



Universidade Federal do Amazonas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação



Departamento de Apoio à Pesquisa

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

Tamanho corporal e perfil hematológico de populações de *Leptodactylus pentadactylus* (Anura: Leptodactylidae) habitando fragmentos florestais urbanos na Amazônia Central.

Bolsista: Jessica da Silva Padinha, CNPq.

MANAUS

2014



Universidade Federal do Amazonas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Departamento de Apoio à Pesquisa



Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

RELATÓRIO FINAL
PIBIC/PIBITI 2013/2014

Tamanho corporal e perfil hematológico de populações de *Leptodactylus pentadactylus* (Anura: Leptodactylidae) habitando fragmentos florestais urbanos na Amazônia Central.

Bolsista: Jessica da Silva Padinha
Orientador: Jaydione Luiz Marcon
Colaboradores: Ronis Da Silveira e Marcelo Menin

MANAUS
2014

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e se caracteriza como sub projeto do projeto de pesquisa Bibliotecas Digitais.

Tamanho corporal e perfil hematológico de populações de *Leptodactylus pentadactylus* (Anura: Leptodactylidae) habitando fragmentos florestais urbanos na Amazônia Central.

Sumário

Resumo.....	1
Abstract	1
Introdução	2
Objetivos	3
Material e Métodos	4
Análise dos Dados.....	6
Resultados	7
Discussão	10
Considerações Finais	13
Referências bibliográfica.....	14

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil hematológico e morfométrico das populações de *Leptodactylus pentadactylus* no habitat de fragmento florestal urbano na Amazônia Central. O trabalho foi realizado no fragmento florestal do Campus da UFAM durante o período de um ano, onde foram coletados 21 animais de vida livre, dentre eles 11 machos, nove fêmeas e quatro recapturas (três fêmeas e um macho). Foram avaliadas as seguintes variáveis: tamanho corporal (CRU), peso, sexo e os parâmetros hematológicos (hematócrito, concentração de hemoglobina, número de eritrócitos e índices VCM, HCM e CHCM) em cada um dos indivíduos capturados. A coleta de sangue foi realizada na veia abdominal e, em seguida, cada animal foi marcado permanentemente com microchip. Os valores (média \pm DP) observados para o CRU e peso para o total de anuros coletados foram $127,9 \pm 21,5$ mm e $290,5 \pm 97,7$ g, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas entre os parâmetros biométricos (CRU e peso) e os parâmetros hematológicos nos indivíduos estudados. As dimensões corporais observadas nos indivíduos de *Leptodactylus pentadactylus* são semelhantes às observadas em outras populações de *Leptodactylus pentadactylus* na Amazônia. Da mesma forma não foram observadas diferenças nos parâmetros hematológicos em relação ao sexo, fato previamente observado em outras espécies de anuros. Este estudo contribui para o estabelecimento das propriedades do sangue da rã pimenta, que é a primeira espécie de anuro amazônico investigada neste contexto.

Palavra chave: Amazônia central, anuros, hematologia, morfometria, fragmento urbano.

Abstract

This study aimed to evaluate hematological and morphometric profile of populations of *Leptodactylus pentadactylus* in habitats of urban forest fragment in Central Amazonia. The work was performed at the UFAM campus, during the period of one year, and 21 wild animals, including 11 males, nine females and four recaptures were collected. Body size and sex of the individuals, the blood profile and individually marking and definitively, with microchips were evaluated. The values (mean \pm SD) observed CRU and the total mass of the frogs were 127.9 ± 21.5 mm and 290.5 ± 97.7 g, respectively. In hematological analysis, no differences were observed between the sexes as discussed in other papers.

Keywords: Central Amazon, anuran, hematology, morphometrics, urban fragment.

INTRODUÇÃO

A Classe dos Anfíbios (Amphibia) é dividida em três ordens: Urodela ou Caudata (salamandras), Gymnophiona (cecílias ou cobras-cegas) e Anura (sapos, rãs e pererecas) (<http://www.herpetofauna.com.br/Anfibios.htm>, 2011). Dentro dos anuros, destaca-se a família Leptodactylidae que possui 100 espécies válidas, sendo o gênero *Leptodactylus* o mais representativo com 75 espécies (Frost, 2011).

Leptodactylus pentadactylus (Laurenti, 1768), popularmente conhecido na região como rã pimenta, é um anuro de grandes dimensões e amplamente distribuído na bacia amazônica (Heyer, 2005). De acordo com a revisão, a espécie *Leptodactylus pentadactylus* está restrita à bacia Amazônica, na Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru e Suriname. É um dos maiores anuros deste bioma, podendo atingir 185 mm de comprimento rostro-cloacal (Heyer, 1979). Possui hábitos terrestres noturnos e são encontrados principalmente nas margens de igarapés, mas também em áreas mais altas, como os platôs, afastados dos corpos d'água (Costa, 2013).

A rã pimenta apresenta coloração dorsal castanho avermelhada, com manchas transversais escuras entre as pregas dorsolaterais. A coloração da região ventral é composta por manchas brancas sobre fundo acinzentado. Uma faixa negra vai desde a ponta do focinho, passando pelos olhos e curva sobre o tímpano pela lateral do corpo. A íris dos adultos apresenta duas cores, bronze na parte superior e laranja na parte inferior. Os machos apresentam membros anteriores hipertrofiados, espinhos nupciais nos polegares (pre-polex) e coloração avermelhada nas laterais do corpo durante a atividade reprodutiva. (Duellman, 1978; Hero & Galatti, 1990; Lima et al., 2006).

Essa espécie deposita seus ovos em ninhos de espuma construídos pelo casal durante a ovoposição e tem por função a proteção dos ovos e embriões durante as fases iniciais do desenvolvimento contra predação e dessecação (Heyer, 1969; Downie, 1993; Menin & Giaretta, 2003). Durante esse trabalho observou-se que no período das chuvas há uma grande concentração desses animais devido à disponibilidade de ambientes de

reprodução (de agosto a novembro), confirmando o que Lima *et al.* (2006) e Silva & Giaretta (2009) registraram para a espécie. Durante a época reprodutiva, os machos deslocam-se para os platôs e exibem maior atividade vocal (Galatti, 1992).

A análise hematológica do sangue desses animais foi uma oportunidade inédita para avaliar pontos como o estado geral de saúde, o perfil dos valores no período de reprodução e, a provável existência de diferenças entre os sexos, uma vez que já é conhecido para outras espécies como *Duttaphrynus melanostictus*, *Bombina bombina* e *Lithobates pipiens* onde os valores hematológicos diferem entre os sexos.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Avaliar a biologia e o perfil hematológico de populações de *Leptodactylus pentadactylus* de vida livre coletadas em diferentes fragmentos florestais urbanos de Manaus, Amazônia Central.

Objetivos específicos:

- 1) Determinar o tamanho corporal e o sexo dos indivíduos amostrados;
- 2) Estabelecer o perfil hematológico para indivíduos de vida livre da espécie;
- 3) Testar possíveis associações entre o perfil hematológico, o tamanho corporal e o sexo dos anuros;

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

As coletas de *Leptodactylus pentadactylus* (Figura 1) foram realizadas entre os meses de agosto de 2013 até junho de 2014 nas áreas verdes do fragmento do Campus da Universidade Federal do Amazonas. As coletas foram feitas a noite (18:00 – 21:00h), os animais foram localizados por vocalização “woop” (Duellman, 2005) ou visualmente com uso de uma lanterna de cabeça, apanhados com puçá ou manualmente. Nesse período foram capturados no total 21 animais, dentre eles quatro recapturas, nove fêmeas e 11 machos e um de sexo indeterminado, como são animais de vida livre, indivíduos desta espécie são extremamente rápidos e difíceis de capturar.

Primeiramente após a captura foram feitas as coletas de sangue com uma seringa de insulina descartável de 1mL, após a aplicação de uma solução de iodo 0,1% como agente antibacteriano (Christy, 1996). A heparina foi colocada na ponta da seringa. A quantidade máxima de sangue coletado por indivíduo foi de 0,3 ml, não excedendo 1% do peso do animal (Wright & Whitaker, 2001), pela veia abdominal, e armazenada nos tubo seco. O sangue coletado era armazenado em local com gelo e analisado no laboratório de fisiologia em até 24 horas seguintes.

Após a coleta de sangue, foi feita a morfometria com determinação do comprimento rostro-uróstilo (CRU; mm) com um paquímetro digital, a massa corporal (gramas) com uma balança Pesola® de 1000g. O sexo de cada indivíduo foi determinado com base no dimorfismo sexual existente nesta espécie, que inclui a presença de membros anteriores hipertrofiados, a presença de um espinho do pré-polex e coloração (Lima et al., 2006). Por fim, foi introduzido um microchip subcutâneo na coxa esquerda de cada indivíduo capturado no fragmento florestal da UFAM para marcação individual e permanente. A inserção do microchip foi feita com um aplicador (seringa e agulha), previamente esterilizado (Figura 2).



Figura 1. Macho adulto de *L. pentadactylus* coletado no fragmento do Campus da Ufam.



Figura 2. Fêmea adulta de *L. pentadactylus*. No destaque a verificação do microchip.

Parâmetros hematológicos

Após a realização das atividades a campo, foram realizados os procedimentos laboratoriais no Laboratório de Fisiologia- UFAM. Foi realizado o hemograma e os seguintes parâmetros eram analisados: micro-hematócrito (Ht, %); concentração de eritrócitos (RBC, milhões/ μ L), em amostras diluídas em formol-citrato lidas na câmara de Neubauer (Fowler & Miller, 2007); concentração de hemoglobina (Hb, g/dL), determinada pela leitura espectralométrica a 540 nm (Kampen & Zijlstra, 1964). A partir dos parâmetros obtidos foram também calculados os seguintes índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM; fL); concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM; g/dL) e hemoglobina corpuscular média (HCM; pg), conforme sugerido por Wintrobe (1934).

Análises dos Dados

A variação dos valores do hemograma e da biometria foi avaliada entre as populações urbanas de *Leptodactylus pentadactylus* utilizando a ANOVA, seguido do teste à posteriori de Tukey. A comparação entre os sexos para os dados biométricos, hemograma onde foram feitos pelo emprego do teste-t de Student.

A correlação entre o hemograma e o tamanho (CRU) e peso dos animais foi testada pelo uso de regressão linear simples ou Correlação de Pearson. Respeitando em ambos o limite de confiança de 95% ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa SYSTAT (Systat 8.0, SPSS INc., Chicago). Os dados do sexo indeterminado não foram incluídos na análise biométrica e hematológica.

RESULTADOS

Biometria

No total foram amostrados 21 indivíduos no fragmento florestal urbano da UFAM, dentre eles 11 machos, nove fêmeas e um indivíduo de sexo indeterminado. Deste total, quatro indivíduos foram recapturas (três fêmeas e um macho).

Os machos apresentaram valores de CRU e Massa (médias \pm DP) de $130,5 \pm 12,0$ mm e $295,7 \pm 73,9$ g, respectivamente. Já as fêmeas apresentaram valores de CRU e Massa de $131,9 \pm 22,8$ mm e $312,0 \pm 92,0$ g, respectivamente. Não foram constatadas diferenças significativas entre machos e fêmeas, tanto no CRU ($p = 0,912$) quanto na massa ($p = 0,674$) dos mesmos, conforme Tabela 1.

Considerando a não diferença entre machos e fêmeas os dados foram agrupados e observou-se no total de *L. pentadactylus* as médias \pm DP para o CRU = $127,9 \pm 21,5$ mm e de Massa = $290,5 \pm 97,7$ g, valores observados na Tabela 2.

Tabela 1. Biometria de machos e fêmeas de *L. pentadactylus* em fragmento florestal urbano (UFAM). Média \pm desvio padrão, mínimo e máximo.

Sexo	N	Mínimo	Máximo	Media	DP
FÊMEA					
CRU (mm)	9	81,8	158,7	131,9	22,8
Massa (g)	9	165,0	438,0	312,0	92,0
MACHO					
CRU(mm)	10	108,2	144,4	130,5	12,0
Massa (g)	10	190,0	400,0	295,7	73,9

Tabela 2. Biometria do numero total de *L. pentadactylus* em fragmento florestal urbano (UFAM). Valor médio \pm desvio padrão, máximo e mínimo.

	N	Mínimo	Máximo	Media	DP
CRU (mm)	20	71,4	158,7	127,9	21,5
MASSA (g)	20	45,0	438,0	290,5	97,7

Parâmetros hematológicos

Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros hematológicos ($p_{Ht} = 0.901$; $p_{RBC} = 0.957$; $p_{Hb} = 0.713$) e índices hematimétricos ($p_{VCM} = 0.573$; $p_{HCM} = 0.138$; $p_{CHCM} = 0.351$) entre machos e fêmeas (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros hematológicos de fêmeas e machos de *L. pentadactylus* capturados no fragmento florestal da UFAM. Média \pm desvio padrão, mínimo e máximo.

Sexo	N	Mínimo	Máximo	Media	DP
Fêmea					
Ht %	9	10,0	39,1	26,7	8,3
RBC milhões/ μ L	9	0,15	2,0	0,5	0,5
Hb g/dL	9	3,2	15,6	5,8	4,0
VCM fl	9	6,6	1556,7	606,1	441,9
HCM pg	9	26,3	386,3	169,2	136,4
CHCM g/dL	9	9,5	53,7	24,0	15,5
Macho					
Ht %	11	4,8	38,0	27,2	9,4
RBC milhões/ μ L	11	0,16	1,0	0,5	0,3
Hb g/dL	10	2,0	10,0	5,2	2,6
VCM fl	11	295,7	1025,2	513,3	202,3
HCM pg	10	13,1	170,2	91,2	51,3
CHCM g/dL	10	7,0	36,3	18,2	9,5

Considerando estes resultados, foi possível obter de forma agrupada (machos e fêmeas) os seguintes valores (média \pm DP): Ht = 26,9 % \pm 8,5; RBC = 0,56 milhões/ μ L \pm 0,38; Hb = 5,4 g/dL \pm 3,2; VCM = 558,5 fl \pm 317,7; HCM = 125,9 pg \pm 103,5 e CHCM = 20,5 g/dL \pm 12,5 (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros hematológicos obtidos para a espécie *L. pentadactylus* capturados no fragmento florestal urbano, agrupando machos e fêmeas. Valor médio \pm desvio padrão, mínimo e máximo.

	N	Mínimo	Máximo	Média	DP
Ht %	21	4,9	39,0	26,9	8,5
RBC milhões/ μ L	21	0,15	1,9	0,56	0,38
Hb g/dL	20	2,0	15,6	5,4	3,2
VCM fl	21	6,6	1556,7	558,5	317,7
HCM pg	20	13,1	386,3	125,9	103,5
CHCM g/dL	20	7,0	53,7	20,5	12,5

DISCUSSÃO

Biometria

As dimensões corporais observadas nos indivíduos amostrados no presente estudo são semelhantes às observadas em outras populações de *Leptodactylus pentadactylus* na Amazônia (Duellman, 1978; Galatti, 1992; Heyer, 2005) e para populações de diferentes regiões da Amazônia, como Peru (machos: 140-169 mm, fêmeas: 125-181 mm; Rodriguez & Duellman 1994; Duellman, 2005), Brasil, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia (machos: 100-195, fêmeas: 135-174; Heyer, 2005).

O recente trabalho de Couto (2013) que também foi realizado no fragmento florestal da UFAM comparou os tamanhos corporais da população de *L. pentadactylus* do fragmento com populações de duas áreas de floresta contínua registrou diferenças significativas, sendo o tamanho das fêmeas do fragmento maior que o das fêmeas de floresta contínua. Em fragmentos florestais, é esperado um menor tamanho populacional devido à redução do tamanho da área (Laurence & Vasconcelos, 2009).

No entanto, no presente trabalho não foram encontradas diferenças significativas no CRU, na massa corporal e entre os sexos, contrariamente ao reportado por Heyer (2005), onde foram observadas diferenças no dimorfismo sexual nas medidas biométricas. Entretanto as diferenças observadas entre os sexos foram somente no dimorfismo sexual na presença de caracteres sexuais secundários nos machos, como a presença de pré-polex e membros anteriores hipertrofiados (Figura 3). Tais características estão relacionadas com interações agonísticas entre machos, especialmente no período reprodutivo (Costa, 2013).

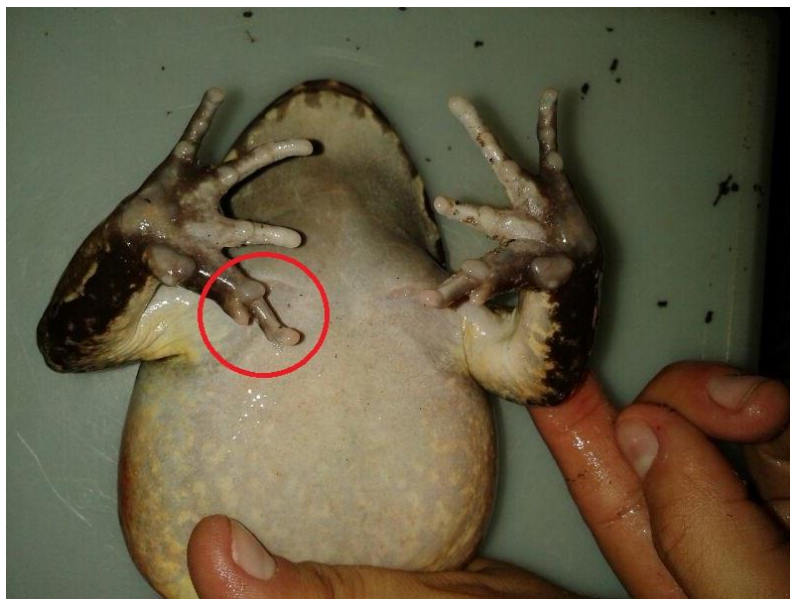


Figura 3. Macho adulto de *L. pentadactylus*, em destaque no círculo vermelho o pré-polex, característico deste sexo.

Parâmetros hematológicos.

As diferenças nos parâmetros hematológicos sexuais que foram observadas no *L. pentadactylus* divergem para outras espécies, como por exemplo, os machos de *Duttaphrynus melanostictus* (= *Bufo melanostictus*) apresentam valores de Ht, Hb e RBC mais elevados que as fêmeas da mesma espécie (Glomski et al., 1997). Em *Pelophylax lessonae* (= *Rana esculenta*) o mesmo padrão foi observado para os valores de Hb e RBC (Sinha, 1983); Harris (1972) observou valores de Ht consistentemente mais elevados nos machos de *Lithobates pipiens* e em *Bombina bombina* os valores de RBC dos machos também foram superiores aos das fêmeas (Wojtaszek & Adamowicz, 2003).

Embora se acreditasse que nos machos de *L. pentadactylus* os valores poderiam ser maiores no comparativo com as fêmeas, por possuir maior atividade metabólica, o que pode estar relacionado com comportamentos específicos dos machos, como a vocalização (Prestwich, 1994) e

comportamento territorial (Wells, 1977), essas diferenças entre o sexo não foram, no entanto, observadas. Os valores médio obtidos assemelham-se ao perfil hematológico de outros anfíbios (Glomski et al., 1997).

Em outras espécies como *Euphlyctis cyanophlyctis* (= *Rana cyanophlyctis*) e *Polypedates maculatus*, são as fêmeas que apresentam valores hematológicos mais elevados (Glomski et al., 1997; Mahapatra et al. 2010). Diferença também não observada no *L. pentadactylus*.

Os dados analisados dos parâmetros sanguíneos representam informações importantes para *L. pentadactylus* em ambiente natural atualmente, pois quase não se tem trabalhos dessa natureza.

Considerações finais

De uma forma geral, não houve tanta divergência nas características hematológicas da rã pimenta em relação a outros trabalhos realizados com a mesma espécie e com espécies diferentes de anuros. Embora foi esperado encontrar nas análises laboratoriais dos machos valores hematológicos mais elevados, como descrito por Prestwich (1994) e por Wells (1977), que indicavam maior atividade metabólica em relação as fêmeas.

Uma vez que os indivíduos de *L. pentadactylus* estudados encontram-se marcados permanentemente com microchip, estudos futuros serão possíveis para um melhor entendimento em longo prazo do impacto da urbanização e/ou degradação ambiental do fragmento da UFAM sobre esta espécie de anuro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahumada, D. P. R. (2010). Distribuição e Abundância de Anuros de Floresta de Terra Firme na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas – Amazônia Central. Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- Arikan H., Alpagut-Keskin N., Çevik I. E., & Erismis U. C. (2010) A study on the blood cells of the fire-bellied toad *Bombina bombina* L. (Anura: Bombinatoridae). *Animal biology* 60: 61-68.
- Christy, M. T. (1996). The efficacy of using Passive Integrated Transponder (PIT) tags without anaesthetic in free-living frogs. *Australian Zoologist*, 30(2), 139–142.
- Couto, A., Menin. M., Marcon, J.L. (2013). Tamanho corporal, dieta e parâmetros hematológicos de populações de *Leptodactylus pentadactylus* (Anura: Leptodactylidae) em fragmento florestal e floresta contínua na Amazônia central.
- Duellman, W. E. (1978). *The biology of an equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador*. Lawrence: University of Kansas, Natural History Museum.
- Duellman, W.E. 2005. Cusco Amazónico, the lives of amphibian and reptiles in
- Fowler, M. E., & Miller, R. E. (2007). *Zoo and Wild Animal Medicine* (6th ed.). Philadelphia: Saunders.
- Faria da Costa, N. M., Rojas-Ahumada, D. P., Da Silveira, R., & Menin, M. (*in press*). Notes on abundance, size and calling activity of the South American bullfrog, *Leptodactylus pentadactylus* (Anura, Leptodactylidae), in pristine and fragmented forests in Central Amazonia, Brazil.
- Fowler, M. E., & Miller, R. E. (2007). *Zoo and Wild Animal Medicine* (6th ed.). Philadelphia: Saunders.

- Fioranelli, Santiago A.; Coppo, Norma B.; Coppo, José A. (2003). Los glóbulos blancos de *Rana catesbeiana* (Anfibia: Ranidae). Variaciones según sexo, edad, peso, crianza, alimentación y época del año.
- Galatti, U. (1992). Population Biology of the Frog *Leptodactylus pentadactylus* in a Central Amazonian Rainforest. *Journal of Herpetology*, 26(1), 23–31.
- Gül, Ç., Tosunoglu, M., Erdogan, D., Dilsah, Ö. (2011) Changes in the blood composition of some anurans. *Acta Herpetologica* 6 (2): 137-147.
- Gouveia, S. F., Rocha, P. A. D., Mikalauscas, J. S., & Silveira, V. V.B. (2009). *Rhinella jimi* (Cururu Toad) and *Leptodactylus vastus* (Northeastern Pepper Frog). Predation on Bats. *Herpetological Review*, 40(2), 210.
- Glomski, C. A., Tamburlin, J., Hard, R., & Chainani, M. (1997). The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. IV. The amphibians.
- Heyer, W. R. (2005). Variation and taxonomic clarification of the large species of the *Leptodactylus pentadactylus* species group (Amphibia: Leptodactylidae) from Middle America, northern South America, and Amazonia. *Arq. Zool*, 269–348.
- Hero, J.-M., & Galatti, U. (1990). Characteristics Distinguishing *Leptodactylus pentadactylus* and *L. knudseni* in the Central Amazon Rainforest. *Journal of Herpetology*, 24(2), 226–228.
- Laurence, W.F.; Vasconcelos, H.L. 2009. Consequencias ecológicas da fragmentação florestal na Amazônia. *Oecologia Brasiliensis* 13(3): 434-451.
- Lima, A. P., Magnusson, W. E., Keller, C., Menin, M., Rodrigues, D. J., Hödl, W., & Erdtmann, L. K. (2006). Guia de Sapos Da Reserva Adolpho Ducke, Amazonia Central. Manaus: Attema Design Editorial.
- Marcon, J. L. ; Cruz, J. ; Menin, M. ; Carolino, O. T. ; Gordo, M. . Biodiversidade fragmentada na floresta do campus da Universidade Federal do Amazonas: conhecimento atual e desafios para a conservação. In: Marcon, J.L.; Menin, M.; Araújo, M.G.P.; Hrbek, T.. (Org.). Biodiversidade Amazônica: caracterização, ecologia e conservação. 1ed. Manaus: Edua, 2012, v. , p. 221-278.

- Matthew C. Allender, DVM, MS, Michael M. Fry, DVM, MS, DACVP–Clinical Pathology.(2008). Amphibian Hematology.
- Menin, M. (2005). Padrões de distribuição e abundância de anuros em 64 km² de floresta de terra-firme na Amazônia Central. Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- Prestwich, K. N. (1994). The energetics of acoustic signaling in anurans and insects. *American Zoologist*, 34, 625–643
- Kampen, E. J., & Zijlstra, W. G. (1964). Standardization of haemoglobinometry. In C. G. Boroviczény (Ed.), *Erythrocytometric Methods and their standardization* (Vol. 18, pp. 68–72). Presented at the Transactions of the Standardizing Committee and Proceedings of Symposium 18 of the 9th Congress of the European Society of Haematology, Lisbon: Current Studies in Hematology and Blood Transfusion.
- Knispel S. R., Barros F. B., (2009) Anfíbios anuros da região urbana de Altamira (Amazônia Oriental), Pará, Brasil, *Biotemas*, 22 (2): 191-194.
- Kuramoto M. (1980) Relationships between number, size and shape of red blood cells in amphibians. *Comp. Biochem Physiol.* Vol. 69A pp. 771 to 775.
- Rodriguez, L.O.; Duellman, W.E. 1994. Guide to the frogs of the Iquitos Region, Stuart, S. N., Hoffmann, M., Chanson, J. S., Cox, N. A., Berridge, R. J., Ramani, P., & Young, B. E. (2008). *Threatened Amphibians of the World*. Barcelona, Spain; Gland, Switzerland; Arlington, Virginia, USA: Lynx Edicions; IUCN; Conservation International.
- Solé, M., Beckmann, O., Pelz, B., Kwet, A., & Engels, W. (2005). Stomach-flushing for diet analysis in anurans: an improved protocol evaluated in a case study in Araucaria forests, southern Brazil*. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 40(1): 23–28.

- Tsuji-Nishikido, B. M., & Menin, M. (2011). Distribution of frogs in riparian areas of an urban forest fragment in Central Amazonia. *Biota Neotropica*, 11(2): 63–70.
- Wojtaszek, J., & Adamowicz, A. (2003). Haematology of the fire-bellied toad, *Bombina bombina* L. *Comparative Clinical Pathology*, 12(3), 129–134.
- Wintrobe, M. M. (1934). Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, 51, 32–49.
- Wells, K. D. (1977). The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour*, 25, 666–693.
- Wells, K. D. (2007). *The Ecology & Behavior of Amphibians*. Chicago: The University of Chicago Press.
- Wright, K. M., & Whitaker, B. R. (2001). *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. Malabar: Krieger Publishing Company.