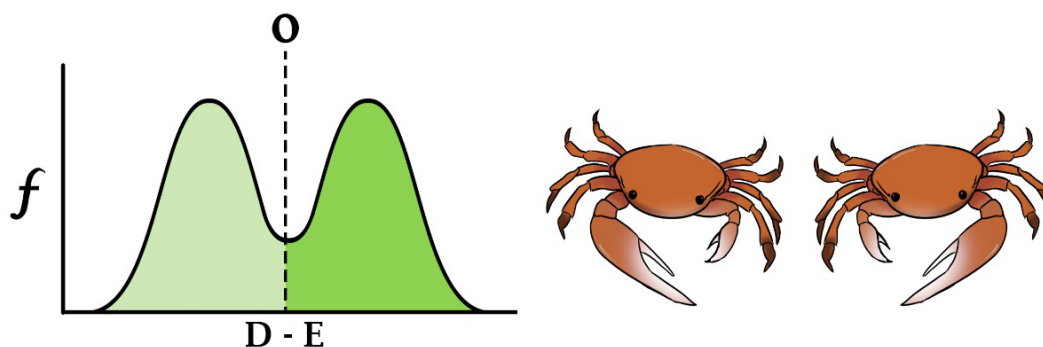


Figura 2. Distribuição de frequência da diferença entre lados correspondente a antissimetria (AT). Ao lado temos machos de caranguejo-violinistas, que apresentam as pinças de um lado ou de outro mais desenvolvidas. A linha tracejada no gráfico à esquerda representa o ponto com média zero, que seria esperado em caso de simetria. D = lado direito, E = lado esquerdo, f = frequência das observações.

Por último, a assimetria flutuante (AF) corresponde uma distribuição normal da variação bilateral, em que a média da população é simétrica, ou seja, a maior parte dos indivíduos possui assimetria próxima a zero (Palmer & Strobeck, 2003; Graham et al., 2010). Os desvios de simetria são direcionados aleatoriamente nos organismos da população e a maioria dos indivíduos possui pouca ou nenhuma assimetria (Figura 3; Møller & Manning, 2003).

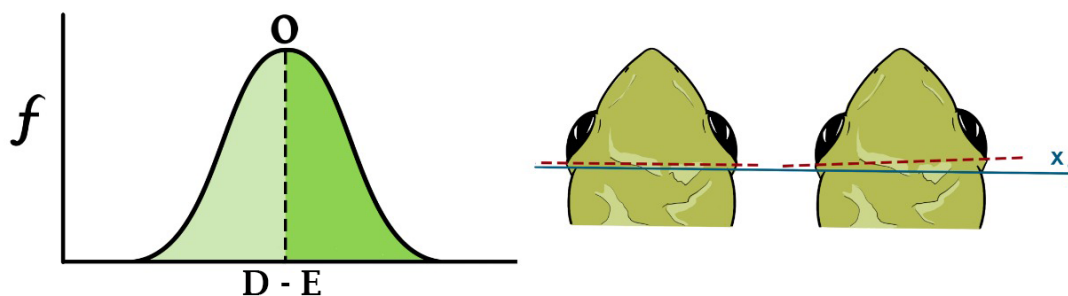


Figura 3. Distribuição de frequência da diferença entre lados correspondente a assimetria flutuante (AF). Ao lado temos dois anuros, em que um é bilateralmente simétrico e o outro apresenta um pequeno desvio de simetria. A linha tracejada no gráfico à esquerda representa o ponto com média zero, que seria esperado em caso de simetria. D = lado direito, E = lado esquerdo, f = frequência das observações.

Enquanto a AD e a AT correspondem a manifestações de fenótipos com programas restritos de desenvolvimento, a AF pode refletir o estresse experienciado durante o mesmo (Palmer 1996; Møller & Manning 2003). A AF corresponde ao balanço entre os ruídos do desenvolvimento e os mecanismos de correção, sendo resultado da incapacidade dos indivíduos se desenvolverem seguindo padrões predeterminados (Palmer & Strobeck, 2003; Zakharov et al., 2020). Por esse motivo, a quantificação/medição da AF é considerada uma ferramenta efetiva para mensurar níveis de ID, uma vez que os níveis de AF podem aumentar à medida em que as condições ambientais se tornam desfavoráveis (i.e., temperaturas elevadas/baixas, qualidade e disposição de recursos, entre outras) (Dongen 2006; Graham et al. 2010; Graham 2021). Ademais, os dados podem ser facilmente obtidos, analisados e proporcionam informações sobre a aptidão individual (Møller & Manning 2003; Dongen 2006).

Alterações de estruturas morfológicas, além do que é comumente esperado dentro de uma variação normal, também têm sido observadas como respostas a fatores ambientais (Henle et al., 2017a). Tais alterações, podem ser classificadas de diversas formas, mas duas definições são mais difundidas: malformações e deformidades. As malformações são alterações permanentes resultantes de imprecisões que ocorreram durante a fase de morfogênese, em processos celulares e/ou de transcrição (i.e., diferenciação, migração e multiplicação de células) (Johnson et al., 2001; Meteyer, 2000). Diferente das malformações, as deformidades não se originam de falhas durante os processos embrionários. Elas constituem modificações decorrentes de fatores mecânicos (i.e., amputação) sobre estruturas morfológicas formadas originalmente em uma configuração correta (Johnson et al., 2001; Meteyer, 2000). Apesar de teoricamente diferenciáveis, na prática é muito difícil distinguir os dois tipos de variações, uma vez que não é possível rastrear as causas das alterações observadas. Para isso, Henle et al. (2017b) recomendam o uso do termo “anomalias” para se referir tanto as deformidades,

quanto as malformações, quando não se tem certeza sobre a origem da alteração que estamos observando.

Segundo Blaustein & Johnson (2003), anomalias são normalmente esperadas a uma taxa de até 5% dos indivíduos para populações de anfíbios, entretanto, taxas entre 15 e 90% têm sido reportadas. O aumento das taxas pode estar relacionado a diversos fatores, como exposição a raios UV (Blaustein & Johnson, 2003; Londero et al., 2019), parasitas (Drake et al., 2007; Johnson & Chase, 2004), atividades agropecuárias (Babini et al., 2016; Borges et al., 2019; Herek et al., 2020) e contaminação química (Pinelli et al., 2019; Slaby et al., 2019). Desta forma, a avaliação dos níveis de anomalia das populações se torna uma ferramenta efetiva de medição de impactos ambientais sobre os organismos.

Os anfíbios são animais sensíveis a alterações ambientais, principalmente àquelas causadas por atividades antrópicas, como perda e fragmentação de habitat (Belasen et al., 2019), contaminação química (Costa & Nomura, 2016; da Silva et al., 2020; Motta et al., 2020), introdução de espécies exóticas (Forti et al., 2017; Vrcibradic et al., 2017), disseminação de doenças infecciosas (Carvalho et al., 2017; Ruggeri et al., 2019; Scheele et al., 2019), dentre outras. Tal sensibilidade contribui para que o grupo seja o mais ameaçado de extinção do mundo, com mais de 3.400 espécies categorizadas em algum nível de ameaça (IUCN 2022). A vulnerabilidade dos anfíbios está relacionada às características da biologia destes animais, como a pele permeável (Toledo & Jared 1993; Rowe et al. 2003; Brischoux et al. 2021), a baixa capacidade de dispersão (Bulger et al. 2003; Bowne & Bowers 2004; Cushman 2006) e ao ciclo de vida, que é bifásico em grande parte das espécies. Neste tipo de ciclo de vida complexo (*sensu* Wilbur 1980), que contempla geralmente uma fase larval aquática e uma fase adulta terrestre, os organismos estão expostos a diferentes perturbações nos seus respectivos ambientes de vida (Rowe et al. 2003; Becker & Loyola 2008).

A qualidade do ambiente, principalmente dos corpos d'água, pode determinar a presença ou a ausência de espécies de anfíbios em um determinado local (Ebrahim et al., 2020) e afetar a ED dos organismos. Indivíduos que experienciam estressores ambientais estão mais propensos a exibirem padrões de assimetria e/ou anomalias. Além disso, estas perturbações podem levar as populações ao declínio e alterar sua estrutura e dinâmica ao longo do tempo (Møller, 1997; Sanseveriano & Nessimian, 2008).

Interferências na ED de anfíbios têm sido correlacionadas a diversos impactos antrópicos nos ambientes. Em relação a AF, grande parte dos estudos são focados na fase adulta destes animais e correlacionam elevados níveis de AF com fatores como pH (Söderman et al., 2007), contaminação por ranavírus (St-Amour et al., 2010) e proximidade de centros urbanos, com maiores índices de industrialização e ocupação humana (Zhelev et al., 2015, 2022; Eisemberg & Bertoluci, 2016; Zhelev et al., 2019, 2021; López-Aguirre et al., 2021). Dos poucos trabalhos realizados com a fase larval (Eterovick et al., 2015; Costa & Nomura, 2016; Costa et al., 2017; Earl & Whiteman, 2010), apenas dois encontraram relação significativa entre AF e perturbações ambientais, sendo elas atividades agropecuárias intensivas e redução de vegetação arbustiva ao redor dos corpos d'água (Costa et al., 2017) e exposição a herbicidas (Costa & Nomura, 2016). Em relação a anomalias, estudos têm demonstrado que alterações de estruturas morfológicas de adultos e girinos podem estar relacionados a presença de poluentes (Bacon et al., 2013; Rowe et al., 1996, 1998; Slaby et al. 2019; Babini et al. 2016), doenças infecciosas (Drake et al., 2007; Fellers et al., 2001; Navarro-Lozano et al., 2018), alteração de habitat (Sievers et al. 2017; Borges et al. 2019) e mudanças de temperatura (Harkey & Semlitsch, 1988; Weerathunga & Rajapaksa, 2020). O trabalho de Souza et al. (2021) traz uma revisão dos registros de anomalias para a fase larval, juvenil e adulta de anuros brasileiros. Em girinos, estas malformações ocorrem frequentemente no disco oral das espécies, ocasionando a desqueratinização de estruturas utilizadas na alimentação, o que leva a uma diminuição da aptidão dos indivíduos (Venesky et al., 2010; Tolledo et al., 2014).

Pithecopus ayeaye Lutz, 1966 é uma espécie endêmica de regiões de altitude do sudeste brasileiro, com distribuição ao longo dos estados de Minas Gerais e São Paulo (Magalhães et al. 2017; Frost, 2021). A espécie se reproduz principalmente em riachos temporários com vegetação arbustiva adjacente (de Oliveira, 2017; Pezzuti et al., 2009). Os ovos são depositados em folhagens que são posteriormente dobradas pelos adultos, para proteção do ninho, caracterizando um modo reprodutivo terrestre típico dos anuros da família Phyllomedusidae (Nunes-de-Almeida et al., 2021). Ao atingir estágio de desenvolvimento 25 (Gosner, 1960), os ovos eclodem e os girinos caem dentro do corpo d'água, onde permanecem até completar sua metamorfose. A reprodução de *P. ayeaye* ocorre em matrizes de campos rupestres, um ambiente que possui sua conservação

ameaçada devido a atividades antrópicas, como extração de recursos vegetais e minerários, introdução de espécies exóticas, incêndios e turismo (Silveira et al., 2016).

Considerando que as perturbações que incidem sobre o habitat da espécie podem afetar a sua estabilidade do desenvolvimento, o objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de assimetria flutuante e anomalias em girinos de *Pithecopus ayeaye* de localidades de campos rupestres com diferentes níveis de perturbação ambiental. Esperamos que diferentes índices de qualidade ambiental, representados por parâmetros indicadores de qualidade de água e ocupação humana do ambiente, reflitam em diferenças de simetria e anomalias nas larvas de *P. ayeaye*. Nossa predição é que organismos de ambientes mais perturbados apresentarão níveis de desvios de desenvolvimento (AF e anomalias) mais elevados, quando comparados com indivíduos de ambientes mais conservados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de estudo e coleta de espécimes

Pithecopus ayeaye habita principalmente áreas de campos rupestres, geralmente em altitudes acima de 900 metros e encontra-se distribuída na região centro sul do estado de Minas Gerais nas serras do Quadrilátero Ferrífero, do planalto da Serra da Canastra e das Vertentes da Gerais, e no estado de São Paulo, no município de Pedregulho (Figura 4; Araujo et al., 2007; Magalhães et al., 2017; 2021; Frost 2021). A área de distribuição da espécie contempla algumas unidades de conservação, como o Parque Nacional da Serra da Canastra e o Parque Nacional da Serra do Gandarela no estado de Minas Gerais e o Parque Estadual das Furnas do Bom Jesus, no Estado de São Paulo. Entretanto, a maior parte de sua distribuição localiza-se em áreas de campos rupestres não protegidos (Magalhães et al., 2017). Essas áreas são de grande interesse econômico para atividades mineradoras, agropecuárias (e.g. monoculturas e criação de gado), de extração vegetal e turismo, o que tem causado impactos ambientais em escalas micro (e.g. qualidade de água) e macro (e.g. perda de habitat) ambientais na área de ocorrência da espécie (Silveira et al., 2016).

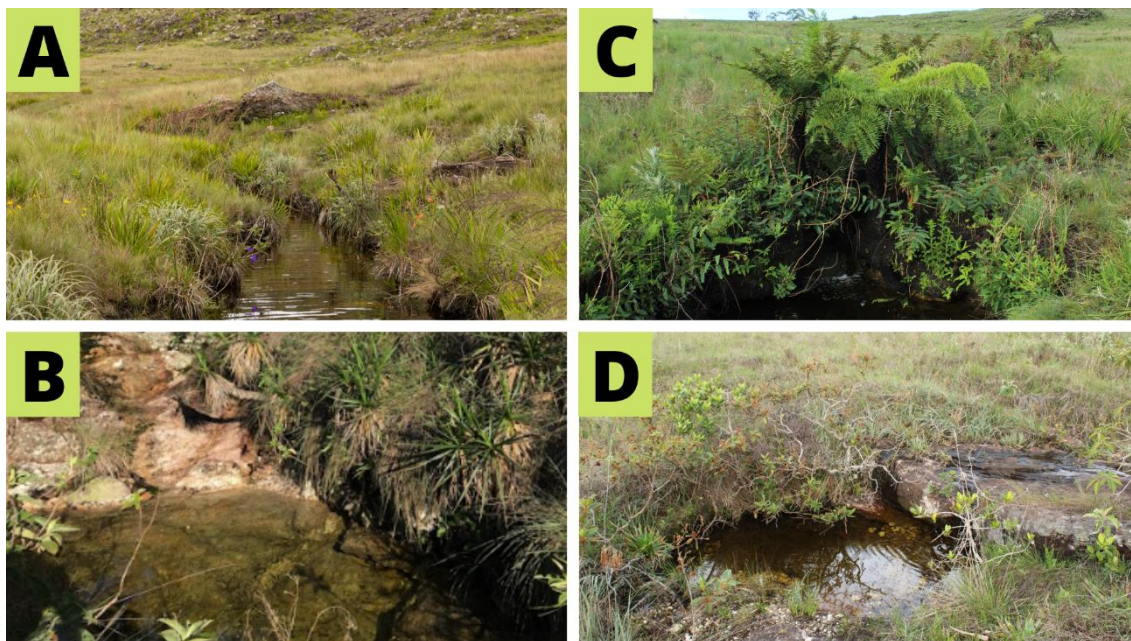


Figura 4. Exemplos de ambientes reprodutivos de *Pithecopus ayeaye* em diferentes locais de ocorrência da espécie. **(A)** São Roque de Minas – MG; **(B)** Araxá – MG; **(C)** São João Batista do Glória – MG; **(D)** São João del-Rei – MG.

Girinos de *P. ayeaye* com estágios de desenvolvimento entre 25 e 41 (Gosner, 1960) foram coletados em 24 pontos de amostragem (Figura 5; Tabela S1) ao longo das principais regiões de ocorrência da espécie, em 16 municípios no estado de Minas Gerais, no período de dezembro de 2019 a fevereiro de 2021. As áreas amostrais incluíram desde pontos localizados em unidades de conservação, presumidamente isolados de impactos ambientais mais severos, até pontos com intenso uso do solo por atividades antrópicas, como por exemplo, riachos localizados às margens de monoculturas e rodovias.

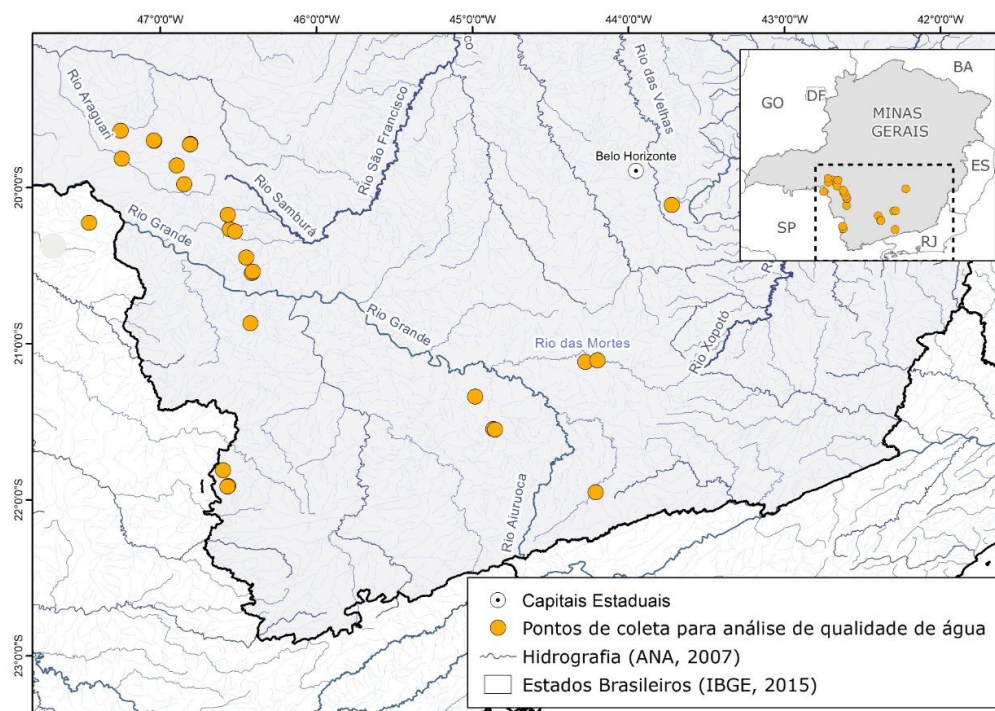


Figura 5. Pontos de coleta de amostras de água e girinos de *Pithecopus ayeaye*.

Os girinos foram coletados durante o dia, com o auxílio de peneiras de mão e foram imediatamente eutanasiados em lidocaína 5% e fixados em formalina 10% (Licença SISBIO número: 74006-3). Os lotes encontram-se depositados na Coleção de Girinos do Centro de Coleções Taxonômicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CCTUFMG) (Apêndice A1).

2.2. Coleta de amostras de água

Amostras de água foram coletadas nos pontos durante a amostragem dos girinos de *P. ayeaye* para análise de qualidade ambiental. Para isso, coletamos duas amostras de água em garrafas plásticas limpas com capacidade de 1,5 L, que foram seguidamente armazenadas em refrigeradores em temperaturas de 4 a 8 °C. Para as análises de demanda bioquímica de oxigênio adicionamos 15 mL de HNO₃ concentrado (50%) em uma amostra para acidificação.

2.3. Análise das amostras e obtenção de variáveis quantitativas do ambiente

Para a caracterização dos aspectos físico-químicos da água de cada ponto amostrado, obtivemos em laboratório as seguintes variáveis: oxigênio dissolvido (%; OD) através do método Winkler-Azida (Winkler, 1888), coliformes fecais (NMP/100 mL; CF) em meio seletivo Ágar Levine (BEM; Vazoller, 1995), demanda bioquímica de oxigênio (mg O_2 /L; DBO_5) pelo método de Winkler (Winkler, 1888), nitrogênio total (mg/L; NO_3) pelo método NTD (Spectro Kit Nitrato Alfakit; APHA, 2005), fósforo total (mg/L; PO_4) pelo método do molibdanovanadato (APHA, 1998), sólidos totais (mg/L; ST) secos a 103-105 °C (APHA, 2005) e turbidez (APHA, 2005). Em campo obtivemos as variáveis: temperatura (°C), pH e condutividade elétrica com uma sonda Hanna Multiparâmetros Hedge e turbidez (uT; Tur) com sonda AKSO TU430.

Com os parâmetros obtidos em laboratório e a temperatura medida no ambiente, calculamos o índice de qualidade de água (IQA) de cada um dos pontos. O IQA utilizado foi o proposto pela *National Sanitation Foundation*, descrito por Brown *et al.* (1970). Este índice utiliza as nove variáveis consideradas as mais informativas em relação a qualidade de águas superficiais. O seu cálculo é feito através da fórmula abaixo (Figura 6), onde q constitui uma pontuação de 0 a 100 referente a qualidade de cada variável. O valor de q é elevado a ponderação w , que corresponde a importância da variável analisada (Tabela S2). Por fim, multiplicando-se cada componente q^w obtemos o valor de IQA.

$$IQA = \prod q_i^{w_i}$$

Figura 6. Fórmula utilizada para obtenção do índice de qualidade de água (IQA), em que $\prod$ corresponde ao multiplicatório; q_i é a qualidade da i ésima variável, w_i o peso da i ésima qualidade e o i refere-se ao número de ordem da variável.

2.4. Análise de paisagem e obtenção dos índices de uso antrópico do solo

Para quantificar os índices de ocupação humana e uso do solo utilizamos a base de dados MapBiomas referente ao ano de 2020 (Coleção v.6.0; Souza *et al.* 2020). A metodologia empregada é totalmente automatizada, integrada ao Google Earth Engine e utiliza imagens de satélites Landsat com resolução espacial de 30 metros, correspondendo a uma escala de 1:250.000.

As coordenadas geográficas em UTM dos pontos amostrados foram plotadas sobre as imagens do MapBiomas no programa QGIS v.3.16 (QGIS.org, 2022. QGIS Geographic Information System. QGIS Association. <http://www.qgis.org>) e dois *buffers*, com raios de 500 e 1000 metros, foram extraídos ao redor de cada ponto (Figuras 7 e 8). Para cada *buffer*, foram estimadas da área total, as porcentagens referentes a cada uso de solo, a fim de se obter os índices de perturbação antrópica a nível de paisagem. As categorias “Floresta”, “Vegetação Natural não Florestal” e “Corpos d’Água” foram consideradas como ambientes naturais, enquanto as categorias “Agropecuária” e “Área não Vegetada” foram consideradas ambientes sob influência de ações antrópicas.

Calculamos também a distância do ponto de amostragem até a área preservada mais próxima. Para isso, utilizamos a ferramenta “linha”, com a qual mensuramos a distância em metros entre o ponto de amostragem e o pixel referente a ambientes naturais mais próximo. Além disso, calculamos a distância do ponto até o centro urbano mais próximo com a mesma ferramenta.

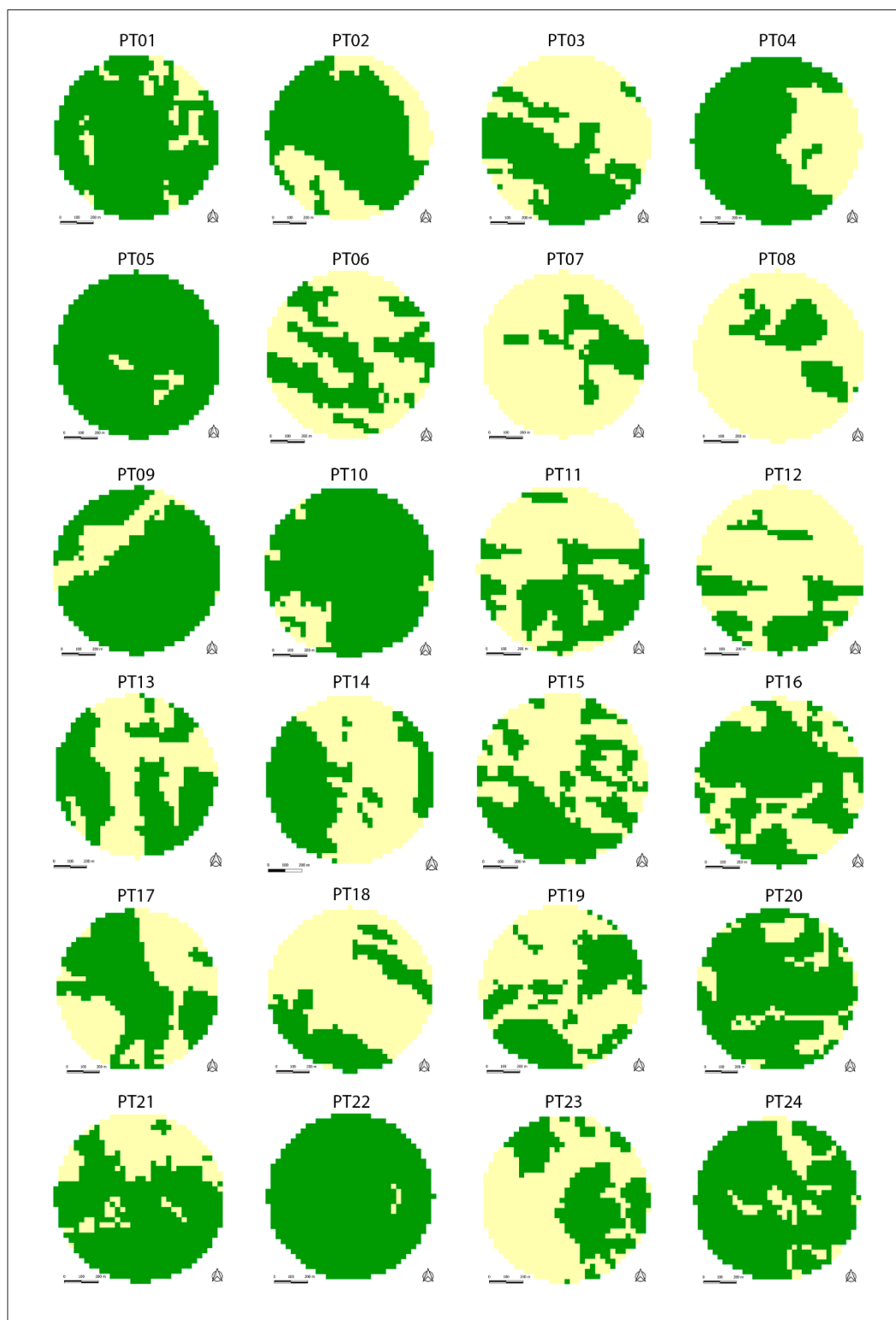


Figura 7. Representação gráfica do uso do solo dos pontos de amostragem de *Pithecopus ayeaye*, utilizando um raio de 500 metros. A cor verde representa ambientes naturais e a amarela, ambientes antropizados.

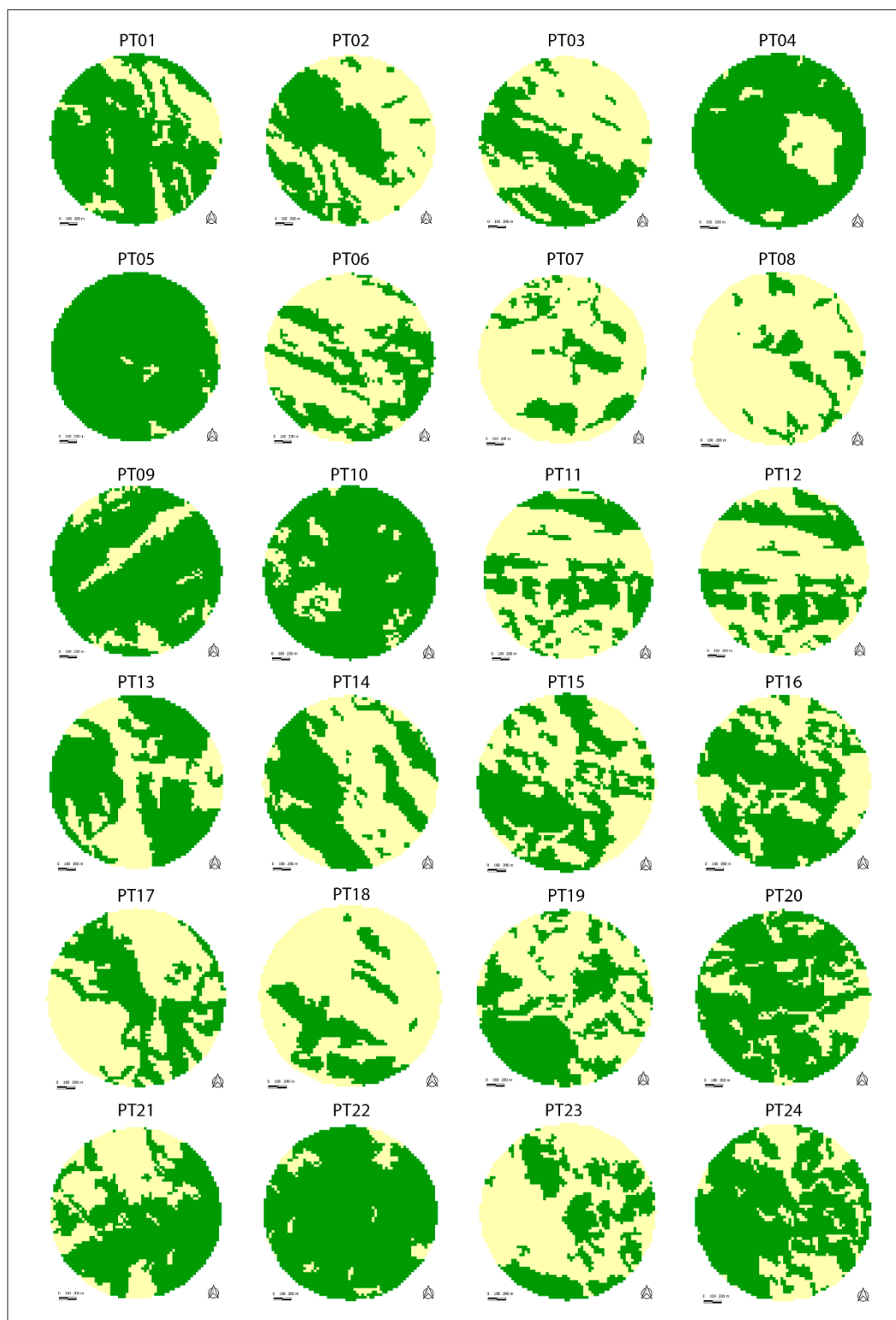


Figura 8. Representação gráfica do uso do solo dos pontos de amostragem de *Pithecopus ayeaye*, utilizando um raio de 1000 metros. A cor verde representa ambientes naturais e a amarela, ambientes antropizados.

2.5. Análise de assimetria flutuante

A precisão da estimativa de AF aumenta de acordo com o número de características avaliadas, visto que um único traço pode ter seu desenvolvimento afetado por inúmeros fatores aleatórios, proporcionando uma estimativa imprecisa da ID (Møller & Manning, 2003). Posto isto, selecionamos oito traços morfológicos para aferir a assimetria flutuante dos girinos de *P. ayeaye*: número de dentículos da fileira P1, diâmetro horizontal das narinas, diâmetro vertical das narinas, diâmetro dos olhos, distância dos olhos às narinas, distância dos olhos ao focinho, distância das narinas ao focinho e forma do bico córneo.

Como caráter merístico usamos o número de dentículos da fileira P1, que apresenta um intervalo separando os lados direito e esquerdo (Figura 9). Escolhemos este caráter devido a possibilidade de ser medido sem erros na maioria das vezes, não havendo necessidade de muitas repetições (Palmer 1994). A fórmula oral dos dentículos (LTRF) de *P. ayeaye* é 2 (2) / 3 (1), o que significa que os girinos possuem duas fileiras de dentículos anteriores (A1 e A2), em que a segunda apresenta um intervalo, além de três fileiras de dentículos posteriores (P1, P2 e P3), em que a primeira apresenta um intervalo. A fileira A2 não foi utilizada para análise, pois o intervalo não é claramente visível em todos os indivíduos. Indivíduos que apresentaram perda de dentículos não foram contabilizados na contagem. Fotografamos 425 indivíduos com uma lupa Leica M205A e os dentículos (DTC) foram contabilizados três vezes de cada lado através das fotografias obtidas. O procedimento foi realizado por uma mesma pessoa a fim de se reduzir os efeitos de observação. Cada contabilização foi feita sem o conhecimento do resultado anterior, método conhecido como “duplo cego”, para reduzir possíveis vieses. Os indivíduos e os lados a serem contados foram aleatorizados durante o processo como proposto por Eterovick *et al.* (2015).

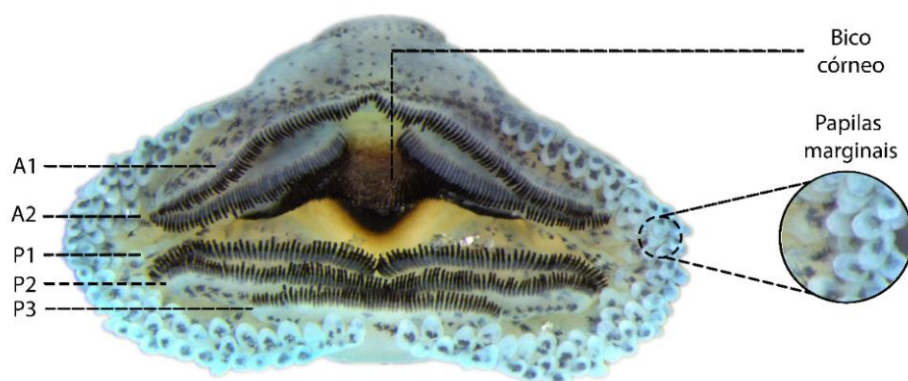


Figura 9. Disco oral do girino de *Pithecopus ayeaye*.

Como caracteres morfométricos, foram utilizados os diâmetros horizontal e vertical das narinas (DHN e DVN, respectivamente; $n = 397$; Figura 10), diâmetro horizontal dos olhos (DO), distância dos olhos às narinas (DON), distância dos olhos ao focinho (DOF) e distância das narinas ao focinho (DNF) (medidas dorsais; $n = 430$; Figura 11). A medição desses caracteres é contínua, podendo ser aplicada a qualquer estrutura e sendo limitada apenas pela precisão, sendo necessárias repetições para verificar se o valor do erro de medição é inferior a variação entre os lados (Palmer 1994). Indivíduos que apresentaram anomalias nos traços medidos não foram incluídos nas análises.



Figura 10. Medidas das narinas do girino de *Pithecopus ayeaye*.

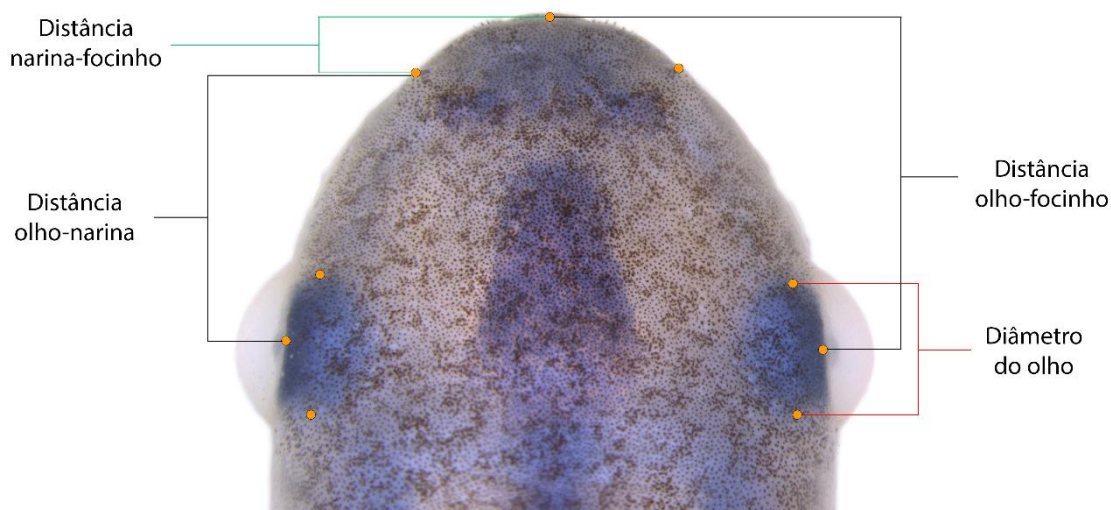


Figura 11. Medidas dorsais do girino de *Pithecopus ayeaye*.

Obtivemos as fotografias dorsais e das narinas para obtenção das medidas lineares. As estruturas de cada lado foram medidas quatro vezes pelo programa TPS Dig v. 2.32 (Rohlf 2015). As medidas obtidas em pixels foram posteriormente transformadas em milímetros através da fórmula abaixo (Figura 12).

$$\sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2}$$

Figura 12. Fórmula utilizada para transformar as coordenadas obtidas no TPS Dig em medidas em milímetros.

A AF da forma do bico córneo também foi avaliada. Assim como os dentículos, o bico córneo é uma estrutura utilizada na obtenção de alimentos, sendo uma porta de entrada para partículas e substâncias presentes no ambiente. A análise de AF da forma do bico córneo foi feita através da morfometria geométrica, baseada na digitalização de marcos anatômicos em duas dimensões (2D).

Os bicos córneos de 448 indivíduos foram fotografados, dos quais 21 foram removidos devido a deformações na estrutura, sendo considerados outliers que poderiam inflar ou obscurecer os resultados da análise (Palmer & Strobeck, 2003). Cada indivíduo foi fotografado duas vezes em momentos diferentes para testar o erro de posicionamento e cada imagem obtida foi duplicada a fim de averiguar o erro de marcação dos pontos anatômicos (Figura 13).

As imagens foram transformadas e salvas através do programa TPS Util v. 1.81 (Rohlf 2015). Digitalizamos dois marcos anatômicos, um em cada extremidade distal do processo lateral do bico córneo, no programa TPS Dig v. 2.32 (Rohlf 2017). Em seguida, com a ferramenta de curva, traçamos o contorno do bico córneo e reamostramos para 21 pontos equidistantes. Posteriormente, apagamos os pontos de curva das extremidades e editamos o arquivo TPS, para reconhecimento de todos os pontos de curva como marcos anatômicos. Apesar do bico córneo possuir simetria objetiva (Mardia et al., 2000; Klingenberg et al., 2002), foi necessário definir um marco anatômico de referência para separar os lados direito e esquerdo. Portanto, foram digitalizados 20 marcos anatômicos pareados e um não pareado (Figura 14).

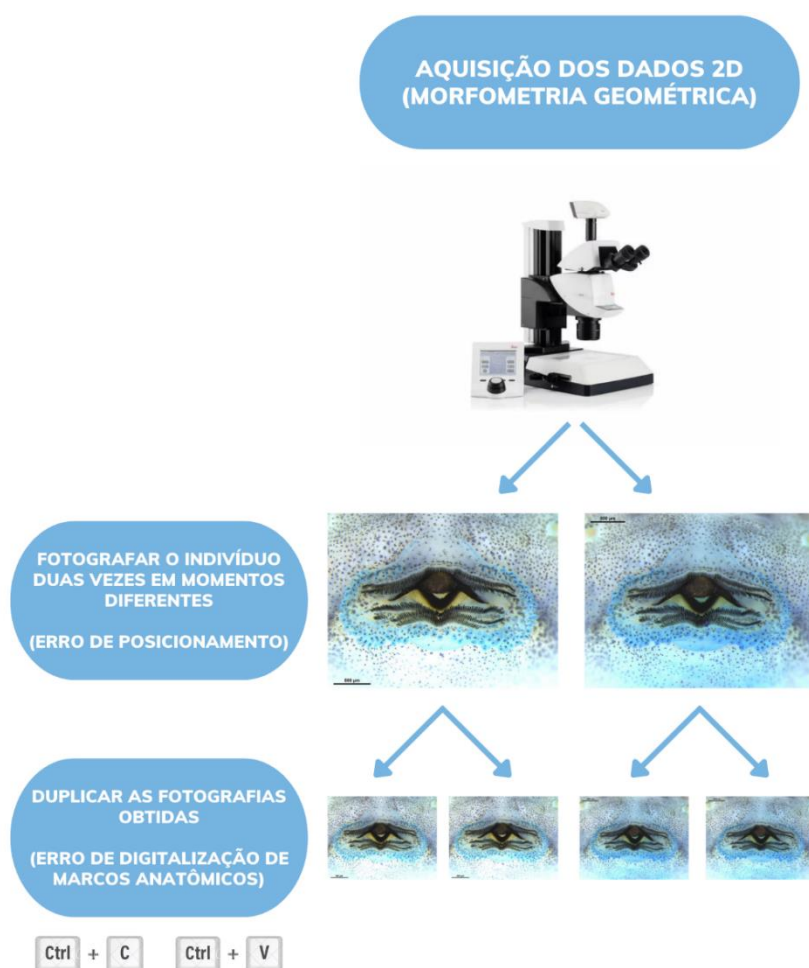


Figura 13. Análises de erro de posicionamento e digitalização de marcos anatômicos do bico córneo de *Pithecopus ayeaye*, para posterior análise de assimetria flutuante através da morfometria geométrica.

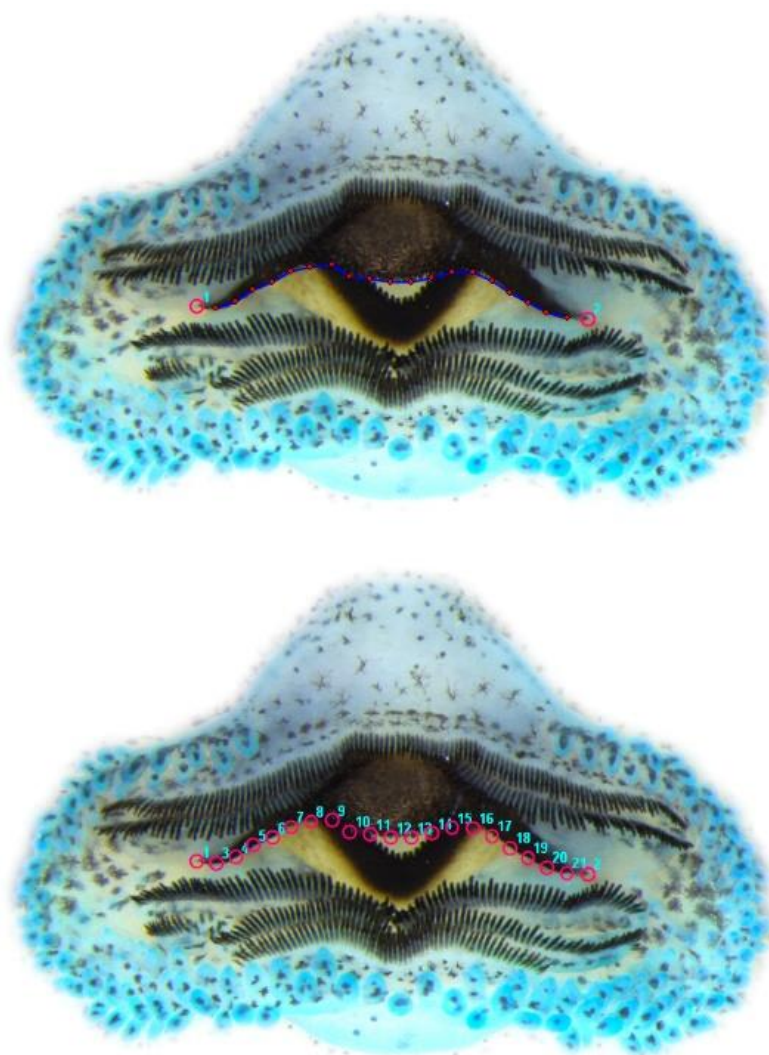


Figura 14. Digitalização dos marcos anatômicos e pontos de curva do bico córneo de *Pithecopus ayeaye*. **A.** Digitalização dos pontos das extremidades distais dos processos laterais e pontos de curva sobre o contorno da estrutura. **B.** Pontos de curva transformados em marcos anatômicos.

2.6. Análise de anomalias

Verificamos 451 girinos de *P. ayeaye* e as anomalias observadas foram classificadas em uma matriz adaptada de Amaral *et al.* (2018), em que cada indivíduo recebeu um escore de acordo com a intensidade da anomalia apresentada (Tabela 1). Detectamos oito anomalias diferentes no corpo e no disco oral dos girinos de *Pithecopus ayeaye* e classificamos de acordo com Drake *et al.* (2007) e Tolledo *et al.* (2014): dentículos faltantes (Figura 15), interrupção da fileira de dentículos (Figura 16), despigmentação dos dentículos (Figura 17), quebras, lacunas ou outras deformidades na

aresta de corte do bico córneo (Figura 18), ausência de queratinização do bico córneo (Figura 19), perda completa dos lábios (Figura 20), deformação nos olhos (Figura 21) e deformação do focinho. Posteriormente, fizemos a soma dos scores de todos os traços analisados para obter um score de anomalia individual e em seguida, fizemos a média por população.

Tabela 1. Descrição das anomalias encontradas nos girinos de *Pithecopus ayeaye* e classificação dos escore. ¹indica a nomenclatura proposta por Drake et al. (2007), ²Tolledo et al. (2014) e *indicadas em nosso trabalho.

Anomalias	Escore		
	0	5	10
Dentículos faltantes ¹	Nenhuma perda de dentículos	Perda de dentículos em uma fileira	Perda de dentículos em duas ou mais fileiras
Interrupção das fileiras de dentículos*	Fileiras de dentículos intactas	Interrupção de uma fileira de dentículos	Interrupção de duas ou mais fileiras de dentículos
Ausência de queratinização dos dentículos*	Dentículos queratinizados	Ausência de queratinização de dentículos em uma fileira	Ausência de queratinização de dentículos em duas ou mais fileiras
Quebras, lacunas, perda ou outras deformidades na aresta de corte do bico córneo ¹	Bico córneo intacto	Quebras, lacunas, perda ou outras deformidades na aresta de corte da porção superior ou inferior do bico córneo	Quebras, lacunas, perda ou outras deformidades na aresta de ambas as porções do bico córneo
Ausência de queratinização do bico córneo ²	Bico córneo queratinizado	Ausência de queratinização da porção superior ou inferior do bico córneo	Ausência de queratinização de ambas as porções do bico córneo
Perda completa dos lábios ²	Lábios intactos	Perda de um dos lábios	Perda dos dois lábios
Deformação no focinho*	Focinho intacto	-	Focinho deformado
Deformação dos olhos*	Olhos intactos	Deformidade em um olho	Deformidade nos dois olhos

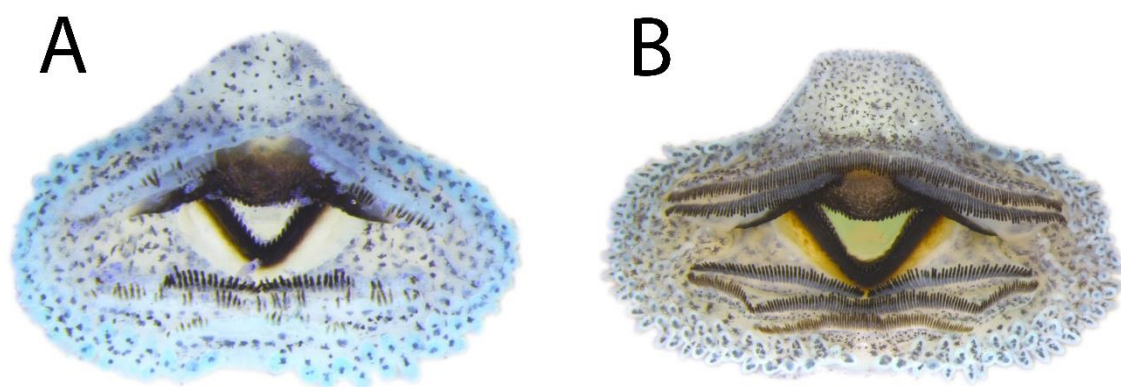


Figura 15. Indivíduo de *Pithecopus ayeaye* com: **(A)** dentículos faltantes em todas as fileiras; **(B)** dentículos intactos.

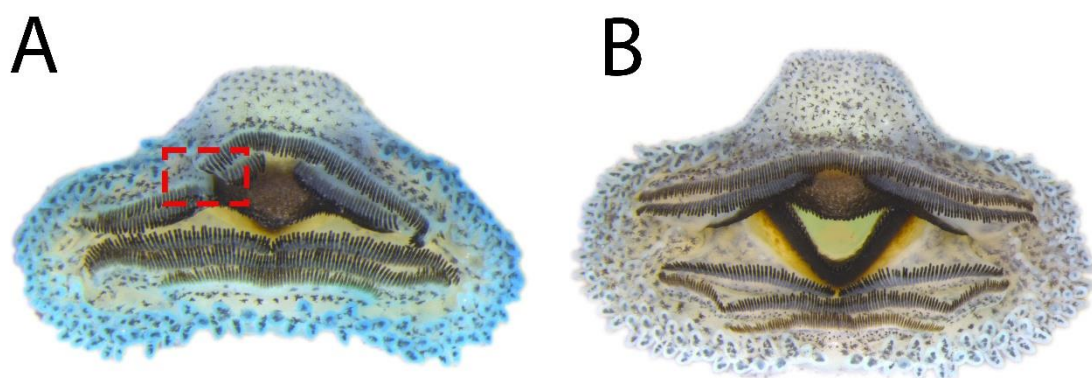


Figura 16. Indivíduo de *Pithecopus ayeaye* com: **(A)** interrupção na fileira de dentículos A1; **(B)** fileira de dentículos intactas.

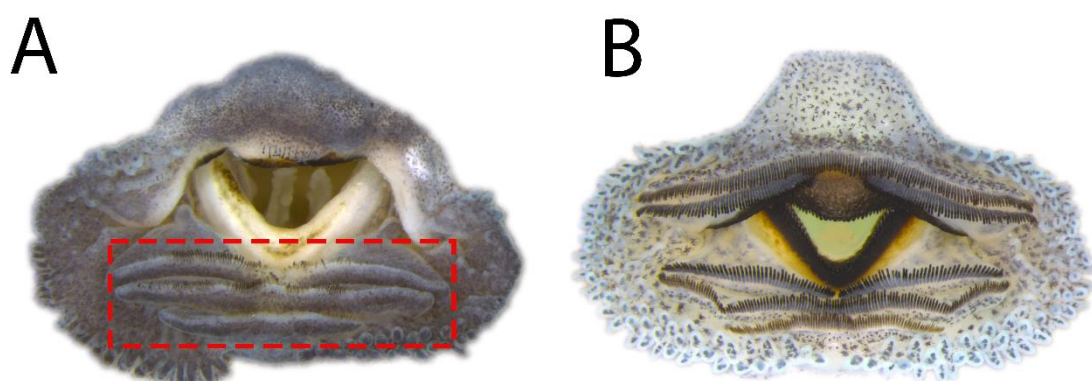


Figura 17. Indivíduo de *Pithecopus ayeaye* com: **(A)** ausência de queratinização dos dentículos em todas as fileiras; **(B)** dentículos perfeitamente queratinizados.

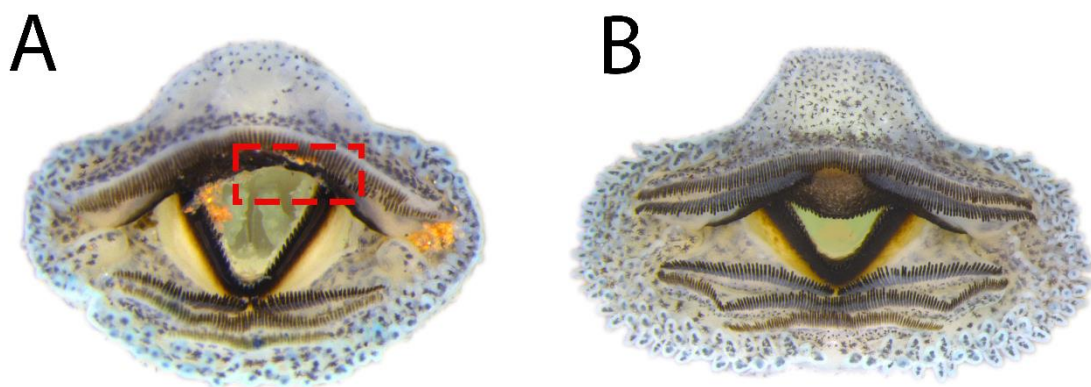


Figura 18. Indivíduo de *Pithecopus ayeaye* com: **(A)** deformação no bico córneo; **(B)** bico córneo intacto.

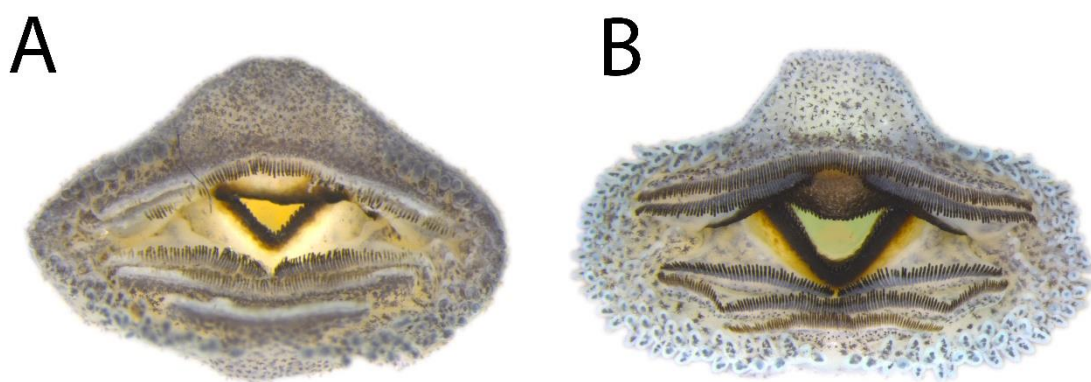


Figura 19. Indivíduo de *Pithecopus ayeaye* com: **(A)** ausência de queratinização no bico córneo; **(B)** bico córneo perfeitamente pigmentado.

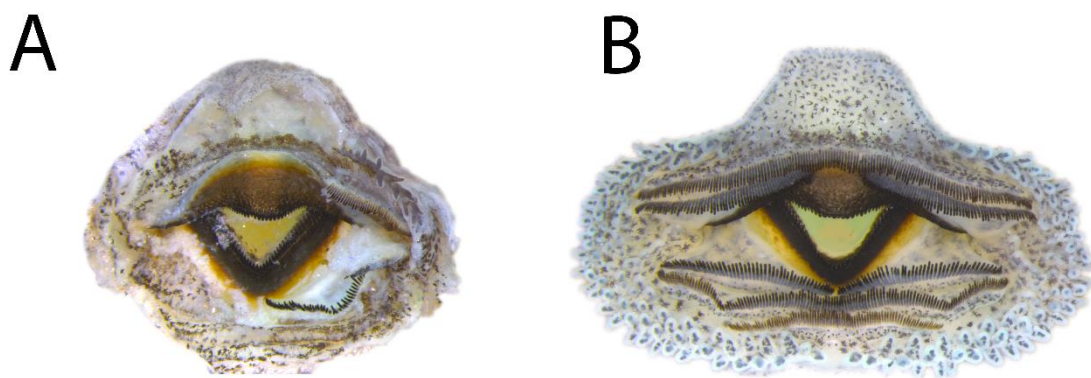


Figura 20. Indivíduo de *Pithecopus ayeaye* com: **(A)** perda dos lábios; **(B)** lábios superior e inferior intactos.

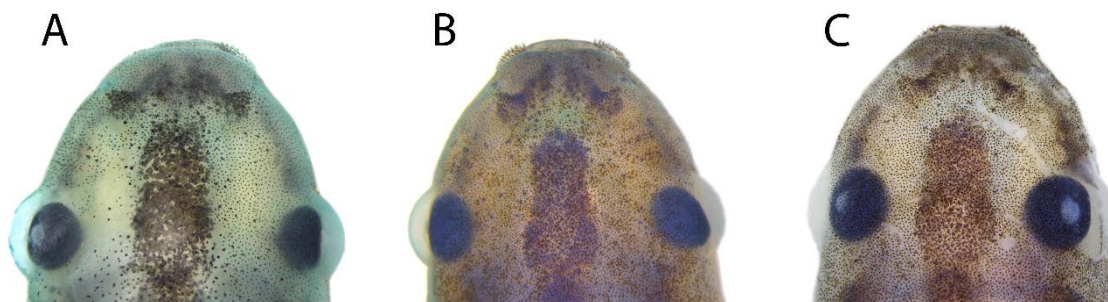


Figura 21. Deformidades dos olhos em vista dorsal: **(A)** globo ocular esquerdo voltado ligeiramente para cima; **(B)** globo ocular direito deslocado em sua porção superior, voltado para dentro; **(C)** globo ocular direito voltado ligeiramente para cima e deslocado totalmente, voltado para dentro.

2.7. Análises estatísticas

2.7.1. Medidas morfométricas e merísticas

O protocolo proposto por Palmer e Strobeck (1986; 2003) foi utilizado para as análises de AF. Para a avaliação dos pressupostos, foi utilizado o índice $AF = (D - E)$, em que D representa o lado direito e E o lado esquerdo (Palmer & Strobeck 1986; Figura 22).



Figura 22. Testes para avaliação da AF nos traços mensurados de *Pithecopus ayeaye*.

A fim de se detectar e remover possíveis outliers foi realizado o teste de Grubbs nas medições originais dos lados direito e esquerdo para todas as repetições (Grubbs, 1969). O mesmo teste foi feito com a diferença entre os lados [i.e. (AF = D – E)] com base na média das repetições por indivíduo.

Após a exclusão dos outliers, foi realizada uma *two-way ANOVA* com as medições originais para estimar os quadrados médios do erro de medição e da interação entre indivíduos e o lado. Para esta análise, cada traço foi considerado uma variável resposta, os lados (i.e., direito e esquerdo) foram considerados fatores fixos e os indivíduos como fatores aleatórios. Posteriormente, foi realizado um teste t para uma amostra (*single sample*) para averiguar se as médias se diferiam significativamente de 0 e inferir a existência de assimetria direcional (AD).

Para testar a normalidade dos dados, os valores de AF foram submetidos ao teste de D’Agostino-Pearson, por ter sido desenvolvido para lidar com número de amostras acima de 100 (Miot, 2017). A dependência entre os índices de AF e tamanho foi verificada

através do coeficiente de correlação de Spearman, assim como a dependência da AF com o estágio de desenvolvimento. Todas as análises dos pressupostos foram feitas no programa GraphPad Prism v.s. 9.0.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com).

Aplicamos a fórmula de assimetria flutuante corrigida (AFcor) adaptada de Didde & Rivera (2019; Figura 23) para corrigir a AD dos traços avaliados. O primeiro componente da fórmula corresponde à diferença sinalizada entre os lados direito e esquerdo (média das repetições) de cada indivíduo e o segundo componente se refere a AD sinalizada da população. Esta correção também foi proposta por Klingenberg (2003) e foi utilizada por Toets et al. (2016), em que a AF é considerada o desvio de simetria dos indivíduos da assimetria média, ao invés da simetria perfeita. Ao utilizar este procedimento, assumimos que ambos os lados das estruturas avaliadas são quase idênticos, uma vez que a AD encontrada é relativamente pequena (Klingenberg, 2003). Aplicamos a fórmula para todos os traços, com e sem AD significativa, para que os valores de AF obtidos pudessem ser comparáveis. Fizemos uma regressão linear para verificar se a correção interferiu nos dados originais dos traços que não apresentaram AD.

$$AF \text{ cor} = | [D - E] - [\frac{\sum (D - E)}{N}] |$$

Figura 23. Índice de assimetria flutuante corrigido adaptado de Didde & Rivera (2019).

Todos os traços medidos feriram o pressuposto da normalidade, entretanto o não cumprimento dos pressupostos é algo que pode ser esperado nas análises de AF, segundo Palmer & Strobeck (1986). Um fator apontado pelos autores é o de que os desvios de simetria são muito pequenos e se distribuem muito próximos de zero, formando distribuições não normais com curvas leptocúrticas (Figura 24). Desta forma, assumimos a não normalidade dos dados como um vestígio biológico e seguimos com as análises. Em relação a distribuição de frequência da diferença entre lados, o traço DTC apresentou uma distribuição bimodal como a esperada para traços com antissimetria (Figura S1). Portanto, esse traço também foi excluído das análises seguintes.

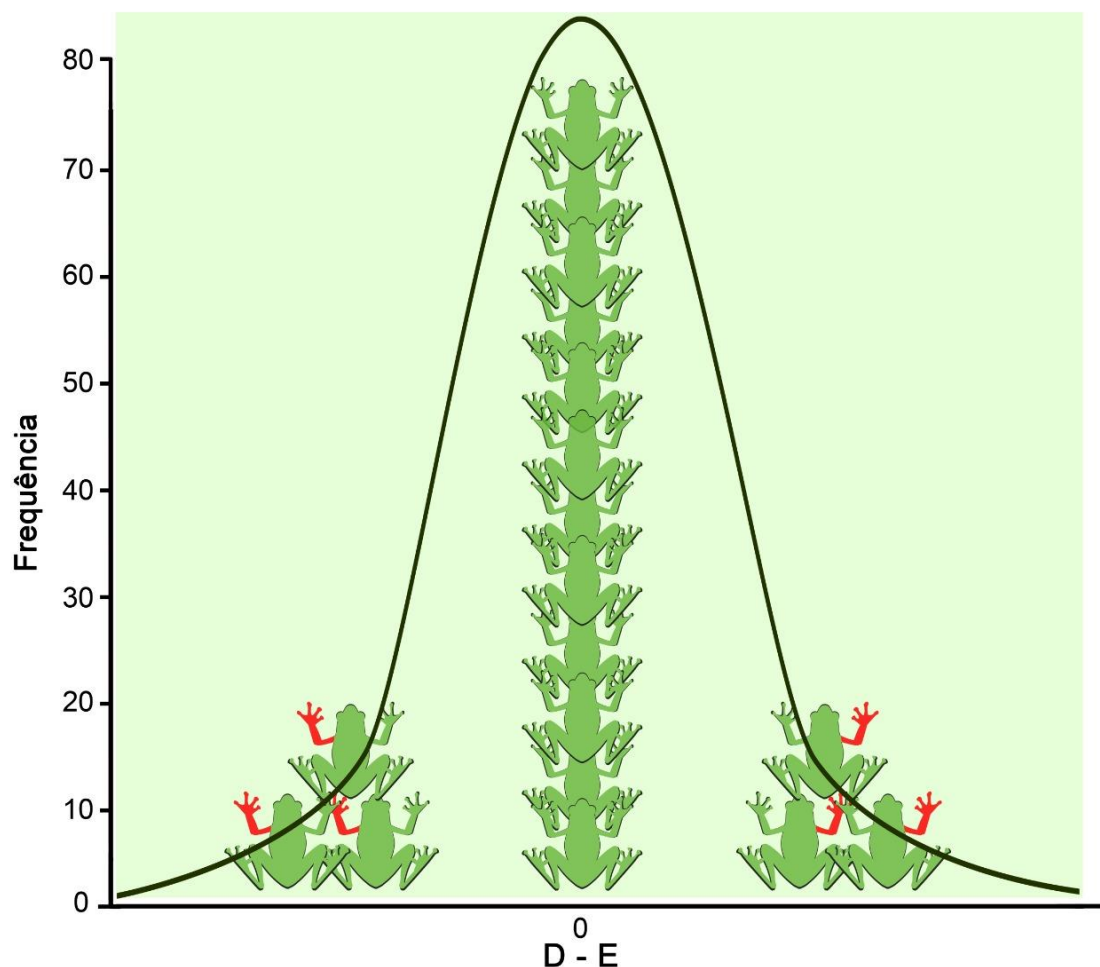


Figura 24. Curva altamente leptocúrtica devido ao grande número de indivíduos simétricos na população, um reflexo do significado biológico da assimetria flutuante.

Após obter os valores de AF corrigida (AFcor) dos indivíduos, calculamos o índice composto de assimetria flutuante corrigida (CFAcor) adaptado de Leung et al. (2000), que consistiu na soma dos valores absolutos de AFcor de todos os traços, a fim de se obter um valor único por indivíduo. Para a obtenção deste índice utilizamos apenas os indivíduos que não tiveram nenhuma medida excluída no teste de Grubbs ($n = 363$).

2.7.2. Morfometria Geométrica

Após obter as coordenadas cartesianas x-y de todos os marcos anatômicos, aplicamos uma superimposição de Procrustes para acessar as informações sobre a variação do contorno do bico córneo (Rohlf 1990; Zelditch et al. 2012; Figura 25). Esta etapa é muito importante para as análises, uma vez que os efeitos escala, posicionamento

e orientação são removidos (Klingenberg, 2015; Tatalović et al., 2020). Para medir os erros de medição e identificar os tipos de assimetria presentes no traço realizamos uma Procrustes ANOVA. Para todas as etapas utilizamos o programa MorphoJ v. 1.07a (Klingenberg 2011).

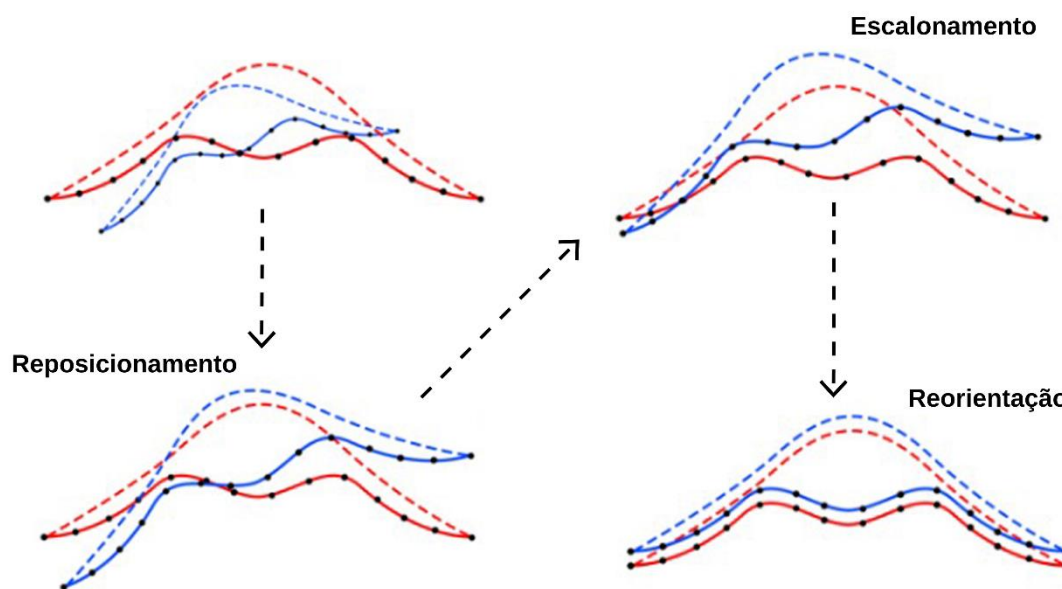


Figura 25. Superimposição de Procrustes do bico córneo de *Pithecopus ayeaye*. Nesta etapa, removemos os efeitos de escala, posição e orientação da estrutura. Imagem adaptada de Klingenberg (2015).

2.7.3. Correlações entre parâmetros ambientais, desvios de simetria e anomalias

Primeiramente, padronizamos os dados ambientais através da função “decostand” do pacote “vegan” v. 2.6-6 (Oksanen et al., 2022) no programa R v. 4.2.2 (Core Team, 2022). Utilizamos o método “standardize”, que escala x para média zero e variância unitária, com margem padrão igual à 2. Para avaliar a importância relativa das variáveis ambientais sobre os desvios de desenvolvimento observados, testamos a multicolinearidade entre as variáveis preditoras utilizando a função “vif” do pacote “car” v. 3.1-1 (Fox et al., 2022), também no R. Nesta etapa, não utilizamos o IQA por ele ser composto pelos parâmetros físico-químicos que testamos separadamente. Draper & Smith (1998) recomendam a remoção das variáveis preditoras com alta colinearidade, aquelas que apresentem fatores de inflação de variância (VIF) maiores que 10. Todas as variáveis apresentaram valores de VIF inferiores a 10. Assim, nosso modelo foi composto pelos

preditores: uso do solo em 500 m, uso do solo em 1000 m, distância da área preservada mais próxima, distância do centro urbano mais próximo, temperatura, oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio, nitrogênio total, fósforo total, sólidos totais, pH, turbidez (medidos em campo), condutividade elétrica. Com todas as variáveis ambientais, construímos modelos lineares generalizados (GLMs) com distribuição gaussiana, nos quais as variáveis resposta foram as AFs corrigidas de cada traço, o CFAcor e o escore de anomalias, cada uma delas testada separadamente.

Posteriormente, utilizamos o critério de informação Akaike corrigido para pequenas amostras (AICc) para seleção dos modelos. Nós retivemos múltiplos modelos com $\Delta AICc < 2$, uma vez que todos eles se ajustam bem aos dados (Burnham & Anderson, 2004). Selecionamos o melhor modelo utilizando a função “dredge” do pacote “MuMIn” v. 1.47.1 no R (Burnham & Anderson, 2002), que é baseada no peso de Akaike (wAICc), que corresponde a probabilidade de um conjunto de variáveis resultar num melhor ajuste. Verificamos o pressuposto da homogeneidade das variâncias através do teste de Levene e a distribuição normal dos resíduos através de avaliações gráficas da distribuição dos dados (Burnham & Anderson, 2002). Por último, utilizamos a função “importance” do pacote “glmulti” v. 1.0.8 no R para determinar a importância relativa de cada variável preditora selecionada para o modelo com maior wAICc (Calcagno et al., 2020). As relações lineares entre as variáveis preditoras foram calculadas com as funções “rsq” e “rsq.partial” do pacote “rsq” v. 2.5 no R (Zhang et al., 2022).

3. RESULTADOS

3.1. Parâmetros microambientais, índice de qualidade de água e uso antrópico do solo

A caracterização físico-química dos ambientes amostrados está apresentada como média $\pm$ desvio padrão (mínimo – máximo). Girinos de *Pithecopus ayeaye* foram encontrados em corpos d’água com temperatura de $23,01\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,25$ (20,1 – 28,2 $^{\circ}\text{C}$), turbidez de $26,85\text{ NTU} \pm 64,78$ (0 – 297 NTU), concentração de oxigênio dissolvido de $5,56\text{ mg/L} \pm 1,12$ (3,13 – 7,50 mg/L), demanda bioquímica de oxigênio de $0,93\text{ mg/L} \pm 0,69$ (0,20 – 2,96 mg/L), concentração de nitrogênio total de $0,23\text{ mg/L} \pm 0,28$ (0,02 – 1,04 mg/L), concentração de coliformes fecais de $362,50\text{ UFC/100 mL} \pm 536,50$ (0 – 2000 UFC/100 mL), concentração de fósforo total de $1,74\text{ mg/L} \pm 0,77$ (1 – 4),

concentração de sólidos totais de $72,08 \text{ mg/L} \pm 46,50$ ($25,0 - 175,0 \text{ mg/L}$), pH de $7,87 \pm 1,38$ ($4,96 - 9,51$). Os valores dos parâmetros físico-químicos, índice de qualidade de água e uso antrópico do solo no raio de 500 e 1000 metros para cada ponto amostrado se encontram nas tabelas S3, S4 e S5, respectivamente.

3.2. Assimetria flutuante – traços morfométricos e merísticos

De todas as medições originais dos indivíduos, encontramos e removemos duas medidas referentes a DNF, 12 referentes ao DO e três referentes ao DHN por meio do teste Grubbs (Tabela S7). Já na segunda rodada do teste sob as diferenças entre os lados, foram encontrados e excluídos 20 outliers, sendo dois referentes a DNF, três referentes a DOF, quatro referentes a DON, oito referentes ao DO e quatro referentes ao DHN (Tabela S6). Nenhum *outlier* para o DVN e DTC foi encontrado. Com a exclusão dos dados, seguimos as análises com 425 medidas para DTC, 426 medidas para DNF, 427 medidas para DOF, 426 medidas para DON, 410 medidas para DO, 390 medidas para DHN e 397 medidas para DVN.

As médias das medidas DNF, DOF e DHN se diferiram significativamente de zero (Tabela 3). A DNF e DOF apresentaram valores altos e significativos de AD na *two-way* ANOVA (Tabela 2). Devido a isso, excluímos estes dois traços das análises subsequentes. Os traços DON, DO e DHN apresentaram AF significativa e os erros de medição foram significativamente menores que a AF, indicando que as medidas são confiáveis (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados da *two way* ANOVA de todos os traços morfológicos mensurados.

Traços	Lado			Indivíduo			Lado x Indivíduo			Erro	
	MS	F	dF	MS	F	dF	MS	F	dF	MS	dF
DNF	4.682*	1203.0	1	0.935*	70.52	425	0.013*	3.314	425	0.0039	1218
DOF	2.400*	864.5	1	10.28*	115.0	426	0.014*	5.033	426	0.0028	1218
DON	0.0018	0.9374	1	5.685*	120.1	425	0.010*	5.322	425	0.0020	1215
DO	0.0103	10.35	1	0.830*	64.65	409	0.003*	2.658	409	0.0001	1190
DVN	0.0041*	42.44	1	0.012*	35.06	396	0.001*	6.615	396	0.0001	1188
DHN	0.0025	12.06	1	0.030*	27.46	389	0.004*	1.791	389	0.0002	1188

DTC **4.574*** 25.81 1 **705.7*** 3248 424 **17.39*** 98.11 424 0.1773 850

* $P < 0.0001$; os valores em negrito correspondem a valores significativos.

A AFcor encontrada para os traços mantidos para as próximas análises (DON, DO, DVN e DHN) não foi influenciada pelo tamanho, nem com o estágio de desenvolvimento. Os valores de AF dos traços que não apresentaram AD não foram afetados pela correção utilizada ($r^2 = 1$; $p < 0.05$; Figura S2). Os resultados das análises dos pressupostos encontram-se na tabela 3.

Tabela 3. Resultados dos pressupostos para as análises de assimetria flutuante: teste t, normalidade e dependência do tamanho e estágio de desenvolvimento ($p < 0.01$, em negrito).

Traço	N	Teste t			D'Agostino-		Spearman		Spearman	
		(one sample)			Pearson		(tam)		(est)	
		T	d.f.	P	K2	P	R	P	R	P
DNF	426	19.05	425	<0.0001	30.58	<0.0001	-0.215	<0.0001	0.075	0.1336
DOF	427	13.11	426	<0.0001	3.76	0.1524	-0.110	0.0260	-0.099	0.0446
DON	426	0.4197	425	0.6749	11.87	0.0026	0.059	0.2285	0.066	0.1818
DO	410	1.973	409	0.0492	20.14	<0.0001	-0.048	0.3398	-0.031	0.5322
DVN	390	2.533	389	0.0117	31.35	<0.0001	0.084	0.0928	0.048	0.3374
DHN	397	2.595	396	0.0098	9.92	0.007	-0.021	0.6689	0.073	0.1475
DTC	425	0.4529	424	0.6508	23.27	<0.0001	-0.011	0.8179	-0.004	0.9320

3.3. Anomalias

Encontramos alterações morfológicas em 20 das 24 populações estudadas. Anomalias orais foram detectadas em 17 populações, atingindo de 2.2 a 100% dos indivíduos por população e correspondendo a 91% das anomalias totais. Apenas uma população apresentou alteração no focinho para apenas um indivíduo e cinco populações apresentaram alterações nos olhos. A perda de dentículos foi bastante expressiva, correspondendo a 47.2% das anomalias, seguida das alterações do bico córneo que corresponderam a 19.8%. Em menores proporções, encontramos fileiras de dentículos interrompidas (10.1%), alterações nos olhos (7.9%), despigmentação dos dentículos (6.7%), despigmentação do bico córneo (5.6%), perda dos lábios (3.4%) e deformação do

focinho (1.1%). O escore de anomalias de cada população pode ser observado na tabela 4 e as proporções de cada anomalia por população encontram-se na tabela S7.

Tabela 4. Escore de anomalias de diferentes populações de *Pithecopus ayeaye*.

Populações	Localidade	Escore de anomalias
PT01	São João Batista do Glória - MG	0
PT02	São João Batista do Glória - MG	0
PT03	Vargem Bonita - MG	0.45
PT04	São Roque de Minas – MG	0
PT05	São Roque de Minas – MG	0
PT06	São João Batista da Canastra – MG	2.5
PT07	Poços de Caldas – MG	10.42
PT08	Poços de Caldas – MG	10.45
PT09	São João del-Rei – MG	0.83
PT10	Rio Acima – MG	1.5
PT11	Araxá – MG	2.27
PT12	Araxá – MG	3.81
PT13	Tapira – MG	0.29
PT14	Tapira – MG	2.08
PT15	Araxá – MG	0.42
PT16	Araxá – MG	0.91
PT17	Sacramento – MG	0.16
PT18	Perdizes – MG	0.13
PT19	São João del Rei – MG	0.34
PT20	Lavras – MG	0.11
PT21	Luminárias – MG	0.36
PT22	Luminárias – MG	1.25
PT23	Alpinópolis – MG	0.5
PT24	Bom Jardim de Minas – MG	1.39

3.4. Correlações entre parâmetros ambientais e desvio de desenvolvimento

De início, realizamos regressões lineares exploratórias para verificar a relação entre os desvios morfológicos observados e os parâmetros ambientais mensurados para

cada um dos pontos (Índice de Qualidade de Água (IQA) e métricas de paisagem). Não encontramos nenhuma correlação significativa entre os desvios observados e o IQA, portanto, seguimos as análises com as variáveis ambientais separadamente. O pH que compõe o IQA foi medido em laboratório e não apresentou correlação com nenhum desvio observado. Além disso, durante o armazenamento de amostras é comum que a matéria orgânica comece a se decompor, ocasionando na acidificação da água coletada. Com isso, optamos por utilizar os valores de pH e turbidez medidos em campo para as próximas análises, visto que estes correspondem aos experienciados pelos organismos em seu ambiente.

Todos os modelos GLM para os desvios de desenvolvimento foram relacionados às variáveis ambientais turbidez, pH, sólidos totais, distância da área preservada mais próxima, distância do centro urbano mais próximo, concentração de fósforo total, uso antrópico do solo (em 500 e 1000 metros) e temperatura (Tabela 5). O resultado da seleção de modelos completa para cada combinação testada encontra-se na tabela S7.

Tabela 5. Modelo linear generalizado (GLM) com o maior peso para cada variável resposta. Neles estão relacionados os efeitos das variáveis ambientais sobre os desvios de desenvolvimento observados em girinos de *Pithecopus ayeaye*.

Modelo	df	AICc	Delta	Peso
CFAcor x Turb	3	-54.4	0	0.259
AFcorDON x Turb	3	-98.1	0	0.247
AFcorDHN x pH	3	-132.3	0	0.186
AFcorDVN x solT	3	-119.3	0.46	0.168
AFcorDO x DistPres + Turb	4	-82.3	0	0.189
Anom x DistUrb + P + s1000 + s500 + Temp	7	105.7	0	0.275

Abreviações: CFAcor, índice de assimetria flutuante composto; AFcorDON, assimetria flutuante corrigida da distância dos olhos às narinas; AFcorDHN, assimetria flutuante corrigida do diâmetro horizontal das narinas; AFcorDVN, assimetria flutuante corrigida do diâmetro vertical das narinas; AFcorDO, assimetria flutuante corrigida do diâmetro dos olhos; Anom, escore de anomalias; Turb, turbidez; solT, sólidos totais; DistPres, distância da área preservada mais próxima; DistUrb, distância do centro urbano mais próximo, P, concentração de fósforo total;

s1000, uso antrópico do solo em 1000 metros; s500, uso antrópico do solo em 500 metros; Temp, temperatura; df, graus de liberdade, AICc, critério de informação Akaike corrigido;

Girinos de populações que ocorrem em ambientes com água menos turva apresentaram distância olho-narina mais assimétrica (AFcorDON: $r^2 = 0.195$, $F = 6.587$; $p = 0.0176$; Figura 26) e maiores coeficientes de assimetria flutuante (CFAcor: $r^2 = 0.144$; $F = 4.898$; $p = 0.0376$; Figura 27).

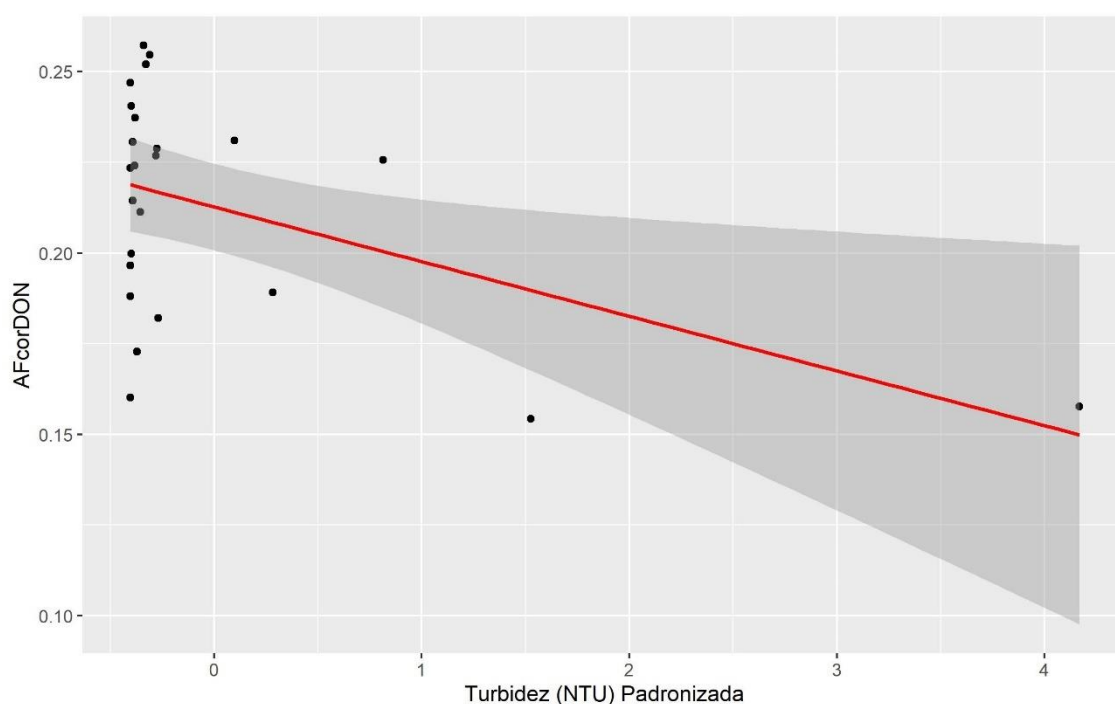


Figura 26. Redução do índice de assimetria flutuante corrigida (AFcor) da distância olho-narina (DON) de *Pithecopus ayeaye* em relação ao aumento da turbidez dos corpos d'água.

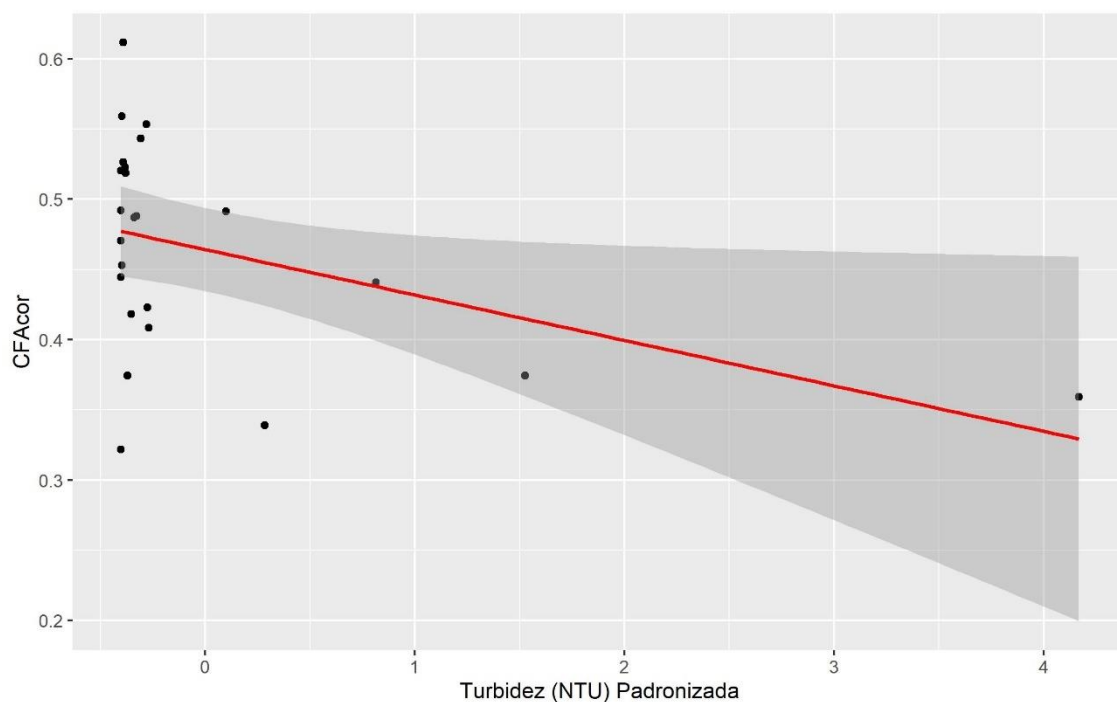


Figura 27. Redução do índice composto de assimetria flutuante corrigida (CFAcor) de *Pithecopus ayeaye* em relação ao aumento da turbidez dos corpos d’água.

Além disso, girinos de populações de ambientes alcalinos apresentaram diâmetro horizontal das narinas mais assimétrico (AFcorDHN: $r^2 = 0.242$; $F = 8.354$; $p = 0.0084$; Figura 28). Enquanto isso, populações de ambientes mais próximos a áreas preservadas apresentaram diâmetros do olho menos assimétricos (AFcorDO: $r^2 = 0.130$; $F = 4.983$; $p = 0.0366$; Figura 29). Apesar do melhor modelo ser explicado pela interação entre as variáveis “distância de área preservada” e “turbidez”, a turbidez não foi significativa na relação com a variável resposta AFcorDO.

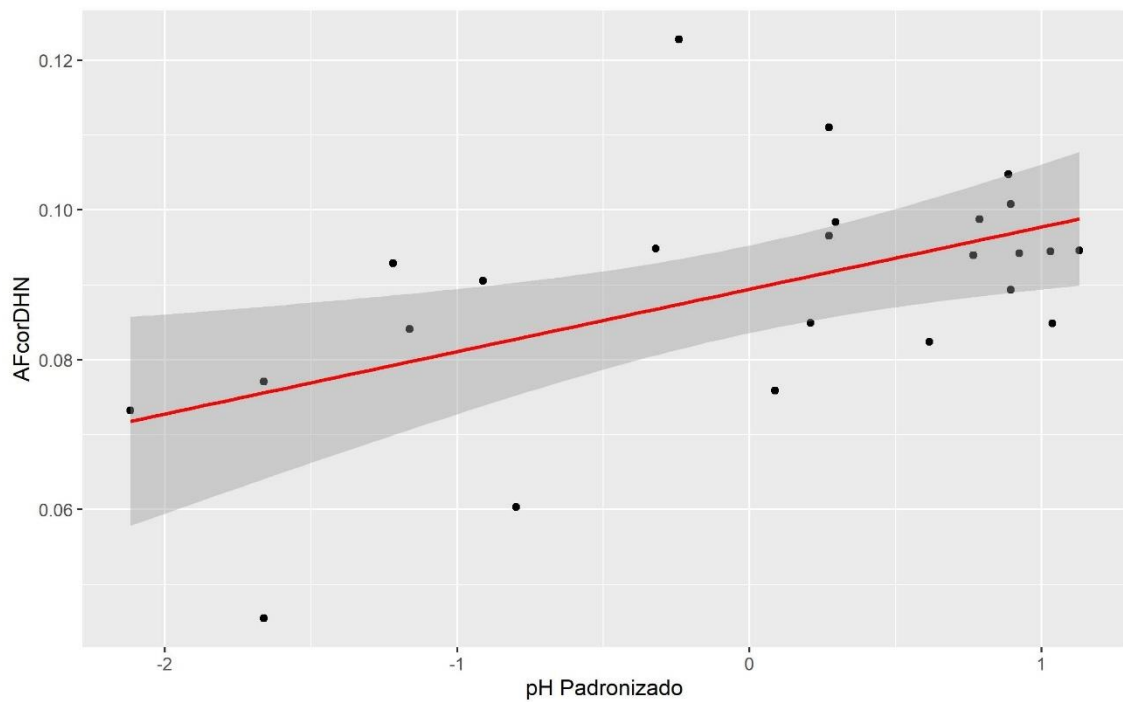


Figura 28. Aumento do índice de assimetria flutuante corrigida (AFcor) do diâmetro horizontal das narinas (DHN) de *Pithecopus ayeaye* em relação ao aumento do valor de pH dos corpos d'água.

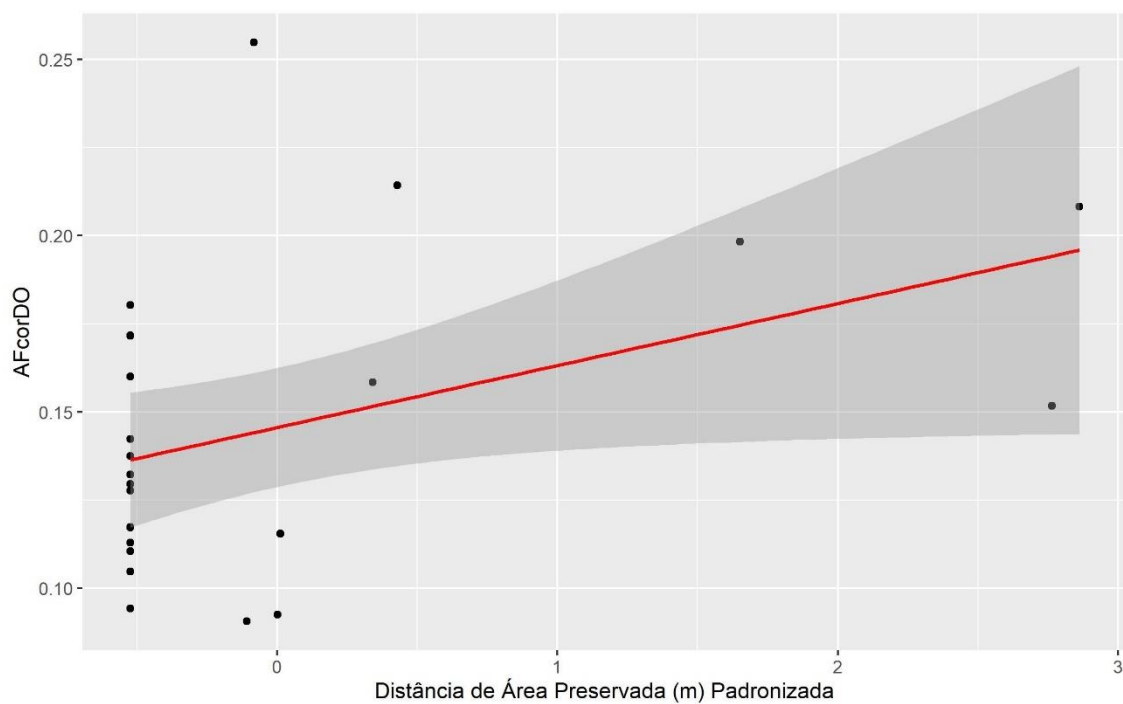


Figura 29. Aumento do índice de assimetria flutuante corrigida (AFcor) do diâmetro do olho (DO) de *Pithecopus ayeaye* em relação a maior distância dos corpos d'água a áreas preservadas.

A variável de anomalias foi a que mais apresentou correlações em comparação aos demais traços. Populações com maiores índices de anomalias se encontravam em ambientes de temperaturas mais baixas ($r^2 = 0.378$; $F = 13.158$; $p < 0.0011$; Figura 30), com maior uso antrópico do solo em 500 metros ($r^2 = 0.524$; $F = 18.746$; $p < 0.0008$; Figura 31) e maior concentração de fósforo total ($r^2 = 0.204$; $F = 5.879$; $p < 0.0006$; Figura 32). O melhor modelo selecionado para a variável de anomalias era explicado pela interação entre as variáveis “distância de centro urbano mais próximo”, “concentração de fósforo total”, “uso do solo em 1000 metros”, “uso do solo em 500 metros” e “temperatura”, entretanto as relações entre a variável resposta e os parâmetros “distância de centro urbano mais próximo” e “uso do solo em 1000 metros” não foram significativas. A relação entre a assimetria flutuante encontrada para o diâmetro vertical das narinas e “sólidos totais” não foi significativa.

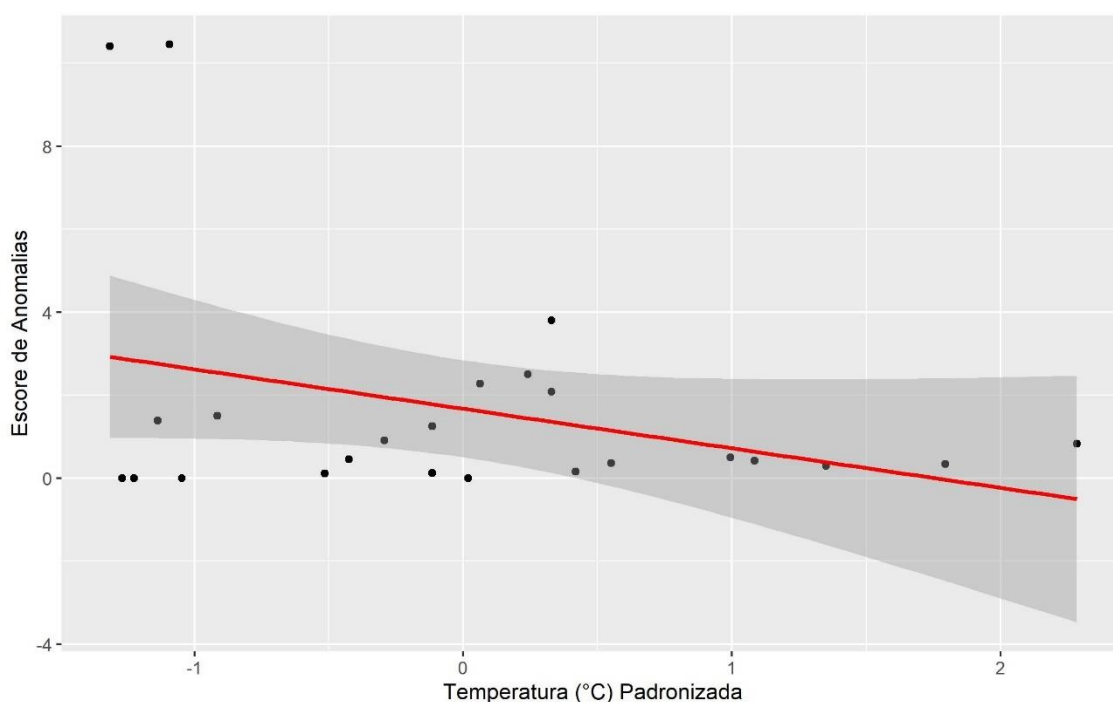


Figura 30. Redução do score de anomalias de *Pithecopus ayeaye* em relação ao aumento da temperatura dos corpos d'água.

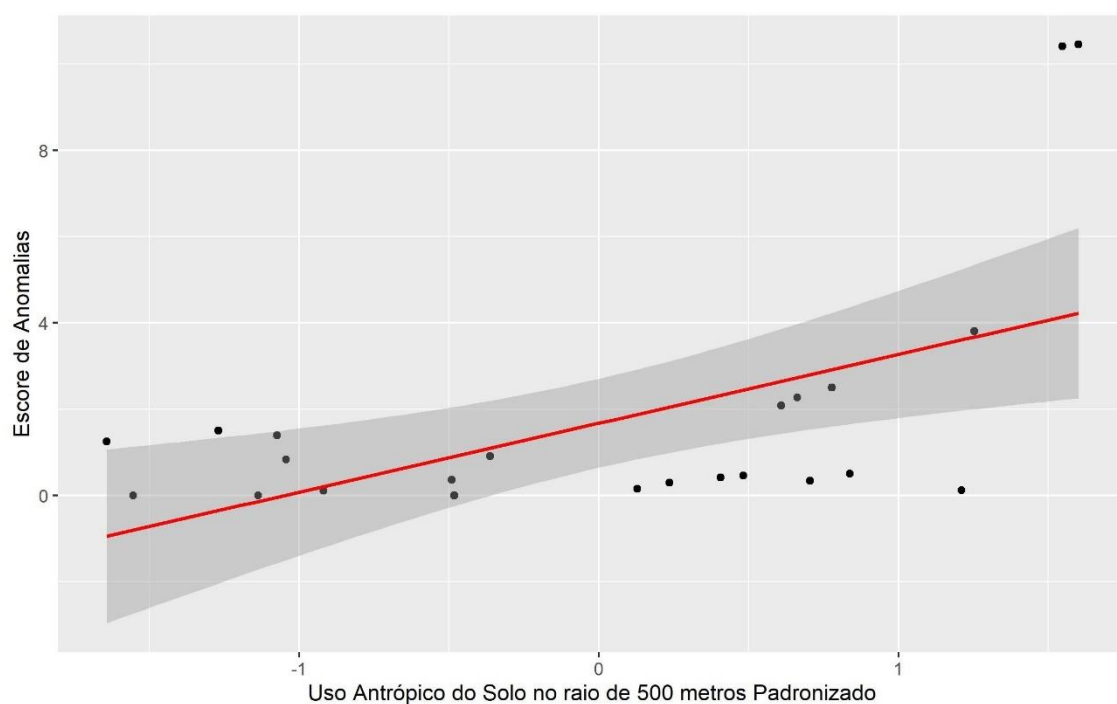


Figura 31. Aumento do score de anomalias de *Pithecopus ayeaye* em relação a maior uso antrópico do solo no raio de 500 metros.

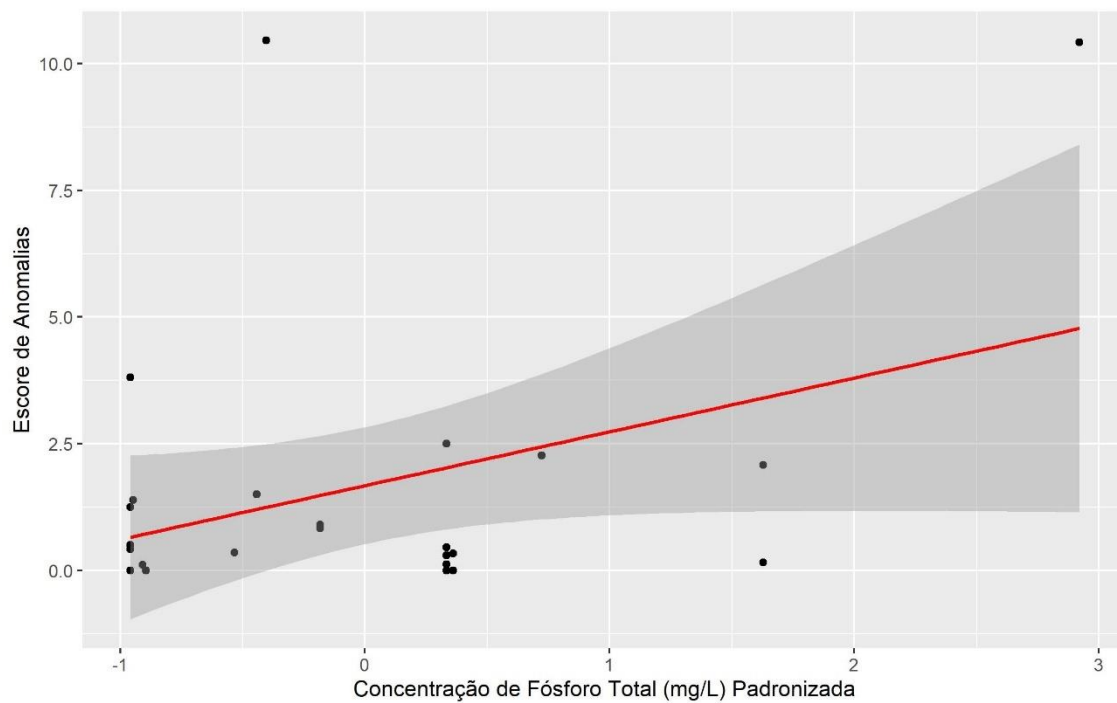


Figura 32. Aumento do escore de anomalias de *Pithecopus ayeaye* em relação a maior concentração de fósforo total nos corpos d'água.

3.5. Assimetria flutuante – Morfometria geométrica

O erro de digitalização de marcos anatômicos foi significativamente menor que o erro de posicionamento, que por sua vez foi inferior a diferença entre os indivíduos. Não houve AF significativa na variação do contorno do bico córneo, mas os valores obtidos para AD foram significativos (Tabela 6), logo os dados de morfometria geométrica não foram utilizados nas análises posteriores.

Tabela 6. Resultado da Procrustes ANOVA da variação da forma do bico córneo de *Pithecopus ayeaye*.

Efeito	SS	MS	df	F	P (param.)
Indivíduo	4.54742908	0.0005618272	8094	21.93	<.0001
Lado	0.00192759	0.0001014523	19	3.96	<.0001
Ind * Lado	0.20733007	0.0000256153	8094	0.78	1.0000
Erro 1	0.53486265	0.0000329633	16226	14.51	<.0001
Resíduo	0.07371152	0.0000022714	32452		

4. DISCUSSÃO

Todos os traços morfométricos mensurados nos girinos de *Pithecopus ayeaye* apresentaram assimetria flutuante (AF) e apenas o diâmetro vertical das narinas (DVN) não se correlacionou com nenhuma variável ambiental avaliada. Esta variação entre lados de estruturas morfológicas constitui ruídos que são inerentes aos sistemas de desenvolvimento e refletem na capacidade individual dos organismos em expressarem seus fenótipos (Palmer & Strobeck 2003; Zakharov et al. 2020). Diferentes níveis de AF podem ser um indicativo da qualidade dos ambientes sob os quais os organismos se desenvolveram (Palmer 1996; Møller & Manning 2003), uma vez que perturbações ambientais podem elevar os níveis de AF das populações afetadas (Dongen 2006; Graham et al. 2010; Graham 2021) e atuar como pressão seletiva contra a sobrevivência dos organismos. É esperado, então, que a seleção natural favoreça níveis de AF mais baixos, visto que os ruídos do desenvolvimento afetam negativamente a aptidão (Markow, 1995; Møller, 1997; Møller & Manning, 2003).

Observamos que as populações de *P. ayeaye* apresentaram maiores níveis de assimetria flutuante corrigida (AFcor) do diâmetro do olho (DO) quanto mais distantes

de áreas naturais preservadas. O trabalho de Costa et al., (2017) demonstrou que girinos de *Scinax fuscomarginatus* apresentaram aumento dos níveis de AF DO em ambientes com menor vegetação marginal. Além disso, experimentos demonstraram que girinos de *Physalaemus cuvieri* que sofreram exposição crônica ao herbicida RoundUp Original® apresentaram maiores desvios de simetria no DO (Costa & Nomura, 2016). Assim, apesar de não termos avaliado a exposição a herbicidas, é possível que o DO de girinos responda a alterações microambientais e de paisagem, constituindo um bom traço a ser aferido em análises de AF em girinos. Com os nossos resultados referentes a AFcorDO em conjunto aos de Costa et al. (2017), podemos presumir que a integridade da cobertura vegetal natural próxima aos corpos d'água amortece impactos externos que podem refletir em AF.

A turbidez foi a variável ambiental a qual as variações de simetria encontrada responderam mais frequentemente. Populações de corpos d'água mais cristalinos apresentaram AFcor da distância olho-narina (DON) e índices compostos de assimetria flutuante corrigida (CFAcor) mais elevados. A turbidez pode ter múltiplas origens, podendo ser inofensivas, como as ocasionadas pelo revolvimento do solo e matéria orgânica, ou nocivas, como resultantes da presença de contaminantes químicos e agente microbiológicos, que podem interferir na qualidade ambiental (World Health Organization, 2017). Ambientes turvos possuem incidência de luz solar reduzida, o que consequentemente, diminui a visibilidade da água e reduz a sobrevivência de organismos fotossintetizantes, o que pode levar desoxigenação do meio aquático (Davies-Colley & Smith, 2001). Níveis mais altos de turbidez podem reduzir a capacidade competitiva e a eficiência alimentar de larvas de anfíbios, como demonstrado para a salamandra *Ambystoma mexicanum* (Chaparro-Herrera et al., 2020). Apesar dos efeitos negativos da turbidez serem esperados para os anfíbios, não foi o padrão que observamos em nosso trabalho. No presente estudo, o valor mais extremo referente a turbidez (Figuras 21 e 22) corresponde a uma drenagem cujo período de amostragem ocorreu em um dia chuvoso. Provavelmente, houve um aumento do fluxo de água e movimentação de sedimentos, o que pode ter influenciado no resultado obtido. Nesse sentido, não podemos descartar a hipótese de que a correlação observada seja meramente espúria, principalmente devido ao baixo coeficiente de correlação. Entretanto, outros pontos também foram amostrados durante períodos chuvosos e não apresentaram valores tão altos de turbidez.

Neste sentido, levantamos duas hipóteses. A primeira é a de que águas mais translúcidas poderiam também proporcionar melhor visibilidade de objetos estressores, como potenciais predadores de girinos de *P. ayeaye*, agindo como uma perturbação ao desenvolvimento dos indivíduos. Sendo assim, ambientes mais turvos reduziram a capacidade visual dos predadores e proporcionariam uma maior proteção aos girinos (Chaparro-Herrera et al., 2020). Predadores invertebrados, como náíades de Odonata e Belostomatidae, que utilizam o sistema visual como um dos componentes sensoriais para a detecção de presas (Espanha et al., 2016), são comuns e abundantes nos ambientes de desenvolvimento de *P. ayeaye*. A relação entre a presença e abundância de predadores visualmente orientados e a interação com a turbidez da água influenciando nos desvios de desenvolvimento em girinos permanece por ser testada. A segunda hipótese é baseada na sugestão de Palmer & Strobeck (1986), de que traços que possuem menor importância funcional tenderiam a apresentar níveis de AF mais elevados, pois estariam submetidos a pressões seletivas mais fracas. Enquanto isso, estruturas diretamente associadas a aptidão, estariam sob pressões mais fortes e apresentariam níveis mais baixos de AF (Palmer & Strobeck 1986). Desta forma, a variável DON poderia apresentar menor significado funcional sob as condições vivenciadas pelos organismos. O CFAcor, por sua vez, é considerado um parâmetro com maior poder de explicação quando comparado a AF de traços individuais, visto que a cada traço adicionado, o grau de liberdade das estimativas é aumentado (Graham, 2021; Leung et al., 2000; Palmer & Strobeck, 2003). Entretanto, nesta abordagem não é possível compreender os efeitos dos desvios sobre a funcionalidade das estruturas incluídas no índice, tornando abordagens de traços individuais mais vantajosas (Costa, 2014).

Observamos que populações de corpos d'água mais alcalinos, apresentaram índices de AFcor do diâmetro horizontal das narinas (DHN) mais elevados. O efeito do pH sobre a estabilidade do desenvolvimento (ED) em anfíbios ainda tem sido pouco explorado (e.g., Söderman et al., 2007; Thabab et al., 2014). Söderman et al. (2007) detectaram que adultos de ambientes acidificados apresentaram maiores níveis de AF nos elementos esqueléticos, em relação aos de ambientes neutros. A acidez pode agir como efeito limitante para a sobrevivência dos anuros, entretanto algumas espécies têm demonstrado certa adaptação a esses ambientes (Gosner & Black, 1957; Räsänen et al., 2003). Também foi demonstrado que girinos de *Hyla annectans*, tanto de ambientes ácidos, quanto alcalinos, apresentaram deformidades no bico córneo, redução e perda de

dentículos, entre outros efeitos negativos (Thabab et al. 2014). No nosso estudo, os corpos d'água das populações com índices de AFcor mais baixos corresponderam em sua maioria a ambientes de pH ácido. Com isso, podemos inferir que ambientes na faixa de pH entre 4.9 e 7.5 proporcionam melhores condições de desenvolvimento aos girinos de *P. ayeaye*. Considerando a amostragem realizada neste estudo, notamos que muitos dos corpos d'água mais alcalinos se localizavam próximos a áreas agrícolas, que geralmente requerem preparos para o cultivo. Uma das etapas da preparação desses cultivos é a calagem do solo, que consiste na incorporação de materiais de caráter básico, cujo objetivo é a redução da acidez do solo. Comumente, são utilizados calcita (CaCO_3) e dolomita (MgCO_3), que constituem a principal fonte da alcalinidade da água (Boyd et al., 2016). Desta forma, a proximidade das drenagens de áreas agrícolas poderia favorecer a deposição desses compostos na água, alterando o seu pH e interferindo no desenvolvimento dos girinos.

O índice de anomalia das populações foi a variável que respondeu mais fortemente aos parâmetros ambientais avaliados. O número total de anomalias e seus padrões de distribuição variaram entre as populações e foram explicados principalmente por perturbações antrópicas do ambiente. As alterações foram predominantemente encontradas no disco oral dos girinos, especialmente nos dentículos. O disco oral é a principal via de contato do indivíduo com os fatores externos, principalmente por estar envolvido na obtenção de alimentos (Wassersug & Yamashita, 2001), o que pode estar relacionado a concentração de anomalias nestas estruturas. Poucas populações apresentaram taxas de anomalias dentro do esperado para populações saudáveis (< 5%; Blaustein & Johnson, 2003).

As populações apresentaram maiores índices de anomalias em locais com maiores atividades antrópicas no raio de 500 metros. Vale ressaltar que o uso antrópico do solo mais expressivo encontrado em nossa área de estudo correspondeu a atividades agropecuárias (Tabela S6). As populações de Poços de Caldas - MG (PT07 e PT08; Figura 7) apresentaram índices de anomalias mais elevados que as demais populações e estavam localizadas em ambientes com uso antrópico do solo acima de 79%. A população PT07 estava localizada à jusante de uma plantação de batatas em que os proprietários utilizavam o herbicida glifosato (Mireile Reis do Santos, comunicação pessoal). O uso de herbicidas tem sido frequentemente relacionado a ocorrência de anomalias em girinos, principalmente em estruturas do disco oral (Babini et al., 2016; Blaustein et al., 2003;

Borges et al., 2019; Herek et al., 2020; Pinelli et al., 2019; Slaby et al., 2019). Estudos têm evidenciado como anomalias de estruturas bucais de girinos diminuem sua eficiência alimentar e consequentemente, reduzem sua taxa de crescimento, prolongam sua fase larval, aumentam a susceptibilidade dos indivíduos a predadores e outros prejuízos ao seu desenvolvimento (Tolledo et al., 2014; Venesky et al., 2010). A população PT08 se encontrava em uma área de pastagem que tinha sofrido incêndio prévio. Não encontramos estudos que relacionem o efeito do fogo e anomalias em girinos. Da mesma forma, populações de ambientes com concentrações elevadas de fósforo total apresentaram maior índice de anomalias. O fósforo é um dos principais nutrientes incorporados em fertilizantes e sua presença em corpos d'água é amplamente detectada em regiões de atividades agropecuárias (Bishop et al., 1999; Peltzer et al., 2008). Apesar dos fertilizantes serem prejudiciais para algumas espécies de anfíbios, afetando o desenvolvimento e sobrevivência de girinos, reduzindo o sucesso reprodutivo dos adultos e elevando a susceptibilidade a infecções parasitárias (Bishop et al., 1999; Hamer et al., 2004; Rohr et al., 2008), diferentes concentrações de fósforo não foram correlacionadas ao aumento de anomalias para outras espécies (Bishop et al., 1999; Earl & Whiteman, 2010; Hamer et al., 2004; Smith, 2007). Entretanto, concentrações elevadas de fósforo em conjunto com outros estressores podem causar efeitos negativos indiretos sobre os girinos (Earl & Whiteman, 2010; Peltzer et al., 2008). Além disso, altas concentrações de fósforo estão relacionadas ao aumento do pH da água, que pode interferir na performance e desenvolvimento dos girinos e reduzir a disposição de alimentos no ambiente (Earl & Whiteman, 2010; Thabab et al., 2014).

Uma das populações estudadas, do município de Araxá – MG, apresentou índice de anomalias intermediário e estava em ambiente de atividades agrícolas, com pastagem natural mesclada com *Brachiaria* sp.. Além disso, a drenagem se localizava logo abaixo de uma rodovia, onde óleos automotivos escorriam para o curso d'água (Tiago Pezzuti, observação pessoal). Óleos motores possuem diversos poluentes em sua composição, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e metais pesados como chumbo, zinco, cobre e outros que são tóxicos aos seres vivos (Vazquez-Duhalt, 1989). Estes componentes, principalmente os metais pesados, podem atuar como estressores ambientais, causando degradação de brânquias, mudanças de coloração, perda de estruturas orais, malformações do condrocrânio e redução do comprimento total de girinos (Chai et al., 2022; Motta et al., 2020; Pinto Vidal et al., 2021; Spence et al., 2016).

Destaca-se que ainda não há informações sobre a presença de metais pesados nos ambientes reprodutivos de *P. ayeaye* e seus efeitos sobre o desenvolvimento, reforçando a necessidade de futuros estudos sobre os efeitos destes poluentes sobre a espécie.

As anomalias orais mais frequentes nas populações do município de Poços de Caldas - MG foram a perda e despigmentação de dentículos, deformação e despigmentação do bico córneo e perda dos lábios. Apesar de estarem possivelmente relacionadas a presença de contaminantes químicos no ambiente (Pinelli et al., 2019; Rowe et al., 1996; Rowe et al., 1998), a despigmentação de estruturas queratinizadas do disco oral pode também ser um indicativo de quitridiomicose (Drake et al., 2007; Fellers et al., 2001; Knapp & Morgan, 2006; Lisboa et al., 2013; Navarro-Lozano et al., 2018). Não testamos a presença do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) nos indivíduos da localidade, entretanto há registros visuais de adultos de outras espécies de anuros sintomáticos na região (Mireile Reis do Santos, comunicação pessoal). Impactos de atividades antrópicas sobre a paisagem podem proporcionar condições favoráveis e promover a disseminação de doenças infecciosas (Serrano et al., 2022). Assim, não podemos descartar uma possível sinergia entre impactos diretos no ambiente e o favorecimento da infecção pela quitridiomicose na população de Poços de Caldas. Observamos também que populações de corpos d'água mais frios apresentaram índices de anomalia mais altos. Alguns trabalhos sugerem que a faixa de temperatura ideal para o desenvolvimento saudável dos girinos seria entre 20 e 25 °C e indivíduos que experienciam temperaturas extremas apresentaram desenvolvimento mais lento e anomalias (Harkey & Semlitsch, 1988; Weerathunga & Rajapaksa, 2020). As populações de Poços de Caldas, que apresentaram maiores índices de anomalia, se encontravam em ambientes mais frios (Tabela S3). Estudos demonstram que a faixa de temperatura de 17 a 25 °C favorece o crescimento de *Bd* (Bradley et al., 2002; Longcore et al., 1999; Piotrowski et al., 2004), coincidindo com a hipótese de sinergia de impactos levantada em nosso estudo.

Os resultados obtidos em relação a AFcorDO, a AFcorDHN e as anomalias corroboraram a nossa hipótese de que populações de ambientes mais perturbados apresentariam maiores desvios de desenvolvimento, quando comparados as populações de ambientes mais preservados. Percebemos também que a AF foi mais sensível em detectar perturbações microambientais, como turbidez e pH, do que os impactos causados pelo uso antrópico do solo, analisado aqui em uma escala de paisagem. Apesar AF não

ter se mostrado efetiva em escalas macroambientais em alguns estudos (e.g., Eterovick et al. 2015), incentivamos o uso de outras métricas de paisagem (i.e., distância de áreas preservadas) e uma classificação mais refinada das matrizes obtidas. As anomalias, por sua vez, responderam mais fortemente as variáveis analisadas, inclusive em escala de paisagem. Entretanto, os desvios de desenvolvimento observados nas populações de *P. ayeaye* não foram respondidos pelo preditor “uso antrópico do solo no raio de 1000 metros”, o que nos leva a inferir que a espécie responde mais a impactos locais, do que em escalas mais amplas. De forma geral, a AF é considerada uma ferramenta menos sensível a estresses, quando comparada a alterações morfológicas (Moller & Maning, 2003; Dongen 2006; Graham et al., 2010). Entretanto, nosso estudo demonstra que o uso das duas ferramentas proporciona medidas mais robustas e complementares sobre a qualidade do ambiente.

Apesar dos anfíbios serem considerados animais bioindicadores (Hopkins, 2007), pouco se sabe sobre os requerimentos e condições ideais para a sobrevivência de diferentes espécies. Critérios para escolha de indicadores de qualidade ambiental são bem estabelecidos, mas raramente uma única espécie de anfíbio atende a todos (Dale & Beyeler, 2001; Sewell & Griffiths, 2009; Waddle, 2006). Através das evidências apresentadas neste estudo, tanto em relação a AF, quanto a análise de anomalias, *P. ayeaye* pode ser considerada uma espécie potencial como indicadora de qualidade ambiental, mesmo que não atenda a todas as condições propostas (e.g., distribuição da espécie em ampla área geográfica; uso de mais de uma espécie como bioindicadora). Os ambientes onde *P. ayeaye* ocorre são extremamente importantes para a manutenção da biodiversidade e da segurança hídrica do cerrado (Fernandes et al., 2020). Nosso estudo demonstra que a espécie é sensível aos impactos sofridos por estes ambientes, logo o manejo adequado de *P. ayeaye* depende da preservação das nascentes e riachos de primeira ordem onde ocorre.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA. Water Works Association & Water Environment Federation. (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (20th ed.).
- APHA. Water Works Association & Water Environment Federation. (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (21st ed.).

- Araujo, C. D. O., Condez, T. H., & Haddad, C. F. B. (2007). Amphibia, Anura, *Phyllomedusa ayeaye* (B. Lutz, 1966): distribution extension, new state record, and geographic distribution map. *Check List*, 3(2), 156. <https://doi.org/10.15560/3.2.156>
- Babini, M. S., Bionda, C. de L., Salas, N. E., & Martino, A. L. (2016). Adverse effect of agroecosystem pond water on biological endpoints of common toad (*Rhinella arenarum*) tadpoles. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188(8). <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5473-2>
- Bacon, J. P., Fort, C. E., Todhunter, B., Mathis, M., & Fort, D. J. (2013). Effects of Multiple Chemical, Physical, and Biological Stressors on the Incidence and Types of Abnormalities Observed in Bermuda's Cane Toads (*Rhinella marina*). *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 320(4), 218–237. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22496>
- Becker, C. G., & Loyola, R. D. (2008). Extinction risk assessments at the population and species level: implications for amphibian conservation. *Biodiversity and Conservation*, 17(9), 2297–2304. <https://doi.org/10.1007/s10531-007-9298-8>
- Belasen, A. M., Bletz, M. C., Leite, D. da S., Toledo, L. F., & James, T. Y. (2019). Long-term habitat fragmentation is associated with reduced MHC IIB diversity and increased infections in amphibian hosts. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6(JAN). <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00236>
- Benítez, H. A., Lemic, D., Villalobos-Leiva, A., Bažok, R., Órdenes-Claveria, R., Živković, I. P., & Mikac, K. M. (2020). Breaking symmetry: Fluctuating asymmetry and geometric morphometrics as tools for evaluating developmental instability under diverse agroecosystems. In *Symmetry* (Vol. 12, Issue 11, pp. 1–13). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/sym12111789>
- Bishop, C. A., Mahony, N. A., Struger, J., Ng, P., & Pettit, K. E. (1999). *Anuran Development, Density and Diversity in Relation to Agricultural Activity in the Holland River Watershed, Ontario, Canada (1990-1992)*.
- Blaustein, A. R., & Johnson, P. T. J. (2003). The complexity of deformed amphibians. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1(2), 87–94.
- Blaustein, A. R., Romansic, J. M., Kiesecker, J. M., & Hatch, A. C. (2003). *Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines*. <http://www.blackwellpublishing.com/journals/ddi>
- Borges, R. E., de Souza Santos, L. R., Assis, R. A., Benvindo-Souza, M., Franco-Belussi, L., & de Oliveira, C. (2019). Monitoring the morphological integrity of neotropical anurans. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(3), 2623–2634. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3779-z>
- Bowne, D. R., & Bowers, M. A. (2004). Interpatch movements in spatially structured populations: a literature review. *Landscape Ecology*, 19(1), 1–20. <https://doi.org/10.1023/B:LAND.0000018357.45262.b9>
- Boyd, C. E., Tucker, C. S., & Somridhivej, B. (2016). Alkalinity and Hardness: Critical but Elusive Concepts in Aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 47(1), 6–41. <https://doi.org/10.1111/jwas.12241>

- Bradley, G. A., Rosen, P. C., Sredl, M. J., Jones, T. R., & Longcore, J. E. (2002). Chytridiomycosis in Native Arizona Frogs. In *Journal of Wildlife Diseases* (Vol. 38, Issue 1). http://meridian.allenpress.com/jwd/article-pdf/38/1/206/2236741/0090-3558-38_1_206.pdf
- Brischoux, F., Cheron, M., Renoirt, M., & Lourdais, O. (2021). Getting ready for a long bath: skin permeability decreases prior to aquatic breeding in male toads. *The Science of Nature*, 108(6), 48. <https://doi.org/10.1007/s00114-021-01761-x>
- Brown, R. M., McClelland, N. I., Deininger, R. A., & Tozer, R. G. (1970). A Water Quality Index: Do We Dare? *Water Sewage Works*, 117(10), 339–343.
- Bulger, J. B., Scott, N. J., & Seymour, R. B. (2003). Terrestrial activity and conservation of adult California red-legged frogs *Rana aurora draytonii* in coastal forests and grasslands. *Biological Conservation*, 110(1), 85–95. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(02\)00179-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(02)00179-9)
- Burnham, K. P., & Anderson, D. R. (2004). Model Selection and Multimodel Inference. *Model Selection and Multimodel Inference*. <https://doi.org/10.1007/B97636>
- Calcagno, V., Calagno, M. V., Java, S., & Suggests, M. A. S. S. (2020). *Package “glmulti” Title Model Selection and Multimodel Inference Made Easy*.
- Carvalho, T., Guilherme Becker, C., & Toledo, L. F. (2017). Historical amphibian declines and extinctions in Brazil linked to chytridiomycosis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1848). <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2254>
- Chai, L., Jabbie, I. S., Chen, A., Jiang, L., Li, M., & Rao, H. (2022). Effects of waterborne Pb/Cu mixture on Chinese toad, *Bufo gargarizans* tadpoles: morphological, histological, and intestinal microbiota assessment. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22143-4>
- Chaparro-Herrera, D. J., Nandini, S., & Sarma, S. S. S. (2020). Turbidity effects on feeding by larvae of the endemic *Ambystoma mexicanum* and the introduced *Oreochromis niloticus* in Lake Xochimilco, Mexico. *Ecohydrology and Hydrobiology*, 20(1), 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2019.07.002>
- Costa, R. N. (2014). *Medindo os impactos do glifosato e do estresse ambiental com uma régua: assimetria flutuante e mortalidade em girinos (Amphibia: Anura) de Physalaemus cuvieri (Leptodactylidae) e Scinax fuscomarginatus (Hylidae)*.
- Costa, R. N., & Nomura, F. (2016). Measuring the impacts of Roundup Original® on fluctuating asymmetry and mortality in a Neotropical tadpole. *Hydrobiologia*, 765(1), 85–96. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2404-0>
- Costa, R. N., Solé, M., & Nomura, F. (2017). Agropastoral activities increase fluctuating asymmetry in tadpoles of two neotropical anuran species. *Austral Ecology*, 42(7), 801–809. <https://doi.org/10.1111/aec.12502>
- Cushman, S. A. (2006). Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological Conservation*, 128(2), 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.09.031>
- da Silva, M. B., Fraga, R. E., Silva, F. L., de Oliveira, L. A. A., de Queiroz, T. S., Rocha, M. A., & Juncá, F. A. (2020). Effects of acute exposure of chlorpyrifos on the survival,

- morphology and swimming ability of *Odontophrynus carvalhoi* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 15(1), 37–42. <https://doi.org/10.5132/eec.2020.01.05>
- Dale, V. H., & Beyeler, S. C. (2001). Challenges in the development and use of ecological indicators. In *Ecological Indicators* (Vol. 1).
- Davies-Colley, R. J., & Smith, D. G. (2001). Turbidity suspended sediment, and water clarity: A review. In *Journal of the American Water Resources Association* (Vol. 37, Issue 5).
- de Magalhães, R. F., Lemes, P., Camargo, A., Oliveira, U., Brandão, R. A., Thomassen, H., Garcia, P. C. de A., Leite, F. S. F., & Santos, F. R. (2017). Evolutionarily significant units of the critically endangered leaf frog *Pithecopus ayeaye* (Anura, Phyllomedusidae) are not effectively preserved by the Brazilian protected areas network. *Ecology and Evolution*, 7(21), 8812–8828. <https://doi.org/10.1002/ece3.3261>
- de Oliveira, F. F. R. (2017). Mating behaviour, territoriality and natural history notes of *Phyllomedusa ayeaye* Lutz, 1966 (Hylidae: Phyllomedusinae) in south-eastern Brazil. *Journal of Natural History*, 51(11–12), 657–675. <https://doi.org/10.1080/00222933.2017.1296196>
- Didde, R. D., & Rivera, G. (2019). Patterns of fluctuating asymmetry in the limbs of anurans. *Journal of Morphology*, 280(4), 587–592. <https://doi.org/10.1002/jmor.20967>
- do Amaral, D. F., Montalvão, M. F., de Oliveira Mendes, B., da Silva Castro, A. L., & Malafaia, G. (2018). Behavioral and mutagenic biomarkers in tadpoles exposed to different abamectin concentrations. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(13), 12932–12946. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1562-9>
- Dongen, S. v. (2006). Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary biology: past, present and future. *Journal of Evolutionary Biology*, 19(6), 1727–1743. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2006.01175.x>
- Drake, D. L., Altig, R., Grace, J. B., & Walls, S. C. (2007). Occurrence of Oral Deformities in Larval Anurans. *Copeia*, 449–458
- Draper, N. R., & Smith, H. (1998). *Applied Regression Analysis*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118625590>
- Earl, J. E., & Whiteman, H. H. (2010). Evaluation of phosphate toxicity in cope's gray treefrog (*Hyla chrysoscelis*) tadpoles. *Journal of Herpetology*, 44(2), 201–208. <https://doi.org/10.1670/08-183.1>
- Ebrahim, Z., de Villiers, A., & Measey, J. (2020). Assessing water conditions for *Heleophryne rosei* tadpoles and the conservation relevance. *Koedoe*, 62(1), 1–6. <https://doi.org/10.4102/KOEDOE.V62I1.1581>
- Eisemberg, C. C., & Bertoluci, J. (2016). Fluctuating asymmetry in populations of the South American frog *Physalaemus cuvieri* (Leptodactylidae) in areas with different degrees of disturbance. *Journal of Natural History*, 50(23–24), 1503–1511. <https://doi.org/10.1080/00222933.2015.1130871>
- Espanha, J., de Vasconcelos, M. F., & Eterovick, P. C. (2016). The role of tadpole coloration against visually oriented predators. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 70(2), 255–267. <https://doi.org/10.1007/s00265-015-2044-4>

- Eterovick, P. C., Bar, L. F. F., Souza, J. B., Castro, J. F. M., Leite, F. S. F., & Alford, R. A. (2015). Testing the relationship between human occupancy in the landscape and tadpole developmental stress. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120172>
- Fellers, G. M., Green, E. D., & Longcore, J. E. (2001). Oral chytridiomycosis in the mountain yellow-legged frog (*Rana muscosa*). *Copeia*, 4, 945–953. [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2001\)001\[0945:OCITMY\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2001)001[0945:OCITMY]2.0.CO;2)
- Fernandes, G. W., Arantes-Garcia, L., Barbosa, M., Barbosa, N. P. U., Batista, E. K. L., Beiroz, W., Resende, F. M., Abrahão, A., Almada, E. D., Alves, E., Alves, N. J., Angrisano, P., Arista, M., Arroyo, J., Arruda, A. J., Bahia, T. de O., Braga, L., Brito, L., Callisto, M., ... Silveira, F. A. O. (2020). Biodiversity and ecosystem services in the Campo Rupestre: A road map for the sustainability of the hottest Brazilian biodiversity hotspot. In *Perspectives in Ecology and Conservation* (Vol. 18, Issue 4, pp. 213–222). Associacao Brasileira de Ciencia Ecologica e Conservacao. <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2020.10.004>
- Finnerty, J. R. (2004). Origins of Bilateral Symmetry: Hox and Dpp Expression in a Sea Anemone. *Science*, 304(5675), 1335–1337. <https://doi.org/10.1126/science.1091946>
- Forti, L. R., Becker, C. G., Tacioli, L., Pereira, V. R., Santos, A. C. F. A., Oliveira, I., Haddad, C. F. B., & Toledo, L. F. (2017). Perspectives on invasive amphibians in Brazil. *PLoS ONE*, 12(9), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184703>
- Fox, J., Weisberg, S., Price, B., Adler, D., Bates, D., Baud-Bovy, G., Bolker, B., Ellison, S., Firth, D., Friendly, M., Gorjanc, G., Graves, S., Heiberger, R., Krivitsky, P., Laboissiere, R., Maechler, M., Monette, G., Murdoch, D., Nilsson, H., ... Zeileis, A. (2022). *Package “car.”* <https://r-forge.r-project.org/projects/car/>
- Frost, D.R. (2021) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.1. American Museum of Natural History, New York, USA. Available from: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html> (accessed 02 October 2022)
- Gosner, K. L. (1960). A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. *Herpetologica*, 16(3), 183–190.
- Gosner, K. L., & Black, I. H. (1957). The Effects of Acidity on the Development and Hatching of New Jersey Frogs. In *Source: Ecology*. 38(2). <http://www.jstor.org/stable/1931684>
- Graham, J. H. (2021). Fluctuating asymmetry and developmental instability, a guide to best practice. In *Symmetry*. 13(1), 1–8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/sym13010009>
- Graham, J. H., Raz, S., Hel-Or, H., & Nevo, E. (2010b). Fluctuating asymmetry: Methods, theory, and applications. In *Symmetry*. 2(2), 466–540). <https://doi.org/10.3390/sym2020466>
- Grubbs, F. E. (1969). Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. *Technometrics*, 11(1), 1–21. <https://doi.org/10.1080/00401706.1969.10490657>
- Hamer, A. J., Makings, J. A., Lane, S. J., & Mahony, M. J. (2004). Amphibian decline and fertilizers used on agricultural land in south-eastern Australia. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 102(3), 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2003.09.027>
- Harkey, G. A., & Semlitsch, R. D. (1988). Effects of Temperature on Growth, Development, and Color Polymorphism in the Ornate Chorus Frog *Pseudacris ornata*. *Copeia*, 1988(4), 1001. <https://doi.org/10.2307/1445724>

- Henle, K., Dubois, A., & Vershinin, V. (2017a). A review of anomalies in natural populations of amphibians and their potential causes. *Mertensiella* 25, 57-164
- Henle, K., Dubois, A., & Vershinin, V. (2017b). Commented glossary, terminology and synonymies of anomalies in natural populations of amphibians. *Mertensiella*, 25, 9-48
- Herek, J. S., Vargas, L., Trindade, S. A. R., Rutkoski, C. F., Macagnan, N., Hartmann, P. A., & Hartmann, M. T. (2020). Can environmental concentrations of glyphosate affect survival and cause malformation in amphibians? Effects from a glyphosate-based herbicide on *Physalaemus cuvieri* and *P. gracilis* (Anura: Leptodactylidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 27(18), 22619–22630. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08869-z>
- Hopkins, W. A. (2007). Amphibians as Models for Studying Environmental Change. *ILAR Journal*, 48(3), 270–277. <https://doi.org/10.1093/ilar.48.3.270>
- IUCN 2022. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-1. <https://www.iucnredlist.org>
- Johnson, P. T. J., & Chase, J. M. (2004). Parasites in the food web: Linking amphibian malformations and aquatic eutrophication. In *Ecology Letters* (Vol. 7, Issue 7, pp. 521–526). <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00610.x>
- Johnson, P. T., Lunde, K. B., Ritchie, E. G., & Reaser, J. K. (2001). Herpetologists' League Morphological Abnormality Patterns in a California Amphibian Community. In *Launer Source: Herpetologica* (Vol. 57, Issue 3). <http://www.jstor.org>
- Klingenberg, C. P., Barluenga, M., & Meyer, A. (2002). Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution*, 56(10), 1909-1920.
- Klingenberg, C. P. (2003). A Developmental Perspective on Developmental Instability: Theory, Models, and Mechanisms. In M. Polak (Ed.), *Developmental Instability: Causes and Consequences* (1 st, pp. 14–34). Oxford University Press.
- Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11(2), 353–357. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x>
- Klingenberg, C. P. (2015). Analyzing fluctuating asymmetry with geometric morphometrics: Concepts, methods, and applications. In *Symmetry* 7(2), 843–934. <https://doi.org/10.3390/sym7020843>
- Knapp, R. A., & Morgan, J. A. T. (2006). Tadpole Mouthpart Depigmentation as an Accurate Indicator of Chytridiomycosis, an Emerging Disease of Amphibians. *Copeia*, 2, 188-197
- Leung, B., Forbes, M. R., & Houle, D. (2000). Fluctuating Asymmetry as a Bioindicator of Stress: Comparing Efficacy of Analyses Involving Multiple Traits. *The American Naturalist*, 155(1), 101–115. <https://doi.org/10.1086/303298>
- Lisboa, B. S., Neves, J., Augusto, F., & Tavares-Bastos, L. (2013). New records of *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Atlantic Forest of Northeastern Brazil. In *Article in North-Western Journal of Zoology*. <http://biozoojournals.3x.ro/nwjz/index.html>
- Londero, J. E. L., Santos, M. B. dos, & Schuch, A. P. (2019). Impact of solar UV radiation on amphibians: focus on genotoxic stress. In *Mutation Research - Genetic Toxicology and*

- Environmental Mutagenesis* (Vol. 842, pp. 14–21). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.03.003>
- Longcore, J. E., Pessier, A. P., & Nichols, D. K. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91(2), 219–227.
<https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061011>
- López-Aguirre, C., Hand, S. J., Koyabu, D., Tu, V. T., & Wilson, L. A. B. (2021). Prenatal Developmental Trajectories of Fluctuating Asymmetry in Bat Humeri. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.639522>
- Magalhães, R., Gorgulho, H. F., Campello, S., Domingos, F., Freire, I., Oswald, C., Santos, D., Pezzuti, T., Santos, F., Lemes, P., Strüssmann, C., Coelho, M., Colli, G., del Prette, A., Vasconcelos, B., & Brandão, R. (2021). Conserving the poorly known and threatened monkey-frogs of the Brazilian Cerrado highlands. *Oryx*, 54(4), 440–441.
<https://doi.org/10.1017/S0030605320000241>
- Mardia, K. V., Bookstein, F. L., & Moreton, I. J. (2000). Statistical assessment of bilateral symmetry of shapes. *Biometrika*, 285–300.
- Markow, T. A. (1995). Evolutionary ecology and developmental instability. *Annual Review of Entomology*. Vol. 40. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.40.1.105>
- Meteyer, C. U. (2000). *Field Guide to Malformations of Frogs and Toads: with radiographic interpretations*. US Geological Survey.
- Miot, H. A. (2017). Avaliação da normalidade dos dados em estudos clínicos e experimentais. *Jornal Vascular Brasileiro*, 16(2), 88–91. <https://doi.org/10.1590/1677-5449.041117>
- Møller, A. P. (1997). Developmental stability and fitness: A review. *American Naturalist*, 149(5), 916–932. <https://doi.org/10.1086/286030>
- Møller, A. P., & Manning, J. (2003). Growth and developmental instability. *Veterinary Journal*, 166(1), 19–27. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(02\)00262-9](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(02)00262-9)
- Motta, A. G. C., do Amaral, D. F., Benvindo-Souza, M., Rocha, T. L., & de Melo e Silva, D. (2020). Genotoxic and mutagenic effects of zinc oxide nanoparticles and zinc chloride on tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Anura: Ranidae). *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 14. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100356>
- Navarro-Lozano, A., Sánchez-Domene, D., Rossa-Feres, D. C., Bosch, J., & Sawaya, R. J. (2018). Are oral deformities in tadpoles accurate indicators of anuran chytridiomycosis? *PLoS ONE*, 13(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190955>
- Nunes-de-Almeida, C. H. L., Haddad, C., & Toledo, L. F. (2021). A revised classification of the amphibian reproductive modes. *Salamandra* 57(3), 413–427
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., & Wagner, H. (2022). *Package “vegan”: Community Ecology Package*.
- Palmer, A. R. (1994). *Fluctuating Asymmetry Analyses: A Primer*. (pp. 335–364). Springer, Dordrecht.
- Palmer, A. R. (1996). Waltzing with Asymmetry: Is fluctuating asymmetry a powerful new tool for biologists or just an alluring new dance step? *BioScience*, 46(7), 518–532.

- Palmer, A. R., & Strobeck, C. (1986). *Fluctuating Asymmetry: Measurement, Analysis, Patterns* (Vol. 17). <https://www.jstor.org/stable/2097002?seq=1&cid=pdf->
- Palmer, A. R., & Strobeck, C. (2003). Fluctuating asymmetry analyses revisited. In *Developmental Instability: Causes and Consequences*.
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Sánchez-Hernandez, J. C., Cabagna, M. C., Attademo, A. M., & Bassó, A. (2008). Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(1), 185–197. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.06.005>
- Pezzuti, T. L., Leite, F. S. F., & Nomura, F. (2009). The Tadpole of *Phyllomedusa itacolomi* (Anura, Hylidae), with a Description of the Internal Oral Morphology. *South American Journal of Herpetology*, 4(2), 117–124. <https://doi.org/10.2994/057.004.0203>
- Pinelli, C., Santillo, A., Chieffi Baccari, G., Falvo, S., & di Fiore, M. M. (2019). Effects of chemical pollutants on reproductive and developmental processes in Italian amphibians. In *Molecular Reproduction and Development* (Vol. 86, Issue 10, pp. 1324–1332). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/mrd.23165>
- Pinto Vidal, F. A., Abdalla, F. C., Carvalho, C. dos S., Moraes Utsunomiya, H. S., Teixeira Oliveira, L. A., Salla, R. F., & Jones-Costa, M. (2021). Metamorphic acceleration following the exposure to lithium and selenium on American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111101>
- Piotrowski, J. S., Annis, S. L., & Longcore, J. E. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a Chytrid Pathogen of Amphibians. *Mycologia*, 96(1), 9. <https://doi.org/10.2307/3761981>
- Räsänen, K., Laurila, A., & Merila, J. (2003). Geographic variation in acid stress tolerance of the moor frog, *Rana arvalis*. I. Local adaptation. In *Evolution* (Vol. 57, Issue 2). <http://www.internat.environ.se/index>.
- QGIS.org, %Y. QGIS Geographic Information System. QGIS Association. <http://www.qgis.org>
- R Core Team, 2022. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena. <https://www.r-project.org>.
- Rohlf, F. J. (1990). Morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21(1), 299–316. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.21.110190.001503>
- Rohlf, F. J. (2015). The tps series of software. *Hystrix*, 26(1), 1–4. <https://doi.org/10.4404/hystrix-26.1-11264>
- Rohlf, J. F. (2017). tpsDig2, digitize landmarks and outlines. In *Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook*.
- Rohr, J. R., Schotthoefer, A. M., Raffel, T. R., Carrick, H. J., Halstead, N., Hoverman, J. T., Johnson, C. M., Johnson, L. B., Lieske, C., Piwoni, M. D., Schoff, P. K., & Beasley, V. R. (2008). Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature*, 455(7217), 1235–1239. <https://doi.org/10.1038/nature07281>

- Rowe, C. L., Hopkins, W. A., & Bridges, C. (2003). Physiological ecology of amphibians in relation to susceptibility to natural and anthropogenic factors. In *Amphibian decline: an integrated analysis of multiple stressor effects* (pp. 9–57).
- Rowe, C. L., Kinney, O. M., & Congdon, J. D. (1998). Oral Deformities in Tadpoles of the Bullfrog (*Rana catesbeiana*) Caused by Conditions in a Polluted Habitat. *Copeia*, 1998(1), 244. <https://doi.org/10.2307/1447729>
- Rowe, C. L., Owen, K., Fiori, A., & Congdon, J. (1996). Oral deformities in tadpoles (*Rana catesbeiana*) associated with coal ash deposition: effects on grazing ability and growth. *Freshwater Biology*, 36(3), 723–730. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1996.00123.x>
- Ruggeri, J., Ribeiro, L. P., Pontes, M. R., Toffolo, C., Candido, M., Carriero, M. M., Zanella, N., Sousa, R. L. M., & Toledo, L. F. (2019). Discovery of Wild Amphibians Infected with Ranavirus in Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*, 55(4), 897. <https://doi.org/10.7589/2018-09-224>
- Sanseveriano, A. M., & Nessimian, J. L. (2008). Assimetria Flutuante Em Organismos Aquáticos E Sua Aplicação Para Avaliação De Impactos Ambientais. *Oecologia Australis*, 12(03), 382–405. <https://doi.org/10.4257/oeco.2008.1203.03>
- Scheele, B. C., Pasmans, F., Skerratt, L. F., Berger, L., Martel, A., Beukema, W., Acevedo, A. A., Burrowes, P. A., Carvalho, T., Catenazzi, A., de la Riva, I., Fisher, M. C., Flechas, S. v., Foster, C. N., Frías-Álvarez, P., Garner, T. W. J., Gratwicke, B., Guayasamin, J. M., Hirschfeld, M., ... Canessa, S. (2019). Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science*, 363(6434), 1459–1463. <https://doi.org/10.1126/science.aav0379>
- Serrano, J. de A., Toledo, L. F., & Sales, L. P. (2022). Human impact modulates chytrid fungus occurrence in amphibians in the Brazilian Atlantic Forest. *Perspectives in Ecology and Conservation*, 20(3), 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2022.05.002>
- Sewell, D., & Griffiths, R. A. (2009). Can a single amphibian species be a good biodiversity indicator? *Diversity*, 1(2), 102–117. <https://doi.org/10.3390/d1020102>
- Silveira, F. A. O., Negreiros, D., Barbosa, N. P. U., Buisson, E., Carmo, F. F., Carstensen, D. W., Conceição, A. A., Cornelissen, T. G., Echternacht, L., Fernandes, G. W., Garcia, Q. S., Guerra, T. J., Jacobi, C. M., Lemos-Filho, J. P., le Stradic, S., Morellato, L. P. C., Neves, F. S., Oliveira, R. S., Schaefer, C. E., ... Lambers, H. (2016). Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. *Plant and Soil*, 403(1–2), 129–152. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2637-8>
- Slaby, S., Marin, M., Marchand, G., & Lemiere, S. (2019). Exposures to chemical contaminants: What can we learn from reproduction and development endpoints in the amphibian toxicology literature? In *Environmental Pollution* (Vol. 248, pp. 478–495). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.014>
- Smith, G. R. (2007). Lack of effect of nitrate, nitrite, and phosphate on wood frog (*Rana sylvatica*) tadpoles. *Applied Herpetology*, 4(3), 287–291.
- Söderman, F., van Dongen, S., Pakkasmaa, S., & Merilä, J. (2007). Environmental stress increases skeletal fluctuating asymmetry in the moor frog *Rana arvalis*. *Oecologia*, 151(4), 593–604. <https://doi.org/10.1007/s00442-006-0611-0>

- Souza, C. M., Z. Shimbo, J., Rosa, M. R., Parente, L. L., A. Alencar, A., Rudorff, B. F. T., Hasenack, H., Matsumoto, M., G. Ferreira, L., Souza-Filho, P. W. M., de Oliveira, S. W., Rocha, W. F., Fonseca, A. v., Marques, C. B., Diniz, C. G., Costa, D., Monteiro, D., Rosa, E. R., Vélez-Martin, E., ... Azevedo, T. (2020). Reconstructing Three Decades of Land Use and Land Cover Changes in Brazilian Biomes with Landsat Archive and Earth Engine. *Remote Sensing*, 12(17), 2735. <https://doi.org/10.3390/rs12172735>
- Souza, F. C., da Silva, A. L. F., dos Anjos, C. S., Estevinho, T. F., de Oliveira Lisboa, M., & Menin, M. (2021). New anomaly records in anurans, with a review for Brazil. *Herpetology Notes*, 14, 31–41.
- Spence, A. R., Hopkins, G. R., Neuman-Lee, L. A., Smith, G. D. S., Brodie, E. D., & French, S. S. (2016). Detrimental Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Amphibian Life Stages. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 325(7), 415–424. <https://doi.org/10.1002/jez.2026>
- St-Amour, V., Garner, T. W. J., Schulte-Hostedde, A. I., & Lesbarrères, D. (2010). Efectos de dos patógenos de anfibios sobre la estabilidad del desarrollo de ranas verdes. *Conservation Biology*, 24(3), 788–794. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2009.01400.x>
- Tatalović, L. I., Anđelić, B., Jelić, M., Kos, T., Benítez, H. A., & Jelaska, L. Š. (2020). Fluctuating asymmetry as a method of assessing environmental stress in two predatory carabid species within mediterranean agroecosystems. *Symmetry*, 12(11), 1–17. <https://doi.org/10.3390/sym12111890>
- Thabab, C. M., Devi, L. M., Hooroo, R. N. K., & Dey, S. (2014). Microscopic studies on the effects of pH on the oral morphology of *Hyla annectans* tadpoles from North East India. *Journal of Advanced Microscopy Research*, 9(4), 285–290. <https://doi.org/10.1166/jamr.2014.1222>
- Tofts, A. M. S., Johnson, D. W., & Carter, A. J. R. (2016). Strong nonlinear selection against fluctuating asymmetry in wild populations of a marine fish. *Evolution*, 70(12), 2899–2908. <https://doi.org/10.1111/evo.13092>
- Toledo, R. C., & Jared, C. (1993). Cutaneous adaptations to water balance in amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 105(4), 593–608. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(93\)90259-7](https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90259-7)
- Tolledo, J., Silva, E. T., Henrique Nunes-de-Almeida, C. L., & Felipe Toledo, L. (2014). Anomalous tadpoles in a Brazilian oceanic archipelago: implications of oral anomalies on foraging behaviour, food intake and metamorphosis. *Herpetological Journal*, 24(4), 237–243.
- Valen, L. van. (1962). A Study of Fluctuating Asymmetry. *Evolution*. 125–142 <https://doi.org/10.2307/2406192>
- Vazoller, R. F. (1995). *Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas*
- Vazquez-Duhalt, R. (1989). Environmental Impact of Used Motor Oil. *Science of the total environment*, 79(1), 1–23.

- Venesky, M. D., Wassersug, R. J., & Parris, M. J. (2010). The impact of variation in labial tooth number on the feeding kinematics of tadpoles of Southern Leopard Frog (*Lithobates sphenoccephalus*). *Copeia*, 3, 481–486. <https://doi.org/10.1643/CG-09-093>
- Vrcibradic, D., Diaz, A., Cosendey, B. N., Nascimento, B. B., & Borges-júnior, N. T. (2017). *Trichodactylus dentatus* (Crustacea, Decapoda, Trichodactylidae) and other prey of a large adult of the exotic American bullfrog, *Lithobates catesbeianus* (Ranidae), caught in a disturbed habitat in southeastern Brazil. *Herpetology Notes*, 10(0), 375–378.
- Waddle, J. H. (2006). *Use of Amphibians as Ecosystem Indicator Species*.
- Palmer, A.R. (1996). Waltzing with Asymmetry: Is Fluctuating asymmetry a powerful new tool for biologists or just an alluring new dance step? *BioScience*, 46(7), 518-532. <https://academic.oup.com/bioscience/article/46/7/518/322785>
- Wassersug, R. J., & Yamashita, M. (2001). Plasticity and constraints on feeding kinematics in anuran larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 131(1), 183–195. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00468-8](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00468-8)
- Weerathunga, W. A. M. T., & Rajapaksa, G. (2020). The impact of elevated temperature and CO₂ on growth, physiological and immune responses of *Polypedates cruciger* (common hourglass tree frog). *Frontiers in Zoology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12983-019-0348-3>
- Wilbur, H. M. (1980). Complex Life Cycles. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 11(1), 67–93. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.11.110180.000435>
- Winkler, L. W. (1888). Die bestimmung des im wasser gelösten sauerstoffes. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 21(2), 2843-2854.
- World Health Organization. (2017). *Water Quality and Health - Review of Turbidity: Information for regulators and water suppliers*.
- Zakharov, V. M., Shadrina, E. G., & Trofimov, I. E. (2020). Fluctuating Asymmetry, Developmental Noise and Developmental Stability: Future Prospects for the Population Developmental Biology Approach. *Symmetry*, 12(8), 1376. <https://doi.org/10.3390/sym12081376>
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., & Sheets, H. D. (2012). *Geometric morphometrics for biologists: a primer*.
- Zhang, M., Zhang, D., & generalized R-squared, C. (2022). *Package “rsq” Title R-Squared and Related Measures*.
- Zhelev, Z. M., Popgeorgiev, G. S., & Tsonev, S. v. (2021). Fluctuating Asymmetry in *Pelophylax ridibundus* (Anura: Ranidae) and *Bufo viridis* (Anura: Bufonidae) Meristic Morphological Traits as Indicators of Ecological Stress and a Method for Assessing Environmental Quality of Their Habitats-9 years Monitoring in Bulgaria: Systematic review. *Ecologia Balkanica*, 13(2), 257–287.
- Zhelev, Z. M., Tsonev, S. v., & Angelov, M. v. (2019). Fluctuating asymmetry in *Pelophylax ridibundus* meristic morphological traits and their importance in assessing environmental health. *Ecological Indicators*, 107. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105589>

- Zhelev, Z., Popgeorgiev, G., Arnaudov, A., Georgieva, K., & Mehterov, N. (2015). Fluctuating asymmetry in *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) as a response to anthropogenic pollution in south Bulgaria. *Archives of Biological Sciences*, 67(3), 1009–1023. <https://doi.org/10.2298/ABS141210064Z>
- Zhelev, Z., Tsonev, S., & Mollov, I. (2022). Are there correlations between the levels of fluctuating asymmetry in *Pelophylax ridibundus* (Anura: Ranidae) meristic morphological traits and morphological parameters used for assessing their physical fitness (health status)? *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19690-1>

APÊNDICE

A1. Espécimes utilizados.

Pithecopus ayeaye. Girinos. Brasil: Minas Gerais: Alpinópolis (UFMG 2530), Araxá (UFMG 2469-2470, 2475, 2477), Bom Jardim de Minas (UFMG 2531), Lavras (UFMG 2524), Luminárias (UFMG 2528-2529), Perdizes (UFMG 2480), Poços de Caldas (UFMG 2576-2577), Sacramento (UFMG 2478), São João Batista do Glória (UFMG 2560, 2563), São João del Rei (UFMG 2512, 2578), São Roque de Minas (UFMG 2568-2570), Tapira (UFMG 2471-2472) e Vargem Bonita (UFMG 2565).

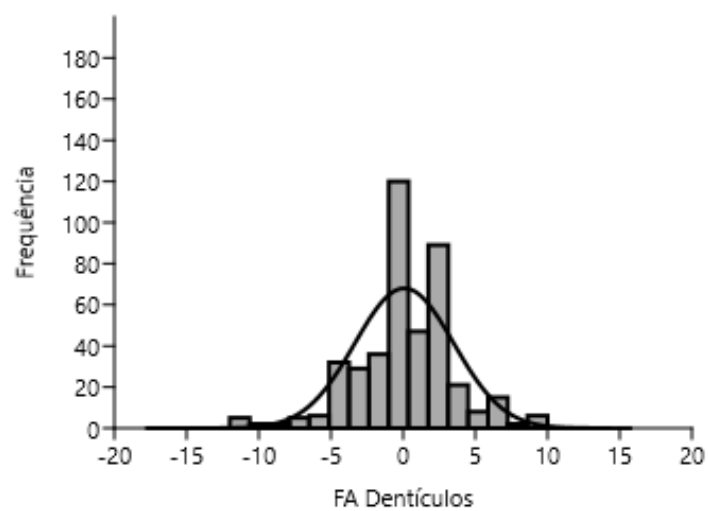
MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura S1. Distribuição de frequência da diferença entre os lados dos dentículos demonstrando padrão bimodal.

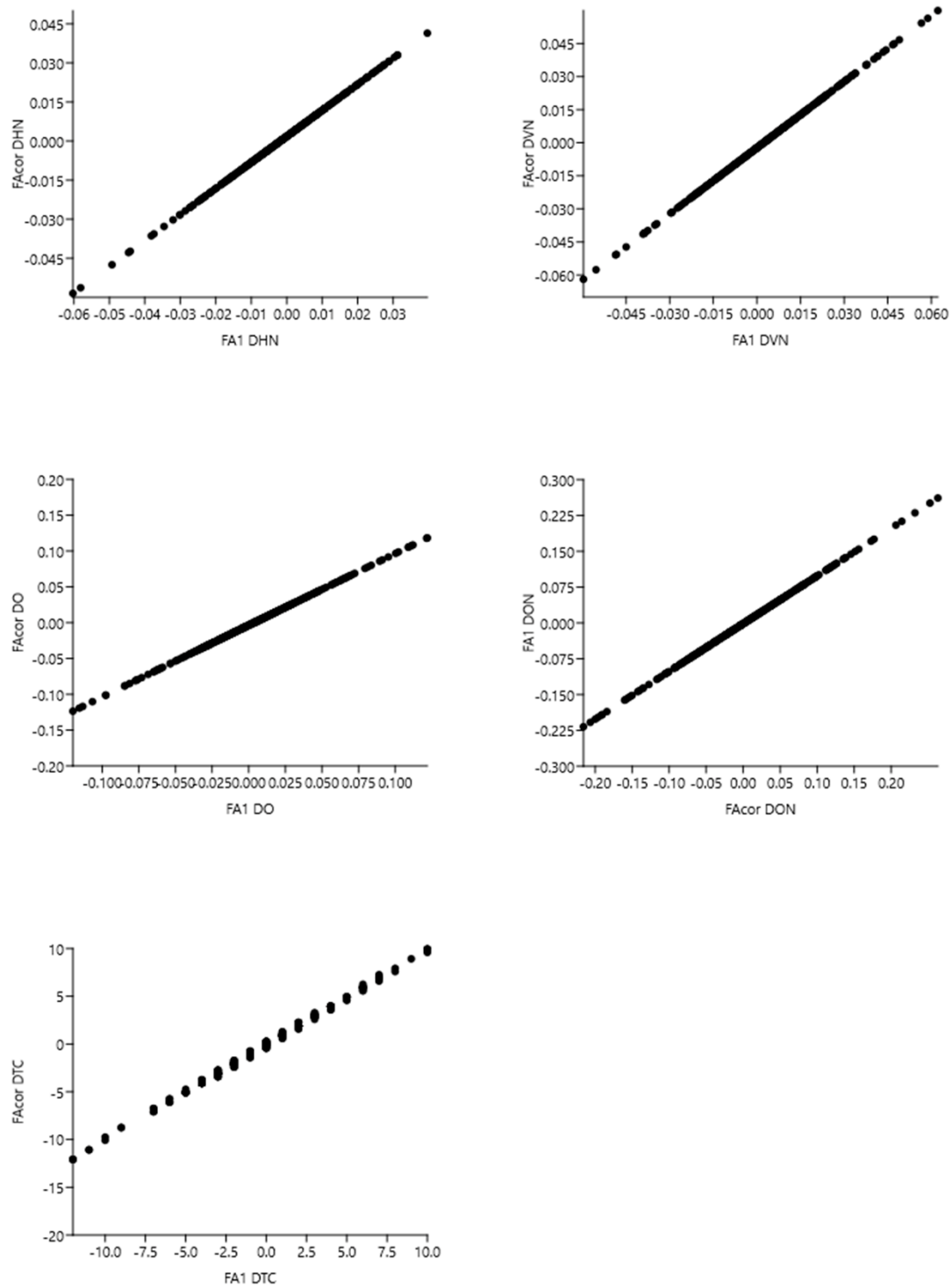


Figura S2. Regressões dos índices de assimetria flutuante FA1 e assimetria flutuante corrigida (FAcor).

Tabela S1. Coordenadas geográficas dos pontos de amostragem da área de estudo.

Ponto	Lote	Município	Estado	Latitude	Longitude	Altitude (m)
PT01	UFMG2560	São João Batista do Glória	MG	-20.54636	-46.41212	1280
PT02	UFMG2563	São João Batista do Glória	MG	-20.53775	-46.40705	1228
PT03	UFMG2565	Vargem Bonita	MG	-20.44849	-46.44809	1318
PT04	UFMG2568	São Roque de Minas	MG	-20.26681	-46.5545	1416
PT05	UFMG2569	São Roque de Minas	MG	-20.27951	-46.52078	1347
PT06	UFMG2570	São João Batista da Canastra	MG	-20.17271	-46.56616	1204
PT07	UFMG2576	Poços de Caldas	MG	-21.914219	-46.568231	1340
PT08	UFMG2577	Poços de Caldas	MG	-21.81018	-46.59798	1297
PT09	UFMG2578	São João del Rei	MG	-21.10529	-44.19846	1072
PT10	UFMG2590	Rio Acima	MG	-20.109913	-43.721864	1112
PT11	UFMG2469	Araxá	MG	-19.700611	-47.039722	1202
PT12	UFMG2470	Araxá	MG	-19.698639	-47.041222	1215
PT13	UFMG2471	Tapira	MG	-19.857417	-46.893861	1234
PT14	UFMG2472	Tapira	MG	-19.978389	-46.847028	1194
PT15	UFMG2475	Araxá	MG	-19.718667	-46.806611	1340
PT16	UFMG2477	Araxá	MG	-19.722806	-46.808278	1304
PT17	UFMG2478	Sacramento	MG	-19.813444	-47.247083	934
PT18	UFMG2480	Perdizes	MG	-19.634361	-47.253194	1119
PT19	UFMG2512	São João del Rei	MG	-21.115833	-44.276306	1000
PT20	UFMG2524	Lavras	MG	-21.338583	-44.981556	1106
PT21	UFMG2528	Luminárias	MG	-21.546028	-44.865222	1079
PT22	UFMG2529	Luminárias	MG	-21.549361	-44.854778	1145
PT23	UFMG2530	Alpinópolis	MG	-20.867694	-46.422417	1008
PT24	UFMG2531	Bom Jardim de Minas	MG	-21.950361	-44.209667	1364

Tabela S2. Parâmetros e pesos para o cálculo do IQA.

Parâmetro	Unidade	Peso (w)
Oxigênio dissolvido	% de saturação	0.17
Coliforme fecais	NMP/100 mL	0.15

pH	-	0.12
Demanda Bioquímica de Oxigênio	mg O_2 /L	0.10
Nitrogênio Total	mg/L	0.10
Fósforo Total	mg/L	0.10
Turbidez	uT	0.08
Sólidos Totais	mg/L	0.08
Temperatura	°C	0.10

Tabela S3. Parâmetros físico-químicos e índice de qualidade de água (IQA) dos corpos d'água de *Pithecopus ayeaye*. **POP** = população; **T** = temperatura (°C); **Turb** = turbidez (NTU); **OD** = concentração de oxigênio dissolvido (mg/L); **DBO** = demanda bioquímica de oxigênio (mg/L); **N** = concentração nitrogênio total (mg/L); **Colif** = concentração de coliformes totais (mg/L); **P** = concentração de fósforo total (mg/L); **SolT** = concentração de sólidos totais (mg/L); **pH¹** = pH medido em laboratório; **pH²** = pH medido em campo; **IQA** = índice de qualidade de água; **Clas. IQA** = Classificação da qualidade da água segundo os valores de IQA.

POP	T	Turb	OD	DBO	N	Colif	P	SolT	pH ¹	pH ²	IQA	Clas. IQA
PT01	23.1	1.4	6.0	0.4	0.66	800	1.05	175	4.7	6.2	39.08	Ruim
PT02	20.3	0.9	7.5	2.5	0.02	ND	1	75	6.9	5.6	73.16	Boa
PT03	22.1	297.0	5.2	0.9	0.25	300	2	50	7.2	7.6	55.95	Razoável
PT04	20.7	32.7	5.9	2.9	0.02	0	2.02	50	5.8	5.6	63.94	Razoável
PT05	20.2	0.1	6.4	0.9	0.30	100	2	25	5.6	4.9	57.63	Razoável
PT06	23.6	0	6.2	0.8	0.74	2000	2	100	6.7	6.3	52.46	Razoável
PT07	20.1	0	3.8	1	0.06	0	4	75	7.1	6.8	53.37	Razoável
PT08	20.6	4.2	6.0	0.5	0.10	700	1.43	40	7.7	7.5	50.08	Ruim
PT09	28.2	4.9	6.2	0.2	0.05	0	1.6	40	6.3	6.7	73.46	Boa
PT10	21	8.3	6.1	0.4	0.04	0	1.4	25	7.0	8.3	75.03	Boa
PT11	23.2	125.3	6.2	0.8	0.30	100	2.3	25	6.3	9.4	60.05	Razoável
PT12	23.8	0.4	6.4	0.6	0.09	200	1	75	6.9	9.2	65.83	Razoável
PT13	26.1	79.1	4.7	1.3	0.04	1000	2	150	6.4	8.1	50.68	Ruim
PT14	23.8	1.6	3.1	2	1.04	200	3	100	6.9	9.2	44.63	Ruim
PT15	25.5	2.1	5.1	1.2	0.07	ND	1	25	7.7	9.2	71.9	Boa
PT16	22.4	6.2	5.9	0.9	0.04	ND	1.6	25	6.9	7.5	71.27	Boa
PT17	24	0.4	3.7	0.2	0.24	ND	3	100	6.5	8.8	59.49	Razoável
PT18	22.8	0.7	4.9	0.5	0.43	300	2	25	6.8	9.4	57.85	Razoável
PT19	27.1	8.8	3.6	1.2	0.04	ND	2.02	50	7.4	9.2	62.66	Razoável
PT20	21.9	44.6	6.5	0.8	0.05	ND	1.04	50	6.5	8.3	70.1	Boa
PT21	24.3	8.1	5.3	0.8	0.77	ND	1.33	50	4.1	9.0	48.2	Ruim

PT22	22.8	0.1	6.5	0.5	0.05	0	1	150	7.3	9.5	63.46	Razoável
PT23	25.3	0	6.9	0.7	0.03	100	1	100	5.5	8.3	60.04	Razoável
PT24	20.5	17.8	5.4	0.2	0.1	ND	1.01	150	6.9	8.2	67.91	Razoável

Tabela S4. Uso do solo no raio de 500 metros ao redor de cada ponto de amostragem.

Ponto	Área Natural (km ²)			Área Antropizada (km ²)		Área Total (km ²)	Uso Antrópico do Solo (%)
	Floresta	Formação Natural não Florestal	Corpo d'Água	Agropecuária	Área não vegetada		
PT01	0.1134	0.5589		0.1026		0.7749	13.24%
PT02	0.1746	0.3681		0.2268		0.7695	29.47%
PT03	0.0342	0.3294		0.4158		0.7794	53.35%
PT04	0.0207	0.5229		0.2268		0.7704	29.44%
PT05	0.0621	0.6912		0.0225		0.7758	2.90%
PT06	0.0783	0.225		0.468		0.7713	60.68%
PT07	0.1485		0.009	0.6192		0.7767	79.72%
PT08	0.1458			0.6237		0.7695	81.05%
PT09		0.6498		0.1197		0.7695	15.56%
PT10	0.0288	0.6723		0.0729	0.0045	0.7785	9.36%
PT11	0.2457	0.081		0.4473		0.774	57.79%
PT12	0.1359	0.0756		0.5562		0.7677	72.45%
PT13	0.2601	0.1458		0.3636		0.7695	47.25%
PT14	0.0801	0.2583		0.4392		0.7776	56.48%
PT15	0.0315	0.3456		0.3996		0.7767	51.45%
PT16	0.0522	0.468		0.2493		0.7695	32.40%
PT17	0.1894	0.2088	0.0324	0.3384	0.0081	0.7771	43.55%
PT18	0.1359	0.0846		0.5499		0.7704	71.38%
PT19	0.3177			0.4545		0.7722	58.86%
PT20	0.1935	0.4392		0.1449		0.7776	18.63%
PT21	0.0279	0.5166		0.2187	0.0063	0.7695	28.42%
PT22	0.0639	0.7011			0.0054	0.7704	0.00%
PT23	0.0603	0.2331		0.4806	0.0009	0.7749	62.02%
PT24	0.1359	0.522		0.1017	0.0126	0.7722	13.17%

Tabela S5. Uso do solo no raio de 1000 metros ao redor de cada ponto de amostragem.

Ponto	Área Natural (km ²)			Área Antropizada (km ²)		Área Total (km ²)	Uso Antrópico do Solo (%)
	Floresta	Formação Natural não Florestal	Corpos d'Água	Agropecuária	Área não vegetada		
PT01	0.6039	1.7145		0.7695	0.0054	3.0933	24.88%
PT02	0.3402	1.1268		1.6173	0.0045	3.0888	52.36%
PT03	0.3636	1.0377		1.6866		3.0879	54.62%
PT04	0.1836	2.4534		0.4464		3.0834	14.48%
PT05	0.27	2.7306		0.09		3.0906	2.91%

PT06	0.2826	0.9405		1.8666	3.0897	60.41%
PT07	0.6579		0.009	2.4192	3.0861	78.39%
PT08	0.6039	1.7145		0.7695	0.0054 3.0933	24.88%
PT09	0.4455	2.1393		0.5175	3.1023	16.68%
PT10	0.4473	0.3024		2.3355	3.0852	75.70%
PT11	0.9342	0.2421		1.9098	3.0861	61.88%
PT12	0.963	0.2664		1.8549	3.0843	60.14%
PT13	1.3824	0.5265		1.1799	3.0888	38.20%
PT14	0.8478	0.7038		1.5354	3.087	49.74%
PT15	0.5148	1.0116		1.5588	3.0852	50.53%
PT16	0.5373	1.3059		1.2447	3.0879	40.31%
PT17	0.6372	0.5607	0.0549	1.8243	0.0171 3.0942	58.96%
PT18	0.4473	0.3024		2.3355	3.0852	75.70%
PT19	0.1305	1.3167		1.6497	3.0969	53.27%
PT20	0.9216	1.4031		0.7668	3.0915	24.80%
PT21	0.2304	1.7046		1.1457	0.0063 3.087	37.11%
PT22	0.3609	2.4903		0.2268	0.0099 3.0879	7.34%
PT23	0.4806	0.612		1.9917	0.0045 3.0888	64.48%
PT24	0.9675	1.2366		0.8685	0.0126 3.0852	28.15%

Tabela S6. *Outliers* detectados e removidos pelo teste de Grubbs. Na primeira etapa, temos os *outliers* referentes às medições originais dos lados direito e esquerdo. Na segunda etapa, temos os *outliers* referentes às diferenças entre as médias dos lados.

1ª etapa			
Traço	Lote	Localidade	Número de medidas
DNF (lado esquerdo)	UFMG2512B	São João del-Rei - MG	2
DO (lado direito)	UFMG2472A	Tapira - MG	1
	UFMG2478A	Sacramento - MG	1
	UFMG2531	Bom Jardim de Minas - MG	1
	UFMG2576	Poços de Caldas - MG	1
	UFMG2577A	Poços de Caldas - MG	3
DO (lado esquerdo)	UFMG2577A	Poços de Caldas - MG	5
DHN (lado direito)	UFMG2470B	Araxá - MG	2
DHN (lado esquerdo)	UFMG2470B	Araxá - MG	1
2ª etapa			
Traço	Lote		Número de medidas
DNF	UFMG2472A	Tapira - MG	2

DOF	UFMG2480A	Perdizes - MG	1
	UFMG2524A	Lavras - MG	1
	UFMG2577A	Poços de Caldas - MG	1
DON	UFMG2478A	Sacramento - MG	1
	UFMG2480A	Perdizes - MG	1
	UFMG2512B	São João del-Rei - MG	1
	UFMG2576	Poços de Caldas - MG	1
DO	UFMG2469	Araxá - MG	2
	UFMG2472A	Tapira - MG	1
	UFMG2480A	Perdizes - MG	1
		Bom Jardim de Minas -	
	UFMG2531	MG	1
	UFMG2565	Vargem Bonita - MG	1
	UFMG2577A	Poços de Caldas - MG	2
DHN	UFMG2524	Lavras - MG	4

Tabela S7. Resumo da ocorrência de anomalias nos girinos de *Pithecopus ayeaye*. **DF** = Dentículos Faltantes, **AQD** = Ausência de Queratinização dos Dentículos, **IFD** = Interrupção das Fileiras de Dentículos, **PL** = Perda Total dos Lábios, **ABC** = Quebras, lacunas, perda ou outras deformidades na aresta de corte do bico córneo (Anomalias), **AQBC** = Ausência de Queratinização do Bico Córneo, **PO** = Posição dos Olhos e **AF** = Anomalia no focinho.

Ponto	Est. Des. n total	DF	AQD	IFD	PL	ABC	AQBC	PO	AF
Anomalia (%) / número de indivíduos									
PT01	28 - 33; n = 10	-	-	-	-	-	-	-	-
PT02	25; n = 11	-	-	-	-	-	-	-	-
PT03	30 - 36; n = 11	9.1% (n = 1)	-	-	-	-	-	-	-
PT04	27 - 33; n = 12	-	-	-	-	-	-	-	-
PT05	25 - 28; n = 10	-	-	-	-	-	-	-	-
PT06	25 - 28; n = 19	21.1% (n = 4)	-	5.3% (n = 1)	-	10.5% (n = 2)	-	5.3% (n = 1)	-

PT07	25 - 28; n = 12	100% (n = 12)	16.7% (n = 2)	-	-	-	-	-	-
PT08	25 - 41; n = 11	27.3% (n = 3)	27.3% (n = 3)	-	9.1% (n = 1)	27.3% (n = 3)	36.4% (n = 4)	-	-
PT09	26 - 31; n = 12	16.7% (n = 2)	-	-	-	-	-	-	-
PT10	25 - 36; n = 10	20% (n = 2)	-	10% (n = 1)	-	-	-	-	-
PT11	30 - 35; n = 11	45.5% (n = 5)	-	-	-	-	-	-	-
PT12	25 - 39; n = 21	14.2% (n = 3)	-	4.8% (n = 1)	9.5% (n = 2)	-	-	14.3% (n = 3)	4.8% (n = 1)
PT13	25 - 29; n = 17	5.9% (n = 1)	-	-	-	-	-	-	-
PT14	26 - 41; n = 25	12% (n = 3)	-	8% (n = 2)	-	32% (n = 8)	-	-	-
PT15	25 - 27; n = 12	8.3% (n = 1)	-	-	-	-	-	-	-
PT16	25 - 39; n = 11	-	-	-	-	-	-	9.1% (n = 1)	-
PT17	25 - 35; n = 32	-	-	-	-	-	-	3.1% (n = 1)	-
PT18	25 - 35; n = 40	-	-	-	-	-	-	2.5% (n = 1)	-
PT19	25 - 41; n = 59	3.4% (n = 2)	-	3.4% (n = 2)	-	-	-	-	-
PT20	25 - 39; n = 45	-	-	2.2% (n = 1)	-	-	-	-	-
PT21	26 - 40; n = 14	-	-	7.1% (n = 1)	-	-	-	-	-
PT22	25 - 29; n = 8	12.5% (n = 1)	-	-	-	12.5% (n = 1)	-	-	-
PT23	28 - 36; n = 20	10% (n = 2)	-	-	-	-	-	-	-
PT24	27 - 41; n = 18	-	5.6% (n = 1)	-	-	11% (n = 1)	5.6% (n = 1)	-	-

Tabela S8. Resultado da seleção de modelos para cada variável morfológica. Em negrito, temos o melhor modelo.

Traço	Modelo	AICc	Delta	Peso
CFAcor	CFAcor x Turb	-54.4	0.00	0.259
	CFAcor x DBO + Turb	-52.6	1.75	0.108
	CFAcor x OD + Turb	-52.4	1.94	0.098
	CFAcor x DistPres + Turb	-52.3	2.11	0.09
	CFAcor x	-52.2	2.20	0.086
AFcorDON	AFcorDON x Turb	-98.1	0.00	0.247
	AFcorDON x Condu + Turb	-96.8	1.29	0.13
	AFcorDON x DistUrb + Turb	-96.3	1.82	0.1
	AFcorDON x OD + Turb	-96.1	1.98	0.092
	AFcorDON x DBO + Turb	-96.1	1.99	0.091
AFcorDHN	AFcorDHN x pH	-132.3	0.00	0.186
	AFcorDHN x pH + Turb	-131.4	0.89	0.119
	AFcorDHN x pH + Solo1000 + Turb	-131.4	0.91	0.118
	AFcorDHN x pH + Solo1000	-131.2	1.18	0.103
	AFcorDHN x N + pH	-131.1	1.24	0.1
AFcorDVN	AFcorDVN x	-119.7	0.00	0.211
	AFcorDVN x SolT	-119.3	0.46	0.168
	AFcorDVN x Solo1000 + SolT	-118.3	1.60	0.095
	AFcorDVN x Solo1000	-118.1	1.70	0.091
	AFcorDVN x DistPres	-118.0	1.78	0.087
Anom	Anom x DistUrb + P + Solo1000 + Solo 500 + Temp	105.7	0.00	0.275
	Anom x DistUrb + P + pH + Solo1000 + Solo 500 + Temp	107.5	1.74	0.115
	Anom x DBO + DistUrb + P + Solo1000 + Solo 500 + Temp	107.7	1.96	0.103
	Anom x DistUrb + P + pH + Solo 500 + Temp	107.9	2.18	0.092
	Anom x DistUrb + OD + P + Solo1000 + Solo 500 + Temp	108.2	2.50	0.079

