Lye Otani

**Aspectos da fisiologia metabólica e do
desempenho locomotor em anfíbios anuros:
implicações da fragmentação ambiental.**

*Aspects of metabolic physiology and locomotor
performance in anuran amphibians: implications of
habitat fragmentation*

São Paulo

2011

Lye Otani

**Aspectos da fisiologia metabólica e do
desempenho locomotor em anfíbios anuros:
implicações da fragmentação ambiental.**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências na Área de
Fisiologia Geral.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Arturo
Navas Iannini
Corientador: Prof. Dr. José Eduardo
de Carvalho

Versão Corrigida
Versão original disponível no Instituto de
Biociências da USP

São Paulo

2011

Otani, Lye

Aspectos da fisiologia metabólica e do
desempenho locomotor em anfíbios anuros:
Implicações da fragmentação ambiental
121 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo. Departamento de
Fisiologia Geral.

1. Fisiologia do exercício 2. Conservação de
anfíbios 3. Fragmentação Florestal
I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Fisiologia Geral.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr Carlos Arturo Navas Iannini.
Orientador

Aos meus pais, Satika e Choyu Otani,
e aos meus irmãos, Lyssa e Yul Otani

“What you own is your own kingdom
What you do is your own glory
What you love is your own power
What you live is your own story
In your head is the answer
Let it guide you along
Let your heart be the anchor
And the beat of your own song”

Geddy Lee/Alex Lifeson/Neil Peart
Rush

AGRADECIMENTOS

Durante os quatro anos em que desenvolvi meu projeto de doutorado passei por muitas coisas boas e ruins, e só consegui chegar até o fim deste trajeto devido à colaboração e amizade de muitas pessoas. Os meus orientadores, **Prof. Dr. Carlos Arturo Navas Ianinni** e **Prof. Dr. José Eduardo de Carvalho**, ocuparam o papel principal nessa história. O Prof. Carlos sempre me orientou e me apoiou quando mais precisei, e com o seu bom humor eterno fui capaz de superar estações chuvosas sem chuvas, enchentes de arrastar igrejas e raios destruidores de equipamentos. O Prof. José Eduardo me ensinou as técnicas de campo e laboratório com muita paciência, me deu bronca quando eu agia como uma aluna imprudente e desleixada, e escutou meus desabafos e frustrações quando os sapos não apareciam. A eles sou grata por me motivar a fazer sempre o meu melhor, e me propiciarem crescer como pessoa e como pesquisadora. Ainda devo agradecer os professores do departamento que sempre me ajudaram em diversas questões, entre eles devo destacar o **Prof. Dr. José Guilherme Chaui-Berlinck**, o **Prof. Dr. Fernando Ribeiro Gomes** e a **Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira**.

A execução desse trabalho pode ser dividida em quatro partes: o planejamento, o trabalho de campo, o trabalho laboratorial e a redação da tese. Durante a primeira etapa eu fui contemplada com a grande ajuda do **Prof. Dr. Célio F. B. Haddad**, do **Dr. Paulo Inácio Knegt López Prado**, do **Dr. Guilherme Becker** e do **Dr. Luis Menta Giasson**. Todos eles me ajudaram a escolher as áreas de pesquisa e as espécies utilizadas neste trabalho. O Luiz, em especial, além de me ajudar a escolher as espécies, me ensinou a identificá-las e onde encontrá-las dentro do Núcleo Santa Virgínia. Ele teve a paciência de me mostrar os animais da coleção e me mostrar cada detalhe até eu aprender, até uma provinha eu fiz. Agradeço profundamente pela paciência e boa vontade em me ajudar sempre que precisei.

Grande parte desses quatro anos eu passei buscando os meus sapinhos no campo. Essa parte do trabalho foi a melhor e a pior parte do trabalho. Considero esta etapa como a pior parte do trabalho porque tive muita dificuldade em encontrar os animais e tive uma colaboração extra das forças da natureza, que esfriou quando deveria ser

quente, inundou e trouxe dor às pessoas que me acolheram em São Luiz do Paraitinga, e, por fim, porém não menos importante, acertou um raio no alojamento e queimou nosso querido *Sable*. Mas, deixando a parte ruim de lado, a qual superamos com muita força e “bom humor”, a melhor parte está relacionada à oportunidade que tive de conhecer pessoas e aprender muito com elas. O Prof. Dr. Paulo Inácio me apresentou a minha primeira área de estudo, e com ele tive a oportunidade de aprender e discutir diversos aspectos da minha tese. Através dele também tive a oportunidade de conhecer a **Dra. Gabriela Paise** e o **Benedito**, e sem eles eu nunca teria conseguido coletar em São Luiz do Paraitinga. O Prof. Paulo Inácio também me apresentou a **Dra. Marianna Dixo**, a quem sou infinitamente grata por me ceder alguns exemplares de seu trabalho de pós-doutorado. Através deste link conheci pessoas maravilhosas com quem trabalhei em Ribeirão Grande. Neste local tive a oportunidade de aprender muito como o **Dr. Henning Steinike**, o **Dr. Arthur Bispo**, o **Prof. Dr. Fausto Nomura** e a **Paula Eveline**. Todos eles me ensinaram muito sobre anfíbios, aves, ecologia e trabalho de campo, além de me ajudar a coletar debaixo de chuva, com fome e depois de 3 semanas direto no campo, até mesmo levando horas para coletar um único *P. spiniger*. Minhas palavras não conseguem expressar o quanto sou grata por tudo o que fizeram por mim.

Ainda dentro do contexto do trabalho de campo, existem muitas pessoas que devo agradecer, entre elas: **Ananda Brito**, minha companheira querida de campo, passamos muitas aventuras e aprendemos muito juntas; **Prof. Reinaldo José da Silva**, **Prof. Dr. Luciano Alves dos Anjos** e **toda a sua equipe**, que me ajudaram a coletar no Núcleo Santa Virgínia e também me forneceram grande parte dos animais. Sem contar as pessoas que me acompanharam no campo, preocupados para que eu não fosse sozinha; **Isabel Cristina Pereira**, **Tatiana Kawamoto** e **Flávio Nunes**. Eu os fiz subir e descer morros, sair na chuva, se enfiar em buracos, e eles fizeram tudo sempre com um sorriso enorme no rosto. Amigos queridos, obrigada por tudo!

Passadas as grandes aventuras no campo, enfrentei os desafios do laboratório. A presença da **Isabel** na minha vida foi crucial para a minha sobrevivência! Essa menina me ajudou a fixar todos os conhecimentos que o Zezinho, vulgo Prof. Dr. José Eduardo, havia me passado. Também tive do **Daniel Stuginski** e do **Fernando Bagnariolli** na preparação dos reagentes e quando o espectrofotômetro não queria colaborar. Gostaria de aproveitar este parte para agradecer todos os meus amigos e colegas de laboratório e de departamento. Todos eles me promoveram ótimos momentos durante os intervalos de descontração durante todos os quatro anos de doutorado.

Finalmente, passada a pequena grande etapa da coleta de dados, veio a parte de análise dos dados e redação da tese. No entanto, as pessoas que me ajudaram nesta etapa são pessoas que estiveram ao meu lado durante toda a minha vida, sem contar meus orientadores, é claro. O **Guilherme Gomes** esteve presente em todas as etapas deste trabalho e sem ele eu não teria conseguido chegar nem na metade deste trabalho. No campo, juntos tomamos chuva, rolamos na lama atrás dos *Leptodactylus notoakitites*, e ficamos atolados com o carro, até de trator precisamos! No laboratório, ele passou a semana do natal e ano novo me ajudando a terminar as análises enzimáticas, para que eu pudesse começar o ano focada em escrever a tese. Sem ele eu não teria conseguido terminar as análises enzimáticas a tempo, e sem ele eu nunca teria conseguido analisar os vídeos dos sapinhos saltando. Sem falar na redação da tese, esta etapa sempre põe à prova minha força de vontade em concluir um projeto de pesquisa, e, tanto no mestrado quanto no doutorado, a presença de uma pessoa especial fez com que eu conseguisse superar minha insegurança e meu mau humor e chegar ao final de mais uma batalha. Gui, você é a minha força e minha inspiração! Obrigada por ser você!

Minha família também foi indispensável em mais uma etapa da minha vida. Meus pais, **Satika** e **Choyu Otani**, leram pacientemente meus textos, corrigindo meus erros de português e tentando entender o porquê os preocupe tanto durante os trabalhos de campo. Meu irmão, **Yul Otani**, foi a primeira pessoa que me levou para conhecer o campus da USP. Ele me mostrou onde ficam as melhores comidas e sempre esteve disposto a me ajudar e me fazer companhia, até caminhada na USP ele encarou! Minha irmã, **Lyssa Otani**, é minha amiga, minha confidente e companheira de apartamento. Pobre irmã, que teve que me aguentar durante todos os dias destes quatro anos, com bom ou mau humor, com preguiça ou com excesso de energia, com fome ou com a barriga muito cheia! Família perfeita não existe, mas a minha está quase lá! Amo muito vocês! Obrigada por esses 32 anos de convivência e suporte (25 pra você, Yul)! Uh, também fazem parte da minha família o **Guilherme Sarmento** e a **Carolina Alexiou**! Obrigada por entrarem para a família por livre e espontânea vontade, e tornarem esta família mais e feliz e completa!! Gostaria também de abrir um espaço para agradecer a minha “filhota”, **July**, por ter me acompanhado fielmente durante toda a minha trajetória como bióloga, e ao coelho **Jack Deniels**, por me proporcionar tantos momentos de descontração e risos.

Ah! Mas ainda tenho outras pessoas para agradecer... Durante estes quatro anos tive a grande oportunidade de realizar um estágio na Universidad de Chile, sob o financiamento do **Programa de Mobilidade Internacional Santender**, ao qual agradeço. Durante este período eu gostaria de agradecer ao **Prof. Dr. Pablo Sabat**, por ter me aceitado como estagiária e ter me ensinado muito. Agradeço também a todos os membros do laboratório, **Prof. Dr. Claudio Veloso**, **Prof. Dr. Mauricio Canals**, **Prof. Dr. Hugo Torres** e **Andres Sazo**, por me acolherem e tornar minha estadia muito agradável e proveitosa. Dentro e fora do laboratório algumas pessoas me ajudaram, me acolheram e hoje as considero minhas amigas para todo o sempre. **Grisel Cavieres** e **Natalia Ramirez**, vocês são pessoas especiais e agradeço toda ajuda e amizade! **Sandra Gonzales** e **Jonathan Castillo**, vocês foram pessoas maravilhosas e me ajudaram muito. Ainda não acredito que nunca mais poderei encontrá-los novamente. Sentirei muito a falta de vocês, obrigada por toda ajuda e conforto que me deram durante os dias frios em Santiago!

Todos os meus amigos queridos que agradeço simplesmente por fazerem parte da minha vida! Mesmo longe, mesmo sem manter contato todos os dias, **Eduardo Beraldo de Moraes**, **André Sunao N. Murakami**, **Vanessa C. Oliveira** e **Ivan Desuó** são pessoas que estarão no meu coração eternamente e sempre serei grata por sua amizade. Quero agradecer também ao meu querido amigo e professor **Caio Goes**, por trazer a música em minha vida durante esses quatro anos.

Por fim, agradeço ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio financeiro, e às duas últimas instituições pelo fornecimento da bolsa de estudos.

Introdução Geral.....	01
Capítulo 1. Fragmentação de habitat e fisiologia em anfíbios anuros da floresta atlântica: diferenças entre espécies generalistas e especialistas	10
1. <i>Abstract</i> /Resumo.....	11
2. Introdução.....	13
3. Materiais e Métodos.....	16
3.1. Animais experimentais e locais de coleta.....	16
3.2. Massa corpórea e morfologia.....	19
3.3. Desempenho locomotor.....	19
3.4. Metabolismo energético.....	20
3.5. Tratamento das amostras de tecido e atividade enzimática.....	21
3.6. Análises estatísticas.....	22
4. Resultados.....	23
4.1. Temperatura e umidade relativa.....	23
4.2. Diferenciação entre populações.....	26
4.3. Massa corpórea e morfologia.....	27
4.4. Metabolismo energético e atividade enzimática.....	32
4.5. Desempenho locomotor.....	34
5. Discussão.....	37
5.1. Temperatura e umidade relativa.....	37
5.2. Diferenciação entre populações.....	39
5.3. Massa corpórea e morfologia.....	40
5.4. Desempenho locomotor e metabolismo energético.....	44
6. Conclusões.....	46

Capítulo 2. A relação entre capacidade e fisiológica associada à locomoção e a persistência das populações de diferentes espécies em fragmentos florestais...48

1. <i>Abstract</i> /Resumo.....	49
2. Introdução.....	51
3. Materiais e Métodos.....	55
3.1. Local de estudo e espécies experimentais.....	55
3.2. Massa corpórea e morfologia.....	57
3.3. Desempenho locomotor e Metabolismo energético.....	58
3.4. Análises estatísticas.....	58
4. Resultados.....	60
4.1. Massa corpórea e morfologia.....	62
4.2. Metabolismo energético e atividade enzimática.....	67
4.3. Desempenho locomotor.....	70
5. Discussão.....	77
5.1. Diferenças interespecíficas e desempenho locomotor.....	77
5.2. Massa corpórea e morfologia.....	79
5.3. Metabolismo energético e atividades enzimáticas.....	82
6. Conclusões.....	85
Discussão Geral	87
Conclusões	95
Resumo (GERAL)	98
Abstract	99
Referências Bibliográficas	100
Anexo 1	116
Anexo 2	119

INTRODUÇÃO GERAL

A diversidade encontrada entre os seres vivos é, provavelmente, a característica da vida que mais tem chamado a atenção dos naturalistas durante séculos. Os mecanismos responsáveis pela origem e manutenção dessa diversidade e suas relações com as mudanças ambientais ainda são temas amplamente abordados em diversos estudos (Ruse, 1973; Bennett, 1997; Porter *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2009; Gonzalez-Voyer *et al.*, 2011). Sabe-se, por exemplo, que a diversidade e os padrões de distribuição dos animais estão relacionados com o potencial de diferentes grupos sistemáticos para produzir ajustes comportamentais, morfológicos ou fisiológicos, ao longo de gradientes ecológicos espaciais e temporais (Pough, 1989; Mangum e Hochachka, 1998, Wells, 2001; Angilletta *et al.*, 2002). Muito do que sabemos sobre este tema é o produto de investigações sobre uma pequena parcela das inúmeras espécies existentes atualmente (Spicer e Gaston, 1999), mesmo assim já é possível se ter uma idéia da formidável gama de variações possíveis e da importância de tal variação em diferentes níveis de organização como, por exemplo, entre indivíduos, populações ou espécies (Bennett, 1987; Feder, 1987; Spicer e Gaston, 1999).

A fisiologia tem um papel fundamental ao tentar entender os limites dos organismos que viabilizam sua reprodução e sobrevivência, e, conseqüentemente, a permanência de uma população em um determinado ambiente. A análise integrada da variação fisiológica, em diferentes níveis de abordagem, e de suas relações com as alterações ambientais torna-se essencial para se compreender os padrões atuais de distribuição da diversidade animal (Pough, 1989; Mangum e Hochachka, 1998, Wells, 2001; Angilletta *et al.*, 2002). Neste sentido, os contextos mais estudados são os gradientes macro-ecológicos característicos como, por exemplo, altitude, latitude,

disponibilidade de água e outros (Feder, 1987; Navas, 1996; Gardner, 2001; Angilletta *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2002). Porém, dadas as mudanças ambientais induzidas pelo homem, um novo contexto de estudo torna-se importante. O crescimento da população humana mundial tem gerado ao longo da história um aumento das áreas urbanas, ao mesmo tempo em que surge a exigência de reservar áreas cada vez maiores para a produção de alimentos e melhoramento das técnicas de cultivo para suprir a demanda das populações humanas (Palmer *et al.*, 2004; Carey, 2005).

A perda de habitat resultante do desenvolvimento urbano e da agropecuária e sua subsequente fragmentação tem sido cenário geral em todo o mundo (Miller e Cale, 2000). A diminuição do tamanho do habitat e o aumento do isolamento populacional acarretam em um aumento concomitante de extinções localizadas (Fahrig e Merriam, 1994; Zuidema *et al.*, 1996), resultando na redução da biodiversidade nos fragmentos remanescentes (Drinnan, 2005). No Brasil, um dos efeitos mais dramáticos da atividade humana sobre o ambiente é a fragmentação e redução da Floresta Atlântica que vem crescendo principalmente durante as últimas três décadas, levando à extinção inúmeras espécies de plantas e animais (Pinto & Brito, 2005). Este, assim como outros casos no mundo, constitui um exemplo de bioma com escassos remanescentes pouco perturbados, o que torna seu manejo e administração cada vez mais importante (Palmer *et al.*, 2004; Carey, 2005). É particularmente nestes casos mais drásticos que os princípios, conceitos e métodos utilizados nas áreas da ecofisiologia e fisiologia evolutiva e comparativa podem ser de extrema importância para entender os declínios populacionais e propor novos elementos de análise no campo da conservação ambiental (Koeman, 19991; Zachariassen *et al.*, 1991; Carey, 2005; Wikelski e Cooke, 2006).

Diversos estudos demonstraram que a capacidade das diversas espécies de animais para tolerar a modificação antrópica do ambiente guarda relação com a

fisiologia e a capacidade para manter o balanço energético e o equilíbrio interno (homeostase) face às novas condições (Calow, 1991; Zachariassen *et al.*, 1991; Carey, 2005). Estudos com esta abordagem são raros em nosso país, mas um ponto de partida apropriado seria considerar aqueles trabalhos sobre a relação entre a fisiologia e a fragmentação ambiental em anuros da Floresta Atlântica. Esta relação merece particular atenção porque a Floresta Atlântica é um dos biomas mais ameaçados do país (SOS Mata Atlântica, 2011), e os anfíbios compõem o grupo animal mais sedentário dentre os vertebrados terrestres (Wells, 2007). Como será discutido neste trabalho, existe uma relação entre a capacidade de uma espécie para se deslocar, e a sua habilidade para estabelecer populações em áreas fragmentadas. Além desse fator, os anfíbios anuros ainda devem enfrentar um desafio em particular, pois muitas espécies precisam chegar até locais apropriados para a reprodução que ficam fora dos fragmentos florestais (Becker *et al.*, 2007). Como a capacidade para se deslocar é uma função direta do tamanho corpóreo e das características fisiológicas relacionadas com a atividade física (ver Capítulo 2), propomos avaliar até que ponto estes aspectos da fisiologia guardam relações com a distribuição de anuros em uma área específica da Floresta Atlântica. Com esse estudo pretendemos discutir novas perspectivas para estudos que abordam os efeitos da modificação do ambiente sobre populações animais, além de fornecer novos dados sobre como a atividade antrópica influi na seleção e extinção das espécies de anuros.

Fragmentação da Floresta Atlântica e fisiologia de anuros

A Floresta Atlântica é, sem dúvida, um dos biomas mais ameaçados do mundo, uma vez que restam apenas cerca de 7,9% de sua cobertura original (SOS Mata Atlântica, 2011). No Brasil, durante as últimas três décadas, a perda e a fragmentação de

habitats alteraram seriamente este bioma (Pinto e Brito, 2005). Atualmente, grande parte da Floresta Atlântica é composta por fragmentos pequenos e modificados, ou áreas maiores restritas às vertentes com altas declividades (SOS Mata Atlântica, 2010). Ainda assim, a Floresta Atlântica abriga mais de 60% de todas as espécies de animais e plantas do planeta (Galindo-Leal e Câmara, 2005), sendo que muitas espécies são endêmicas (Myers *et al.* 2000). Tal riqueza de espécies e nível de endemismo também são encontrados na ordem Anura (Haddad, 1998; Rocha *et al.*, 2004) e grande parte dos registros de espécies de anuros ameaçadas de extinção no Brasil também está concentrada neste bioma (Silvano e Segalla, 2005; IUCN, 2008).

O modo como a fragmentação de habitat afeta as espécies de animais está relacionado à forma como os organismos respondem aos diferentes tipos de habitats, incluindo as matrizes devastadas (Laurance e Yensen 1991, Tocher *et al.* 1997, Gascon *et al.* 1999). Diferenças interespecíficas na susceptibilidade ao desmatamento, por exemplo, sugerem que para certas espécies de anuros a destruição do habitat é prejudicial, ao passo que tais danos ambientais não resultam em efeitos detectáveis sobre certos grupos, ou até mesmo beneficiam algumas espécies (Carnaval, 2002). Um exemplo deste fenômeno é a rápida ocupação dos fragmentos da Floresta Amazônica por espécies como *Chaunus marinus* e *Scinax ruber*, anuros que não são comumente encontrados em áreas de floresta preservada (Duellman 1999b). Desta maneira, torna-se claro que características gerais, como os padrões de deslocamento, a ecologia, o uso do hábitat e a habilidade de interagir com as mudanças em seu ambiente, são exemplos de fatores que devem ser analisados de maneira correlacionada para nos possibilitar melhor entender os efeitos da fragmentação sobre os organismos (Pearman, 1997).

As características bióticas e abióticas dos remanescentes florestais e das matrizes que os cercam são importantes fatores determinantes da diversidade de espécies capaz

de persistir nestes ambientes (Silvano *et al.*, 2003; Funk *et al.*, 2005; Neckel-Oliveira e Gascon, 2006). Tocher e colaboradores (1997) demonstraram que quanto menor a área do fragmento remanescente menor a diversidade de espécies de anfíbios. O grau de conservação do fragmento também é um importante fator, tendo em vista que fragmentos estruturalmente mais complexos apresentam maior diversidade de microhabitats e, conseqüentemente, maior condição de abrigar um maior número de espécies (Cardoso *et al.*, 1989). Em adição a esses fatores, o grau de isolamento do fragmento influencia na dispersão dos indivíduos de uma população, provocando uma diminuição do fluxo gênico. Como a dispersão atua sobre a dinâmica populacional de algumas espécies de anfíbios, a fragmentação ambiental pode acabar acarretando em extinções localizadas (Saunders *et al.*, 1991; Silvano *et al.*, 2003; Andersen *et al.*, 2004; Funk *et al.*, 2005). Deste ponto de vista, o sucesso dessas espécies em transitar por estas matrizes está provavelmente relacionado com suas características fisiológicas, especialmente na capacidade locomotora e no metabolismo energético. A atuação conjunta desses fatores pode ser determinante no processo adaptativo, no senso evolutivo do termo, das espécies de anfíbios originalmente presentes na área (Diamond e Hammond, 1992; Hammond *et al.*, 2001; Horowitz, 2001).

A fragmentação florestal também pode influenciar de várias maneiras as características comportamentais em anuros, como proposto por Neckel-Oliveira e Gascon (2006). Estes autores investigaram os padrões de locomoção, tamanho corpóreo e abundância em ambientes de diferentes graus de degradação de anuros da espécie *Phyllomedusa tarsius*, e concluíram que nos ambientes mais degradados os animais apresentam maior deslocamento, com movimentos constantes dos indivíduos entre as subpopulações, aumentando assim o cruzamento entre estas. Esses dados sugerem uma relação íntima entre aos aspectos fisiológicos ligados à locomoção e a habilidade dos

anuros para se deslocarem entre fragmentos de mata. Além disso, indicam que a fragmentação ambiental pode causar alterações na demanda energética de anfíbios anuros. Isso sugere a existência de uma relação entre a fisiologia do exercício e a habilidade de espécies de anfíbios em lidar com esse tipo de degradação, pois o deslocamento entre fragmentos seria favorecido pela (1) capacidade locomotora (derivada da fisiologia muscular e metabólica) e (2) pela possibilidade de aumentar o investimento energético na locomoção (dependente da fisiologia metabólica e o orçamento energético típico da espécie).

Fisiologia e capacidade locomotora em anuros

Os anfíbios anuros oferecem, de modo geral, a oportunidade de entender como as características metabólicas estão relacionadas tanto com o desempenho em determinados tipos de atividade quanto com o comportamento no campo. Isso se deve, sobretudo, à diversidade comportamental inter e intraespecífica do grupo, além das facilidades quanto à quantificação dos diversos comportamentos, à observação dos animais no campo e à manutenção destes em laboratório. Entretanto, existem poucas informações sobre as relações entre as variações funcionais dos sistemas metabólicos e a variação comportamental destes animais (Rome *et al.*, 1992; Hutchison e Dupré, 1992; Navas, 1995; Bevier, 1995, Wells, 2001), principalmente relacionando essas variações com a degradação ambiental.

Os estudos realizados sobre os processos fisiológicos relacionados com os padrões de atividade em anfíbios anuros sugerem uma grande variação na capacidade locomotora, e tal diversidade parece envolver vias metabólicas diferenciadas para síntese de ATP no músculo (Bennett e Licht, 1973; Taigen e Pough, 1985). Embora a atividade locomotora nestes animais seja predominantemente um evento sustentado

pelas vias energéticas independentes do oxigênio (Taigen e Pough, 1985), principalmente nas espécies que se deslocam de forma rápida em um curto intervalo de tempo, para outras espécies uma alta capacidade oxidativa está relacionada ao hábito locomotor sustentado ligado à busca ativa por presas (Taigen *et al.*, 1982; Taigen e Pough, 1985; Pough e Taigen, 1990, Hutchison e Dupré, 1992; Pough *et al.*, 1992). Nestas espécies, os sistemas bioquímicos e a composição estrutural da musculatura da pata traseira favorecem a produção de ATP através de vias aeróbias (Putnam e Bennett, 1983; Marsh e Taigen, 1987). Em termos de orçamento energético, nas espécies mais ativas, a locomoção deve ser responsável pela maior parte do gasto de energia, ainda mais quando envolve comportamentos de defesa territorial (Bennett, 1985). Essas atividades muito intensas podem levar os animais a operarem próximo dos limites aeróbios e glicolítico máximos e, segundo alguns autores, a capacidade para a transformação de energia nestes casos pode estar intimamente relacionada com a aptidão (Wells, 1977 e 1978; Taigen *et al.*, 1982).

No contexto da presente discussão é importante esclarecer que tanto a capacidade absoluta para a locomoção (e.g. Schmidt-Nielsen, 1989; Miller *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 2000; Oliveira, 2002) quanto muitas das diferenças na capacidade metabólica dos animais poderiam ser explicadas pela variação observada na massa corpórea. A massa corpórea também pode estar associada à massa absoluta e relativa dos tecidos musculares e/ou órgãos de maior importância metabólica, como o fígado, o trato gastrointestinal e o sistema nervoso (Hochachka e Somero, 2002; Rolfe e Brown, 1997). Cabe mencionar também que as atividades naturais de anuros, por serem animais ectotérmicos, são afetadas pela temperatura, um aspecto extremamente relevante quando considerado o impacto das mudanças provocadas no microhabitat sobre o

desempenho metabólico (Knowles e Weigl, 1990; Pough *et al.*, 1992, Bevier, 1995; Wells *et al.*, 1995; Navas *et al.*, 1999).

OBJETIVOS

Dentro do contexto da conservação de anfíbios anuros, este trabalho propõe um estudo comparativo para avaliar as implicações ecológicas da variação intra e interespecífica do metabolismo energético e fisiologia associada à capacidade locomotora de anfíbios anuros em fragmentos da Floresta Atlântica. Baseado em questões fundamentais acerca dos elementos do metabolismo energético em anuros, busca-se testar a hipótese geral de que **“a capacidade fisiológica para a atividade física associada à locomoção guarda relação com a habilidade de populações de anfíbios anuros em persistir em um fragmento florestal”**.

Apesar dos avanços mais recentes, pouco se tem estudado sobre os efeitos fisiológicos e comportamentais da degradação ambiental em anuros tropicais. Desta maneira, esta hipótese geral implica em diversas hipóteses específicas, as quais serão abordadas separadamente em cada capítulo desta tese.

Objetivo específico do capítulo 1

Tendo em vista que a capacidade de persistência em ambientes fragmentados depende da história de vida de cada espécie (Laurance e Yensen 1991, Tocher *et al.* 1997, Gascon *et al.* 1999; Carnaval, 2002), podemos supor que a fragmentação pode atuar de maneira singular nas características fisiológicas relacionadas à locomoção de espécies generalistas e especialistas. Diante desta perspectiva, comparamos as características morfológicas, fisiológicas e comportamentais associadas ao desempenho locomotor entre populações residentes em paisagens contínuas e fragmentadas.

Objetivo específico do capítulo 2

Partindo da premissa que a capacidade de persistir em habitats fragmentados está relacionada com a capacidade da manutenção de metapopulações, esperamos que a capacidade locomotora seja um dos fatores determinantes da persistência das populações nestes ambientes. Dessa maneira, esperamos que as espécies cujas populações foram extintas em paisagens fragmentadas apresentem menor capacidade locomotora, e diferenças morfológicas e fisiológicas associada à locomoção relacionadas a essa capacidade, quando comparadas com a das espécies que são encontradas tanto em paisagens contínuas quanto fragmentadas.

CAPÍTULO 1

FRAGMENTAÇÃO DE HABITAT E FISIOLOGIA EM ANFÍBIOS ANUROS DA FLORESTA ATLÂNTICA: DIFERENÇAS ENTRE ESPÉCIES GENERALISTAS E ESPECIALISTAS

Lye Otani¹, Carlos Arturo Navas Iannini¹, José Eduardo de Carvalho²

¹Departamento de Fisiologia - USP – São Paulo

²Departamento de Ciências Biológicas – UNIFESP – Campus Diadema

São Paulo - SP

Junho de 2011

1. Abstract

Habitat fragmentation is considered one of the most important factors responsible for decline and even extinction of amphibian populations worldwide. These changes in habitat affect differently each frog species. Specialist species seems to be more vulnerable and prone to population decline than generalist species. In this context, our study aim to compare the morphological characteristics of aerobic and glycolytic metabolism and locomotor performance among populations of *Physalaemus cuvieri*, *Proceratophrys boiei* from continuous and fragmented landscapes in two Atlantic forest sites in São Paulo. The first one is a generalist species of open area that also invades continuous and fragmented forest, and the second one is a specialist forest associated species. According our data, both populations of the specialist species and the generalist species discriminated by morphological and metabolic variables in the first case and only by morphological variables in the second case. In both cases, the morphological and physiological characteristics that differ between populations are closely related to locomotor performance. Thus, environmental differences between landscapes, including differences in temperature and humidity, seem to influence the morpho-physiological traits closely related to locomotor capacity. However, these relationships depend on Atlantic Forest sites and life history of the species in question.

Keywords: Intra-specific comparison; locomotor performance, habitat fragmentation; Anuran amphibians

Resumo

Populações de anfíbios em todo o mundo tem sido alvo de declínio e até extinção devido a alterações ambientais causadas pela ação antrópica, dentre as quais a fragmentação ambiental é a que mais se destaca. A fragmentação ambiental afeta de maneira distinta as diferentes espécies de anfíbios anuros, de modo que espécies especialistas são mais vulneráveis e sujeitas ao declínio populacional do que espécies generalistas. Dessa maneira, neste trabalho visamos à comparação das características morfológicas, do metabolismo aeróbio e glicolítico e do desempenho locomotor entre populações de *Physalaemus cuvieri*, uma espécie generalista de área aberta também invasora de paisagens fragmentadas e contínuas, e de *Proceratophrys boiei* uma espécie especialista associada a florestas provenientes de paisagens contínuas e fragmentada, em duas localidades de Floresta Atlântica do Estado de São Paulo. De acordo com os dados obtidos, pudemos observar que tanto as populações de uma espécie especialista, quanto à da espécie generalista de áreas abertas, são discriminadas pela atuação conjunta das variáveis morfológicas e metabólicas no primeiro caso, e apenas variáveis morfológicas no segundo caso. Em ambos os caso, as características morfofisiológicas que diferiram entre as populações estão intimamente relacionadas com o desempenho locomotor. Desta, as diferenças ambientais entre as paisagens, incluindo as diferenças de temperatura e umidade parece influenciar nas características morfofisiológicas que estão intimamente relacionadas com a capacidade locomotora. Entretanto, essas relações dependem da localidade e da história de vida das espécies em questão.

Palavras-chaves: Comparação intraespecífica; Desempenho locomotor; Fragmentação de habitat; Anfíbios anuros

2. Introdução

A fragmentação ambiental é considerada um dos principais fatores que tem levado ao declínio populacional de anfíbios (Silvano *et al.*, 2003; Funk *et al.*, 2005; Neckel-Oliveira e Gascon, 2006). Esta relação de causalidade entre esses dois processos, entretanto, é complexa e aborda fenômenos como: i) diminuição da razão entre a área do fragmento e a área considerada mínima para a manutenção de uma população viável; ii) redução da heterogeneidade do habitat, tanto no relativo aos fatores abióticos quanto bióticos; iii) aumento do efeito de borda, que altera as características microclimáticas do fragmento florestal; e iv) aumento da competição intraespecífica por recursos (Cardoso *et al.*, 1989; Tocher *et al.*, 1997; Vallan, 2000). Além desses fatores, a fragmentação de habitat geralmente acarreta na redução da dispersão de diversas espécies de animais e vegetais, com maior chance de gerar populações isoladas em fragmentos (Fahrig e Merriam, 1994). Esse isolamento favorece o aumento de extinções localizadas de diversas espécies de animais e plantas (Fahrig e Merriam, 1994; Zuidema *et al.*, 1996; Silvano e Segalla, 2005; Drinnan, 2005).

As diversas espécies animais, no entanto, são afetadas de maneiras e graus diferentes pela fragmentação florestal (Laurance e Yensen 1991, Tocher *et al.* 1997, Gascon *et al.* 1999). Por exemplo, no contexto específico dos anfíbios anuros, algumas espécies são extremamente sensíveis a destruição do habitat e outras são indiferentes a essas alterações, ou até respondem positivamente às mesmas (Carnaval, 2002). Um exemplo disso é a invasão das paisagens fragmentadas da Floresta Amazônica pelas espécies *Chaunus marinus* e *Scinax ruber*, as quais não são comumente encontradas em áreas de floresta preservada (Duellman 1999). Por outro lado, para as espécies associadas a florestas que conseguem se manter em paisagens fragmentadas, as alterações bióticas e abióticas do ambiente causadas pela fragmentação podem criar

fortes cenários de seleção natural (Saunders *et al.* 1991; Thomas *et al.* 1998; Ewers e Didham 2006). Essas alterações podem acarretar, via processos microevolutivos, mudanças adaptativas na morfologia (Wade, 2004) e na fisiologia (Hochachka e Somero, 2002; Bennet, 1997). Apesar desta íntima relação entre alteração ambiental e modificações populacionais, poucos trabalhos têm focado estas relações.

Além das possíveis variações de caráter microevolutivo, ajustes individuais, sejam esses reversíveis ou não, também podem ser importantes determinando o potencial de resposta à fragmentação. O tamanho corpóreo, por exemplo, é um dos poucos parâmetros morfológicos que se tem analisado neste contexto (Diaz *et al.*, 1999; Mazerolle, 2001; Neckel-Oliveira e Gascon, 2006). Mudanças no tamanho corpóreo, no índice corpóreo (relação entre comprimento do corpo e massa corpórea) e no comprimento do membro posterior podem indicar mudanças na história de vida decorrentes de mudanças na qualidade do habitat (Palkovacs, 2003; Buckley *et al.*, 2005; Lowe *et al.*, 2006). Por exemplo, Neckel-Oliveira e Gascon (2006) investigaram os padrões de deslocamento, tamanho corpóreo e abundância em ambientes de diferentes graus de degradação na espécie *Phyllomedusa tarsius*. Esses autores concluíram que nos ambientes mais degradados os animais apresentaram menor tamanho corpóreo. Essa mudança aconteceu juntamente com maior deslocamento e, conseqüente, aumento da conectividade entre as subpopulações. Estes resultados parecem refletir uma plasticidade fenotípica em diferentes aspectos da história natural (morfológica e comportamental).

A discussão anterior sinaliza uma resposta à fragmentação que se manifesta tanto na morfologia quanto no comportamento de deslocamento dos anuros. Essa resposta pode ser decorrente da reprodução diferencial dos indivíduos com maior tendência à locomoção (seleção natural) ou sinalizar uma tendência dos animais à maior locomoção

em áreas fragmentadas (plasticidade fenotípica). Contudo, a grande diversidade fisiológica existente dentre as espécies de anuros no relativo à capacidade para a locomoção ultrapassa enormemente o escopo dos ajustes plásticos ou microevolutivos. A diversidade na fisiologia da locomoção entre espécies de anuros envolve desde espécies oportunistas e pouco ativas (Taigen e Pough, 1985) até espécies com alta capacidade oxidativa relacionada ao hábito locomotor sustentado ligado à busca ativa por presas (Taigen *et al.*, 1982; Taigen e Pough, 1985; Pough e Taigen, 1990, Hutchison e Dupré, 1992; Pough *et al.*, 1992). Esta diversidade não deve ser interpretada como uma dicotomia mais como um contínuo de possibilidades, não necessariamente linear, dentro do qual podemos supor que exista enorme diversidade nas respostas à fragmentação. Entender essa diversidade é o objetivo central deste trabalho.

A construção teórica apresentada acima está ainda em fase indutiva, e sugere que as respostas morfofisiológicas associadas à locomoção frente à fragmentação de habitat podem ser muito diferentes entre as espécies de anuros. Uma construção teórica mais abrangente seria beneficiada pela coleta de dados empíricos comparando diversas espécies no que diz respeito às diferenças entre populações em paisagens contínuas e fragmentadas. Dentro desta perspectiva, tentamos maximizar o universo de respostas comparando pares de populações (paisagem contínua versus fragmentada) de uma espécie especialista associada a florestas e de uma espécie generalista da perspectiva da paisagem. Especificamente estudamos *Physalaemus cuvieri*, uma espécie generalista de área aberta também invasora de paisagens fragmentadas e contínuas, e *Proceratophrys boiei* uma espécie especialista associada a florestas. Para essas duas espécies levantamos quatro questões: 1) Existem características morfofisiológicas relacionadas ao desempenho locomotor que possibilitam a distinção entre indivíduos de paisagens contínuas e fragmentadas? Essas características são as mesmas para ambas as espécies?

2) Existem diferenças morfológicas relacionadas ao tamanho corpóreo e aos tamanhos relativos dos membros e órgãos entre indivíduos de paisagens fragmentadas e contínuas tanto em espécies generalistas quanto especialistas? Essas diferenças são similares entre as espécies? 3) Indivíduos de espécies presentes em paisagens fragmentadas apresentam maior desempenho locomotor do que indivíduos em paisagens contínuas? 4) Caso existam diferenças no desempenho locomotor, estas diferenças também se refletem nas capacidades metabólicas aeróbia e glicolítica de espécies generalistas e especialistas?

3. Material e Métodos

3.1. Animais experimentais e locais de coleta

O trabalho foi realizado em duas localidades da Floresta Atlântica do Estado de São Paulo, sendo que cada localidade abrangeu dois ambientes de diferentes graus de degradação. A primeira localidade está situada entre a Serra da Mantiqueira e a Serra do Mar ($23^{\circ}13'S$, $45^{\circ}20' W$), no município de São Luiz do Paraitinga (SLP), e a segunda localidade está situada no município de Ribeirão Grande, dentro do Planalto Atlântico Paulista ($24^{\circ}05'S$, $48^{\circ}22' W$). Ambas as localidades são compostas com fragmentos florestais e matrizes de pastagens (SLP) ou matrizes de agricultura (RG), os quais foram considerados como paisagem fragmentada (Figura 1). Adjacentes a cada ambiente fragmentado, selecionamos paisagens com florestas contínuas como ambiente controle. No caso dos fragmentos de SLP foi escolhido o Núcleo Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar, devido a sua maior proximidade ao ambiente fragmentado, e no caso de RG utilizamos o Parque Estadual de Intervales.

Figura 1. Paisagens contínuas e fragmentadas de Ribeirão Grande e São Luiz São Luiz do Paraitinga, Estado de São Paulo.

Nestes quatro ambientes foram coletadas duas espécies de anuros, *Physalaemus cuvieri* (Leiuperidae) e *Proceratophrys boiei* (Cycloramphidae), através de coleta ativa manual, após identificação visual, durante o período de reprodução (Tabela 1). Tais espécies foram selecionadas por dois motivos: (1) ambas são espécies de folhígeo com larvas aquáticas e (2) ambas estão presentes tanto em paisagens fragmentadas quanto em paisagens contínuas dos locais de estudo (Haddad & Sazima, 1992; Haddad, 1998; Bertolucci, 2001; Dixo, 2005; Becker, 2007; Giasson, 2008; Bruscagin, 2010). Entretanto, a primeira é uma espécie de pequeno porte (cerca de 3 cm) presente em áreas abertas e de distribuição geográfica bastante ampla (Frost, 2004; Dixo, 2005). Já *P. boiei* é uma espécie de porte médio (cerca de 7cm) encontrada em áreas de Floresta Atlântica desde o Estado de Pernambuco até Santa Catarina (Frost 2004).

Os animais capturados foram devidamente identificados e transportados ao laboratório onde foram mantidos em potes plásticos individuais em uma sala com temperatura de $(20.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12h. Com o intuito de evitar possíveis ajustes nas características fisiológicas decorrentes da permanência em cativeiro, os experimentos foram realizados em um intervalo de dois dias após a coleta dos animais.

Tabela 1. Número de indivíduos das espécies coletadas nas quatro áreas de coleta.

Paisagem	São Luiz do Paraitinga		Ribeirão Grande	
	Fragmentada	Contínua	Fragmentada	Contínua
<i>Physalaemus cuvieri</i>	11	10	8	11
<i>Proceratophrys boiei</i>	15	5	9	11

Com o intuito de obter algumas informações ambientais das quatro paisagens estudadas, coletamos dados de temperatura e umidade através de registradores automáticos de dados tipo iButton[®] (Sistema de Monitoramento de Temperatura Kooltrak) durante 10 dias dentro do período reprodutivo. Os aparelhos foram distribuídos a partir da borda, a cada 25m, até 100m no interior do fragmento seguindo o transecto utilizado para a coleta dos animais. Em cada transecto também foi instalado um único aparelho para medição de umidade relativa. Também foram instalados IButton[®] nas áreas abertas a 1 e 3 m dos corpos de água onde coletamos os exemplares de *P. cuvieri*. A partir dos dados de temperatura e umidade obtidos pelos IButton[®] calculamos a média diária, a moda diária, a máxima diária, a mínima diária e a amplitude diária em cada uma das áreas amostradas. É válido ressaltar que a escala temporal em que estes dados foram coletados são insuficientes para uma caracterização adequada das paisagens comparadas. Entretanto, consideramos que uma amostra de dados climáticos atrelada aos microhabitats utilizados por anuros, mesmo sendo de curta duração, pode contribuir para entender as relações entre a fragmentação de habitat

e as respostas morfofisiológicas associadas à locomoção apresentadas por *P. cuvieri* e *P. boiei*.

3.2. Massa corpórea e morfologia

A massa corpórea (Mc) foi medida a cada início e término dos experimentos. Em todos os indivíduos também foram feitas medidas morfológicas, como os comprimentos rostro-cloacal (CRC), do fêmur, da tíbia, do pé, total do membro posterior, da cabeça e do mesmo anterior. Como variáveis morfológicas, consideramos também a massa dos principais órgãos (coração, fígado, rim e trato gastrointestinal) e tecidos (músculos do membro posterior, músculo do tronco oblíquo externo e interno). Para a pesagem dos órgãos e tecidos, os animais foram previamente anestesiados em água com gelo e mortos por decapitação seguida de espinhalação. Os órgãos foram retirados íntegros, pesados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido, sendo estes posteriormente armazenados em freezer -85°C. Apenas o trato gastrointestinal teve seu conteúdo interno lavado antes da pesagem. Todos os músculos do membro posterior esquerdo foram retirados e pesados em conjunto, como representativo da massa muscular total do membro.

3.3. Desempenho locomotor

Cada indivíduo foi submetido a um teste de salto entre as 7h e 18h, em uma sala com temperatura de $(20,0 \pm 1,0)^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar a 90% (com sugere Oliveira, 2002). A avaliação do desempenho locomotor foi realizada em uma arena de (1,5 x 2,0) m, com o solo coberto com um tecido branco constantemente umedecido, onde os animais eram estimulados manualmente a saltar até atingirem a exaustão ou se manterem imóveis durante 2 minutos (quando não mais respondiam ao serem colocados

em decúbito ventral). Todo o experimento foi filmado com uma câmera fotográfica digital e os vídeos foram analisados com o software Quintic Sports 1.08 v17. Através dessas análises obtivemos o número de saltos, a distância total percorrida (representando a resistência ao exercício), o tempo despendido até a exaustão (representando o tempo de exaustão) e a distância do salto mais longo (representando a potência do maior esforço), fatores importantes na determinação do desempenho locomotor relacionada à dispersão (Else e Bennett, 1987; Oliveira, 2002).

3.4. Metabolismo energético

O metabolismo energético foi registrado em dois momentos: (1) durante o repouso ($\text{VO}_{2\text{rep}}$) e imediatamente após exercício ($\text{VO}_{2\text{ativ}}$) e estimados a partir do consumo de oxigênio durante o período das 7h às 18h e a uma temperatura de $(20,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$. O consumo de oxigênio foi quantificado através do método de respirometria intermitente aplicando-se um fluxo de ar de 200ml/min. Com o auxílio de um analisador de oxigênio PA-1 (Sable Systems), acoplado a uma bomba de sucção e a um Fluxímetro FL-1494-S (Omega Engineering Inc.), a variação na concentração de oxigênio em relação à linha de base (concentração de oxigênio atmosférico) foi registrada e analisada através dos programas Datacan V e Expedata 1.0.19 (Sable Systems). Um recipiente contendo Sílica Gel e Ascarite foi posicionado antes da entrada no analisador O_2 , para que a água e o CO_2 da amostra de ar não interferissem na medida. O VO_2 foi calculado a partir da integral do sinal obtido pelo analisador de O_2 multiplicado pelo valor do fluxo de ar, dividido pelo tempo em que as câmaras permaneceram fechadas e pela Mc do animal. Os valores obtidos foram corrigidos segundo o formalismo apresentado por Dejours (1981).

No caso da quantificação do $\text{VO}_{2\text{rep}}$, os animais foram individualizados em câmara respirométrica de acrílico dentro uma caixa de isopor com fluxo de ar constante, duas horas antes do experimento, visando a sua aclimação às condições experimentais. No momento da quantificação do consumo de oxigênio, o animal ficou fechado dentro da câmara por 30 minutos quando, posteriormente, todo o conteúdo de ar da câmara foi enviado ao sensor de oxigênio durante outros 30 minutos. No caso da determinação do $\text{VO}_{2\text{ativ}}$, o animal foi colocado na câmara metabólica imediatamente após o término das medidas de desempenho locomotor (Gleeson, 1991; Gleeson e Hancock 2002). Neste caso, os animais foram mantidos fechados na câmara por 15 minutos após o término da atividade e o conteúdo da câmara analisado por mais 30 minutos.

3.5. Tratamento das amostras de tecido e atividade enzimática

As amostras de tecido foram descongeladas e homogeneizadas em 9 volumes de tampão Imidazol-HCl-20mM (pH 7,4) contendo EDTA-2mM; NaF-20mM; PMSF-1mM e Triton X-100-0,1%; mantidas sobre gelo, em um homogeneizador tipo Turrax com pistilo de teflon (Ultra Stirrer 80). A ruptura das membranas mitocondriais foi efetuada por meio de sonicação utilizando-se um sonicador Misonix XL2000 (Qsonica LLC.).

A determinação das atividades máximas das enzimas lactato desidrogenase (LDH), pertencente à via glicolítica, e da citrato sintase (CS), pertencente ao Ciclo de Krebs, nas amostras de músculos do membro posterior foi realizada utilizando-se cubetas de quartzo para 700 μL no espectrofotômetro Beckman DU-800 equipado com um controlador de temperatura Peltier (Beckman Inc.). Utilizamos métodos baseados nas alterações de absorbância de NADH a 340nm (LDH), ou DTNB a 412nm (CS), à 20°C, em condições de saturação de substrato e não inibitórias, de acordo com as

modificações feitas a partir de Bergmeyer (1983). Todos os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados de atividade enzimática são expressos em μmol de substrato convertido em produto, por minuto e por grama de tecido úmido, nas condições do ensaio.

3.6. Análises estatísticas

Inicialmente todos os resultados foram transformados em Log na base 10 para a sua normalização. Posteriormente, verificamos a existência do efeito da Mc sobre as variáveis morfológicas (massa do coração, do fígado, do rim, do trato gastrointestinal e dos músculos do membro posterior e do tronco) e metabólicas ($\text{VO}_{2\text{rep}}$, $\text{VO}_{2\text{ativ}}$ e escopo metabólico) e do CRC sobre as variáveis morfométricas (comprimento do fêmur, da tíbia, do pé e do membro posterior). Nos casos onde essa relação foi significativa, os efeitos do tamanho corpóreo foram anulados por meio da utilização dos resíduos resultantes da regressão linear entre a Mc ou CRC (variável independente) e a variável em questão (variáveis dependentes) (Jakob *et al.*, 1996). No caso das figuras e tabelas, os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Em uma primeira abordagem, utilizamos uma análise discriminante passo a passo (*stepwise*) para identificar quais as variáveis mais relevantes na diferenciação das populações de *P. cuvieri* e *P. boiei*. Para isso geramos duas funções discriminantes, sendo a primeira gerada com o intuito de diferenciar os indivíduos provenientes de RG e SLP, independente da paisagem/ enquanto a segunda função tem como objetivo diferenciar os indivíduos residentes nas paisagens fragmentadas dos indivíduos das paisagens contínuas. O poder discriminante dessas equações foi testado pela sua eficácia na classificação das observações originais. A comparação das variáveis que compõem cada função e a porcentagem de classificações corretas nos possibilitará identificar

quais as variáveis mais importantes na diferenciação dos indivíduos entre paisagens e localidades.

As análises discriminantes, no entanto, não mostram as diferenças entre as populações para cada uma das variáveis. Assim, as diferenças de todas as variáveis entre as quatro populações de *P. cuvieri* e *P. boiei* foram analisadas através de ANOVA de duas-vias ou do Modelo Linear Geral, caso os dados não atendessem os requisitos necessários ao teste paramétrico (de homogeneidade das variâncias e normalidade), sendo que a “paisagem” (fragmentada e contínua) e a “localidade” (SLP e RG) foram os dois fatores utilizados nesta análise. Todos os resultados desta análise estão apresentados no Anexo 1. Através dos testes *a posteriori* de Duncan, testamos a existência de diferenças significativas nas variáveis de temperatura e umidade entre as localidades, as paisagens e a interação entre estes dois fatores. Por fim, para averiguar a relação entre as variáveis morfofisiológicas e o desempenho locomotor utilizamos a Correlação de Pearson. Todos os procedimentos foram empregados segundo Zar (1996), com o auxílio do programa SPSS statistics 18.

4. Resultados

4.1. Temperatura e umidade relativa

De modo geral, RG foi a localidade que apresentou as maiores temperaturas médias diárias ($F_{3,510}=91,571$; $P<0,001$), a maior moda da temperatura diária ($F_{3,510}=69,293$; $P<0,001$) e as maiores temperaturas mínimas diárias ($F_{3,510}=146,006$; $P<0,001$). Por outro lado, esta localidade apresentou menor amplitude térmica diária ($F_{3,510}=39,366$; $P<0,001$) do que SLP, independente da paisagem (Figura 2). Quando comparamos as paisagens independentemente da localidade, observamos que as fragmentadas apresentam as maior temperatura média diária ($F_{3,510}=30,594$; $P<0,001$),

maior moda da temperatura diária ($F_{3,510}=4,410$; $P=0,036$), maior temperatura máxima diária ($F_{3,510}=19,059$; $P<0,001$) e maior temperatura mínima diária ($F_{3,510}=15,589$; $P<0,001$) do que as áreas contínuas, mas nenhuma diferença foi encontrada com relação à amplitude térmica diária ($F_{3,510}=2,457$; $P=0,118$). Já no caso da interação entre os dois fatores só foram significativamente diferentes com relação à temperatura média diária ($F_{3,510}=30,594$; $P<0,001$) e a temperatura mínima diária ($F_{3,510}=15,589$; $P<0,001$), de modo que em ambas as variáveis as temperatura foram maiores nas paisagens fragmentadas que nas contínuas em SLP, mas essa diferença não é significativa em RG. Além disso, quando comparamos as mesmas paisagens dos dois locais podemos observar que RG apresentam sempre os maiores valores de temperatura (Figura 2).

Figura 2. Média e desvio padrão da temperatura média diária (média), moda da temperatura diária (moda), temperatura máxima diária (máxima) e temperatura mínima diária (mínima) nas paisagens contínuas e fragmentadas de Ribeirão Grande (RG) e São Luiz do Paraitinga (SLP)

As variáveis referentes à umidade relativa do ar, por outro lado, são menos contrastantes tanto entre as localidades quanto entre as paisagens. Quando não

consideramos as paisagens, SLP possui maior umidade máxima diária ($F_{3,114}=9,959$; $P=0,002$), maior mínima diária ($F_{3,114}=5,613$; $P=0,02$) e maior amplitude diária ($F_{3,114}=17,425$; $P<0,001$) em relação aos dados obtidos para RG, mas nenhuma diferença foi observada entre as paisagens independente da localidade. Quando analisamos os dois fatores concomitantemente, apenas a umidade máxima diária apresentou diferenças ($F_{3,114}=4,768$; $P=0,031$), a qual foi maior para as paisagens fragmentadas do que para as contínuas em SLP, mas igual entre as paisagens em RG. Ainda dentro desta análise, ambas as paisagens de SLP apresentaram maiores amplitudes de umidade diária do que as mesmas paisagens de RG (Figura 3).

Figura 3. Média e desvio padrão da umidade relativa do ar média diária (média), moda da umidade relativa do ar diária (moda), máxima umidade relativa do ar diária (máxima) e umidade mínima relativa do ar diária (mínima) nas paisagens contínuas e fragmentadas de Ribeirão Grande e São Luiz do Paraitinga

4.2. Diferenciação entre populações

Os indivíduos de *P. cuvieri* proveniente de RG ou SLP podem ser discriminadas através de uma função discriminante composta de 4 variáveis (Tabela 2), enquanto os indivíduos das paisagens contínuas e fragmentadas são diferenciados através de uma função discriminante contendo apenas 3 variáveis (Tabela 2). No primeiro caso 82,6% indivíduos foram classificados corretamente, sendo 80% dos provenientes de SLP e 84,6% dos de RG. No segundo caso, a validação da função mostra que 71,7% indivíduos são classificados corretamente, 73,7% dos de paisagens fragmentadas e 70.4% dos de paisagens contínuas.

Tabela 2 – Autovalor referente às análises discriminantes, as variáveis e seus coeficientes referentes à função Canônica discriminante obtida para *Physalaemus cuvieri* e *Proceratophrys boiei*.

<i>Physalaemus cuvieri</i>				<i>Proceratophrys boiei</i>			
AMBIENTE		LOCAL		AMBIENTE		LOCAL	
Autovalor	0,46	Autovalor	0,862	Autovalor	0,836	Autovalor	5,429
Variável	Coef.	Variável	Coef.	Variável	Coef.	Variável	Coef.
Massa Corpórea	0,820	Comprimento do membro posterior*	0,744	VO ₂ ativ	-0,626	Massa Corpórea	1,005
Comprimento do Fêmur*	0,760	Número de Saltos	0,542	Comprimento do membro posterior*	0,803	VO ₂ ativ	0,549
Comprimento do Pé	-0,976	Potência do Salto	-0,451	Atividade da Citrato Sintase*	0,756	Comprimento do Fêmur*	-1,037
		Massa dos Rins*	1,018			Comprimento da Cabeça*	-0,466
						Massa do Coração*	0,730
						Atividade da Citrato Sintase*	0,524
Validação	71,7%	Validação	82,6%	Validação	75,7%	Validação	97,3%

Obs – * indica as variáveis que apresentaram correlação significativa com a massa corpórea ou o comprimento rostro-cloacal, sendo então utilizada em sua forma de resíduo resultante da regressão linear entre a variável em questão e a massa corpórea ou o comprimento rostro-cloacal.

No caso de *P. boiei*, 73% dos indivíduos coletados foram discriminados corretamente entre as paisagens de origem (fragmentada ou contínua) independente do local de estudo (RG e SLP), através de 3 variáveis associadas à capacidade locomotora (função discriminante, ver Tabela 2). Entretanto, a discriminação entre os indivíduos de RG e SLP, independente da paisagem de origem, é mais eficiente (97,3%) e utiliza-se de um maior número de variáveis morfofisiológica (Tabela 2).

4.3. Massa corpórea e morfologia

As populações de *P. cuvieri* e de *P. boiei* diferiram em diversos aspectos morfológicos. Os indivíduos de *P. cuvieri* proveniente de paisagens fragmentadas possuem maiores Mc e CRC. Neste último caso, indivíduos de RG também apresentaram maior CRC do que os de SLP, independentemente da paisagem de origem (Figura 4). Já no caso de *P. boiei*, as diferenças se restringem dentro de SLP, onde os animais de paisagem contínua apresentaram maior Mc do que os de fragmentada. Além disso, quando comparamos as paisagens fragmentadas dos dois locais de estudo observamos que em RG os indivíduos possuem maiores Mc do que em SLP (Figura 4). Com relação às características morfológicas de *P. cuvieri* de paisagens contínuas apresentaram menores comprimentos do fêmur, da tíbia e do pé, menor massa do trato gastrointestinal e maior massa dos músculos do tronco (Figura 5). Entretanto, a diferença do comprimento do pé é restrita aos indivíduos de SLP e da massa dos músculos do tronco é restrita àqueles de RG. Além disso, os indivíduos de RG apresentaram maiores comprimentos do membro posterior, do pé e da massa do trato gastrointestinal, além de menor comprimento da cabeça e massa dos músculos do tronco (ver Anexo 1).

As variáveis morfológicas que diferiram entre as populações de *P. cuvieri* não apresentaram os mesmos padrões em *P. boiei* (Figura 6 e 7). Nesta espécie, os indivíduos provenientes de RG apresentaram maiores massas dos músculos do membro posterior e do coração e menor massa do trato gastrointestinal (Figura 6). Entretanto, tanto a massa dos músculos do membro posterior só foi estatisticamente diferente entre os indivíduos de paisagens fragmentadas. Ao comparar as paisagens, por outro lado, observamos que os indivíduos residentes em paisagens contínuas apresentam maiores comprimento do fêmur, do pé e do membro posterior, além de maiores massas dos músculos do membro posterior e do fígado (Figura 7). No caso do comprimento do fêmur e da massa dos músculos do membro posterior constatou-se que esta diferença se restringe aos indivíduos provenientes de SLP.

Figura 4. Média e desvio padrão da massa corpórea e comprimento rostro-cloacal das populações de *Physalaemus cuvieri* e *Proceratophrys boiei* provenientes de paisagens contínuas e fragmentadas de São Luiz do Paraitinga e Ribeirão Grande. * e ** indicam diferenças significativas entre as populações.

Figura 5. Boxplot do resíduo do comprimento do fêmur e da tíbia com o comprimento rostro-cloacal, do Log do comprimento do pé, e do resíduo da massa do trato gastrointestinal e dos músculos do membro posterior com a massa corpórea das populações de *Physalaemus cuvieri* provenientes de São Luiz do Paraitinga e Ribeirão Grande.

Figura 6. Boxplot do resíduo do comprimento do fêmur, do pé e do membro posterior com o comprimento rostro-cloacal, e do resíduo da massa dos músculos do membro posterior com a massa corpórea das populações de *Proceratophrys boiei* provenientes de São Luiz do Paraitinga e Ribeirão Grande.

Figura 7. Boxplot do resíduo da massa do coração, do fígado e do trato gastrointestinal com a massa corpórea das populações de *Proceratophrys boiei* provenientes de São Luiz do Paraitinga e Ribeirão Grande.

4.4. Metabolismo energético e atividade enzimática

Apenas o $VO_{2\text{ativ}}$ e o escopo metabólico estão correlacionadas com a Mc para *P. cuvieri*. Já as atividades da citrato sintase e da LDH estão correlacionadas com a Mc para ambas as espécies. Entre as populações de *P. cuvieri* não foram observadas diferenças significativas nas atividades da LDH e CS dos músculos do membro posterior. Entretanto, os indivíduos de RG apresentaram maior $VO_{2\text{rep}}$ do que os de

SLP (Figura 8). Além disso, em RG, os animais provenientes de paisagens contínuas apresentaram menor VO_2 ativ.

Assim como *P. cuvieri*, os indivíduos de *P. boiei* de RG apresentaram maior VO_2 rep, porém também apresentaram maior VO_2 ativ. No caso do VO_2 rep, essa diferença está restrita aos indivíduos de paisagens contínuas. Quando comparamos as paisagens, os indivíduos de paisagens contínuas apresentaram maior atividade da citrato sintase, porém menores VO_2 rep e VO_2 ativ. Nestes últimos dois caso, a diferença só foi significativa em SLP (Figura 8).

Figura 8. Boxplot do Log da taxa metabólica de repouso (VO_2 repouso), da taxa metabólica após atividade (VO_2 pós atividade) e da atividade da citrato sintase nos músculos do membro posterior das populações de *Proceratophrys boiei* provenientes de São Luiz do Paraitinga e Ribeirão Grande.

4.5. Desempenho locomotor

Todos os indivíduos de *P. cuvieri* responderam de maneira satisfatória aos estímulos para os experimentos de capacidade locomotora, e atingiram o estado de exaustão de modo muito evidente. Nenhuma diferença com relação a esta variável foi encontrada entre as populações. Desta mesma forma, com exceção a alguns espécimes de *P. boiei*, a maioria dos indivíduos também responderam aos estímulos experimentais; contudo, diferente de *P. cuvieri*, todas as variáveis do desempenho locomotor são estatisticamente diferentes entre as populações de *P. boiei*. Todavia, padrões distintos podem ser destacados quando comparamos separadamente dentro dos locais de estudo ou dentro das distintas paisagens.

Os indivíduos provenientes de RG apresentaram maior resistência, tempo de exaustão e número de saltos e menor potência do salto do que aqueles de SLP. Essas diferenças podem ser consideradas singulares às populações de paisagens fragmentadas, de modo que resultados comparativos com padrões inversos são observados em paisagens contínuas (Figura 9). Quando comparamos as paisagens contínuas e fragmentadas em SLP, observamos que os indivíduos de *P. boiei* provenientes de paisagens contínuas apresentam maior resistência, tempo de exaustão, número de saltos e potência do que os indivíduos de paisagens fragmentadas. Por outro lado, em RG, os animais de paisagem contínua apresentam menor tempo de exaustão e menor potência do que os de paisagem fragmentada, e as outras duas variáveis não diferiram entre estas duas populações (Figura 9).

Figura 9. Boxplot do Log da resistência, do tempo de exaustão do número de saltos e da potência do salto das populações de *Proceratophrys boiei* provenientes de São Luiz do Paraitinga (SLP) e Ribeirão Grande (RG).

Os indivíduos de *P. cuvieri* que apresentaram maior resistência também apresentaram um maior tempo de exaustão ($R=0,571$; $P<0,0001$) e executaram um maior número de saltos ($R=0,713$; $P<0,0001$), além disso, a correlação entre estas duas últimas variáveis também é positiva e significativa ($R=0,818$; $P<0,0001$) (Figura 10). Dessa mesma maneira, *P. boiei* com maior resistência apresentaram maior tempo de exaustão ($R=0,850$; $P<0,0001$), desempenhou um maior número de saltos ($R=0,942$;

$P < 0,0001$) e maior potência do salto ($R = 0,503$; $P < 0,0001$). Apesar das diferenças significativas observadas nas diversas características morfológicas e metabólicas em ambas as espécies, apenas a atividade da LDH explica parcialmente a variação na resistência observada dentre os indivíduos de *P. boiei* (Figura 11: $r^2 = 0,214$; $P < 0,01$).

Figura 10. Correlação entre as variáveis do desempenho locomotor (resistência, tempo de exaustão, número de saltos e potência do salto) de *Physalaemus cuvieri* coletados em paisagens fragmentadas e contínuas em São Luiz do Paraitinga (SLP) e Ribeirão Grande (RG).

Figura 11. Correlação entre as variáveis do desempenho locomotor (resistência, tempo de exaustão, número de saltos e potência do salto) e a regressão linear entre a atividade da lactato desidrogenase e a resistência em *Proceratophrys boiei* coletados em paisagens fragmentadas e contínuas em São Luiz do Paraitinga (SLP) e Ribeirão Grande (RG).

5. Discussão

5.1. Temperatura e umidade relativa

A fragmentação florestal altera de diferentes maneiras as características bióticas e abióticas tanto dos remanescentes florestais quanto do seu entorno. Dentre as alterações abióticas em um fragmento florestal, podemos destacar alterações nas intensidades de luz, temperatura, umidade e vento, resultantes do aumento do efeito de borda (Lovejoy *et al.*, 1986; Kapos, 1989; Saunders *et al.* 1991; Bierregaard *et al.*, 1992; Galindo-Leal e Câmara, 2005). Nosso trabalho apresenta dados climáticos gerais, os quais foram coletados durante as amostragens. Contudo, uma comparação entre microclimas de áreas contínuas e fragmentadas dentro do contexto ecológico requer

uma abordagem diferenciada quanto ao número de variáveis analisadas, bem como quanto a fisionomia do microambiente. Ainda que nossos resultados de temperatura e umidade retratem as condições microclimáticas de uma pequena parte da paisagem durante um curto período, eles corroboram com os dados da literatura, e evidenciam maiores temperaturas e menor umidade nas paisagens fragmentadas do que nas paisagens contínuas. Entretanto, essas diferenças dependem da localidade geográfica onde se encontram estas paisagens, e são mais marcantes em SLP do que em RG.

Essas diferenças entre localidades são esperadas, uma vez que os dados foram coletados por um curto intervalo de tempo, e cada área de estudo apresenta histórias de ocupação distintas e refletem a heterogeneidade da estrutura e composição da Floresta Atlântica (Leitão-Filho, 1987). Então, assumimos que, tanto pela literatura quanto pela nossa amostra de dados climáticos, existem diferenças microclimáticas entre locais e entre paisagens, e que tais diferenças podem ser parcialmente responsáveis pela diferenciação de populações por local de origem e tipo de paisagem. Entretanto, nossos dados não foram coletados com o intuito de testar hipóteses sobre as relações de causa e efeito entre paisagem e fisiologia. Ainda assim, a especulação sobre uma relação microclima-fenótipo deve ser levada em consideração, pois a temperatura influencia diversas características do desenvolvimento de anfíbios anuros, podendo até definir diversos aspectos do fenótipo dos indivíduos após a metamorfose (Smith-Gill e Berven 1979; Hensley, 1993; Hentschel, 1999, Morey e Reznick, 2000; Buchholz e Hayes, 2002; Niehaus *et al.*, 2006). Contudo, o fenótipo de anuros é sabidamente alterado por inúmeras variáveis, não só climáticas, mas também bióticas (Feder, 1992; Van Buskirk e Relyea, 1998; Morey e Reznick, 2001; Hunt e Farrar, 2002; Van Buskirk, 2002; Sabat *et al.*, 2005), neste sentido devemos considerar neste trabalho, o termo “ambiente” em seu sentido mais amplo.

5.2. Diferenciação entre populações

As alterações ambientais decorrentes da fragmentação florestal podem acarretar em distinções morfológicas, fisiológicas e/ou comportamentais quando comparamos populações de paisagens fragmentadas de contínuas, seja devido à seleção natural (processos micro-evolutivos) ou à plasticidade fenotípica (Wade, 2004). Nossos resultados permitem diferenciar padrões morfofisiológicos das populações de *P. cuvieri* e *P. boiei*, independentemente dos processos pelos quais eles ocorrem. Dessa maneira, podemos sugerir que tanto diferenças ambientais entre localidades (RG e SLP) quanto entre paisagens (fragmentada e contínua) estão associados a diferenças no fenótipo desses indivíduos. Além disso, essas diferenças possibilitam a formulação de funções lineares capazes de discriminar os indivíduos de *P. cuvieri* e *P. boiei* pertencentes a cada população.

De acordo com as funções discriminantes, as variáveis fenotípicas diretamente associadas à locomoção são influenciadas pela paisagem, porém essa relação difere entre *P. cuvieri* e *P. boiei*. Quando comparamos as variáveis selecionadas para a formulação das funções discriminantes geradas para diferenciar as populações de paisagens contínuas e fragmentadas, observamos que os indivíduos de *P. cuvieri* são discriminados com base somente em variáveis morfológicas (massa corpórea, comprimento do fêmur e do pé). Já a discriminação entre os indivíduos de RG e SLP é baseado tanto em características morfométricas (comprimento do membro posterior e massa dos rins) quanto em características do desempenho locomotor (número de saltos e potência do salto). O comprimento relativo do membro posterior e/ou de seus componentes (comprimento da tíbia, do fêmur e do pé) é frequentemente relacionado com a potência e a velocidade do salto em anfíbios (Emerson, 1978, 1991; John-Alder e

Morin, 1990; Miller *et al.*, 1993; Choi *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2000; Nauwelaerts *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2009) e são importantes dentro do contexto de fuga contra predador (Bennett e Licht, 1974; Dickinson *et al.*, 2000; Wells, 2007). Esta relação parece ser especialmente importante no caso de *P. cuvieri*, uma vez que esta espécie habita principalmente áreas abertas.

Por outro lado, os indivíduos de *P. boiei* de paisagens contínuas e fragmentadas são discriminados através de uma variável morfológica (comprimento do membro posterior) e duas metabólicas (VO_2 ativ e atividade da CS). Os indivíduos desta espécie de RG e SLP também são discriminados com base nas mesmas características metabólicas, porém a contribuição da morfologia é maior (massa corpórea, comprimento do fêmur, massa do coração). Essas diferenças podem ser um forte indício do que a fragmentação afeta de maneira distinta cada espécie, dependendo da sua história de vida (Laurance, 1991; Tocher *et al.*, 1997; Cosson *et al.*, 1999; Dixo, 2005; Steinicke, 2008). O comprimento relativo do membro posterior e o desempenho locomotor estão associados ao nicho ecológico ocupado pela espécie (Emerson, 1978, 1985; Gomes *et al.*, 2009), assim como o metabolismo aeróbio está associado ao comportamento de forrageio e reprodutivo (Taigen & Pough, 1985).

5.3. Massa corpórea e morfologia

A massa corpórea (Mc) é principal indicativo do estado nutricional e equilíbrio energético animal (Pond, 1978). Em anfíbios anuros, esta variável também é utilizada como uma medida de aptidão, uma vez que ela, assim como o CRC, está positivamente correlacionada com a sobrevivência (Berven, 1990; Morey e Reznick, 2001; Altwegg e Reyer, 2003; Vonesh, 2005) e o sucesso reprodutivo (Berven, 1981; Gibbons e McCarthy, 1986; Duellman e Trueb, 1994). Assim, mudanças no tamanho corpóreo são

importantes indicadores de alterações na história de vida e/ou na qualidade do habitat (Palkovacs, 2003; Buckley *et al.*, 2005; Lowe *et al.*, 2006). De fato, a Mc foi a principal variável na discriminação dos indivíduos de *P. cuvieri* de paisagens contínuas e fragmentada, e na discriminação dos indivíduos de *P. boiei* de RG e SLP. Contudo, o efeito da fragmentação de habitat sobre a Mc de *P. cuvieri* e *P. boiei* é distinto, pois enquanto os indivíduos de *P. cuvieri* apresentam maiores Mc em paisagens fragmentadas, os indivíduos de *P. boiei* apresentam menores Mc do que os indivíduos de mesma espécie em paisagens contínuas.

Assim como observado em nosso trabalho, o efeito da fragmentação sobre o orçamento energético e o tamanho corpóreo em anuros ainda é considerado diverso (Steinicke, 2008), apesar de o tamanho corpóreo ser considerado um importante preditor da sensibilidade à fragmentação de habitat (Henle *et al.*, 2004). Neckel-Oliveira e Gascon (2006) observaram que os indivíduos de *Phyllomedusa tarsius* em ambientes fragmentados possuem menor tamanho corpóreo que os de ambientes contínuos, e discutem a possibilidade desse padrão estar associado ao maior deslocamento destes indivíduos e com a temperatura da água nos sítios reprodutivos. Segundo os autores, este padrão parece estar relacionado à plasticidade fenotípica, onde o menor tamanho corpóreo está relacionado com o rápido processo de metamorfose induzido pela alta temperatura dos sítios reprodutivos (Smith-Gill e Berven 1979; Hensley, 1993; Hentschel, 1999; Morey e Reznick, 2000).

Considerando que utilizamos apenas indivíduos adultos durante o período reprodutivo, nosso estudo mostra que *P. boiei* de paisagens fragmentadas apresentam menor Mc do que de paisagens contínuas, ao menos para SLP, assim como sugerido pelo trabalho de Neckel-Oliveira e Gascon (2006). Da mesma maneira que sugerido para *P. tarsius*, a diferença na Mc desta espécie pode estar relacionada às diferenças

ambientais encontradas entre as paisagens contínuas e fragmentadas de SLP, e sua ausência em RG. Por exemplo, maiores temperaturas médias diárias dos remanescentes florestais podem alterar de diversas maneiras o balanço energético (i.e. taxa metabólica, taxa de desenvolvimento, desempenho comportamental, entre outros) de uma espécie restrita a ambientes florestais, como é o caso de *P. boiei* (Bellis, 1962; Huey e Stevenson, 1979; Berven, 1982; Navas, 1996; Hochachka e Somero, 2002).

Como ressaltado anteriormente, nossos dados não trazem informações sobre os processos responsáveis pelos quais a diversidade fenotípica entre populações, nem sobre as conseqüências de tal diversidade, mas sobre os padrões de variação fenotípica que encontramos. Tendo em vista que o tamanho corpóreo, o comprimento relativo dos membros e a fisiologia metabólica são características intimamente associadas à capacidade locomotora, a hipótese de que a fragmentação de habitat e a locomoção são associadas é favorecida. Por outro lado, a maior MC dos indivíduos de *P. cuvieri* nas paisagens fragmentadas mostram que estas relações são complexas e variam de espécie para espécie. De fato, alguns autores têm procurado interpretações alternativas para esses padrões no tamanho corpóreo. Por exemplo, Mazerolle (2001) registrou indivíduos de maior CRC em paisagens fragmentadas do que em paisagens contínuas para duas espécies de rãs, *Rana sylvatica* e *R. pipiens*. Segundo o autor, indivíduos de maior tamanho corpóreo são mais hábeis para se movimentarem em ambientes de baixa umidade devido à relação superfície-volume corpórea (Thorson, 1955; Titon *et al.*, 2010).

Existe a possibilidade de que os padrões encontrados neste estudo sejam parcialmente influenciados por diferenças no ambiente hídrico. Esta possibilidade deve ser considerada uma vez que a massa dos rins, órgão de importante papel no balanço hídrico (Wells, 2007; Hillman *et al.*, 2009), representa um importante componente na

discriminação entre populações de *P. cuvieri* e de *P. boiei* de RG e SLP (localidades com umidades máximas e mínimas diárias distintas). Obviamente, além das relações hídricas, alterações no tamanho dos rins podem estar relacionadas com a disponibilidade e tipo de alimento consumido (Naya *et al.*, 2005; 2009) ou até a contaminação por poluentes químicos (Buhler *et al.*, 1977; Howe *et al.*, 2001; Releya, 2004). Contudo, a relação com balanço hídrico é possível e compatível com os nossos resultados, e pode ser explorada com maior detalhe em estudos futuros.

De acordo com nossos resultados, o rim não é o único órgão que apresenta alterações associadas às diferenças ambientais entre as paisagens e localidades, tais diferenças também foram observadas na massa do coração, fígado e trato gastrointestinal. Assim como os rins, as diferenças na massa desses órgãos também dependerem da espécie. Ou seja, para *P. boiei* as diferenças na massa do fígado foi observada entre as paisagens e na massa do coração, dos rins e do trato gastrointestinal foi observada entre as localidades. Já para *P. cuvieri*, as diferenças na massa do trato gastrointestinal foram observadas tanto entre as paisagens quanto entre as localidades, e as diferenças nas massas dos rins ocorreram apenas entre as localidades. Estes padrões podem ser indicativos de que as diferenças ambientais entre paisagens e entre localidades são distintos, porém podemos apenas levantar hipótese sobre as relações de causa e efeito entre as características ambientais e fenotípicas. Entretanto, o fato de estes órgãos serem metabolicamente dispendiosos (Daan *et al.*, 1990; Fuery *et al.*, 1998; Speakman, 2000; Steyermark *et al.*, 2005) nos faz sugerir essas variações nas massas relativas dos órgãos entre indivíduos, mesmo que sutis, possuem implicações sobre o orçamento energéticos destes indivíduos.

Diversos autores têm demonstrado uma correlação positiva entre o comprimento relativo do membro posterior e a potência do salto (Emerson, 1978, 1985; Gomes *et al.*,

2009). Apesar desta relação não ter sido significativa dentro das espécies estudadas, as diferenças encontradas nestas características entre os indivíduos de *P. boiei* e *P. cuvieri* nos possibilita considerar que o conjunto dos dados obtidos, de modo geral, favorece a hipótese de que existe uma relação entre o desempenho locomotor e alterações ambientais causadas pela ação antrópicas. Tal relação, todavia, ainda não é clara para todas as espécies de anfíbios anuros. Por exemplo, quando comparamos os indivíduos de *P. cuvieri* de paisagens fragmentadas e de contínuas não observamos diferenças significativas no desempenho locomotor entre essas populações. Por outro lado, o número de saltos e a potência do salto compõem a função discriminante gerada para diferenciar os indivíduos de RG e SLP. Esses resultados sugerem efeitos do ambiente sobre a morfofisiologia associada à locomoção, mas não necessariamente sobre as variáveis do desempenho locomotor abordado neste estudo. Este tema será discutido na seção seguinte.

5.4. Desempenho locomotor e metabolismo energético

A habilidade para se estabelecer metapopulações em paisagens fragmentadas pode ser um fator essencial na permanência dessas espécies nessas áreas (Zuidema *et al.*, 1996; Silvano *et al.*, 2003; Andersen *et al.*, 2004; Funk *et al.*, 2005). Por isso, o estudo da habilidade de se deslocar e os padrões de deslocamento, juntamente com aspectos ecológicos como o uso do hábitat e a habilidade de interagir com as mudanças no ambiente, possibilitam entender como os efeitos da fragmentação sobre populações de anuros (Pearman, 1997). Dentro desta perspectiva, as diferenças nas características morfofisiológicas associadas ao desempenho locomotor favorecem a hipótese de que variáveis como tempo de exaustão e resistência podem ser determinantes no grau de isolamento dos fragmentos e no fluxo gênico, fatores determinantes de extinções

localizadas (Silvano *et al.*, 2003; Andersen *et al.*, 2004; Funk *et al.*, 2005). Entretanto, os componentes do desempenho locomotor estudados não foram consistentes com esse padrão. Existe a possibilidade de que outras medidas de desempenho locomotor possam ser mais relevantes, mas cabem a esses dados interpretações alternativas.

Proceratophrys boiei, segundo Zina e colaboradores (2007), é capaz de se deslocar por longas distâncias, podendo ser encontrados deslocando em trilhas distantes dos corpos de água inclusive durante o dia. Tal característica, associada a sua relativa tolerância a matrizes de pastagens ou monoculturas, ainda que sejam mais abundantes nas matas (Dixo, 2005; Becker, 2007), pode estar relacionada às diferenças encontradas na resistência, no tempo de exaustão e no número de saltos entre as diferentes populações. Contudo, a maior capacidade locomotora das populações de paisagens contínuas sugere que a relação entre fragmentação e morfofisiologia associada à locomoção é diferente à originalmente proposta. Um fator que pode influenciar nos padrões observados na capacidade locomotora desta espécie é a própria estrutura do habitat.

A paisagem contínua, por exemplo, possibilita que os indivíduos percorram grandes distâncias com um menor risco de dessecação, predação ou elevação excessiva da temperatura corpórea. Se o processo dominante a diferenciação fenotípica for a plasticidade associada ao comportamento (por exemplo, os efeitos análogos ao treinamento a atividades físicas sustentadas por longos períodos), a locomoção em uma paisagem fragmentada poderia ser limitada (Garland *et al.*, 1987; Launai *et al.* 2001; Wilson *et al.*, 2002). Mesmo que esta seja uma das diversas possibilidades possíveis, nossos resultados chamam a atenção sobre os efeitos da modificação do habitat sobre populações de anuros, e evidenciam que diferentes espécies podem ser afetadas de maneira distintas, e inclusive, contrastantes. Dessa maneira, a relação entre

características estruturais do habitat entre as paisagens e o comportamento de deslocamento e a capacidade locomotora de *P. boiei* ainda devem ser analisados em trabalhos futuros.

Assim como as características morfológicas e de desempenho locomotor, alguns aspectos do metabolismo energético também devem ser destacados quando comparamos indivíduos de *P. boiei* provenientes de paisagens fragmentadas e contínuas. Tendo em vista que o $VO_{2\text{ativ}}$ e a atividade da CS foram a variável mais representativa dentro das funções discriminantes de *P. boiei*, e que os valores desta variável para os indivíduos de paisagens fragmentadas foi maior do que para os de paisagens contínuas, é possível que as alterações ambientais associadas à fragmentação do habitat possa alterar o orçamento energético desses indivíduos, principalmente no tocante à capacidade locomotora. Apesar das variáveis metabólicas não contribuírem para a discriminação entre os indivíduos de *P. cuvieri*, o maior $VO_{2\text{ativ}}$ dos indivíduos da paisagem contínua de RG nos leva a cogitar a possibilidade a atuação das alterações ambientais relacionadas a fragmentação sobre o metabolismo energético também está presente nesta espécie, porém de maneira distinta a *P. boiei*.

6. Conclusões

Em suma, nossos dados evidenciam a contrastante diferença de respostas entre espécies especialistas e generalistas frente à fragmentação florestal. Contudo, a variação ambiental associada à área geográfica mostrou-se tão importante quanto a variação associada à paisagem. Esses resultados mostram uma situação mais complexa do originalmente proposto, no que a heterogeneidade da Floresta Atlântica, é mais um fator a ser analisado. Os processos responsáveis pelos padrões observados possivelmente são complexos e multifactoriais. Dessa maneira, cabe ao nosso trabalho ressaltar a

existência de diferenças marcadas entre populações no referente a características morfológicas e fisiológicas, sendo que essas últimas são perceptíveis em diferentes níveis de organização. No caso de *P. cuvieri*, as diferenças entre as populações foram evidentes principalmente nos aspectos morfológicos. Em *P. boiei*, por outro lado as diferenças entre os indivíduos de paisagens contínuas e fragmentadas abrangem tanto características morfológicas quanto metabólicas. De modo geral, nossos dados nos permitem destacar a existência uma relação distinta e complexa entre a fragmentação de habitat e as características morfofisiológicas associadas à locomoção, porém a distinção dos padrões observados dentre as espécies de anuros nos faz ressaltar a necessidade de um maior número de estudos objetivando entender tanto os padrões quanto os processos pelos quais eles ocorrem.

CAPITULO 2

A RELAÇÃO ENTRE CAPACIDADE FISIOLÓGICA ASSOCIADA À LOCOMOÇÃO E A PERSISTÊNCIA DAS POPULAÇÕES DE DIFERENTES ESPÉCIES EM FRAGMENTOS FLORESTAIS

Lye Otani¹, Carlos Arturo Navas Iannini¹, José Eduardo de Carvalho²

¹Departamento de Fisiologia - USP – São Paulo

²Departamento de Ciências Biológicas – UNIFESP – Campus Diadema

São Paulo - SP

Junho de 2011

1. Abstract

Landscape connectivity is an important factor for gene flow maintenance and thus important for populations persistence in fragmented habitats. The present work aims to understand the relationship between physiological and locomotor performance associated with the ability to persist in fragmented habitats in the Atlantic Forest amphibians. In general, *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus mystacinus*, species persistent in fragmented habitats, have larger body size and highest body index, which may favor them in open habitats when compared with *P. olfersii*, *P. spiniger*, *L. notoakitites* and *L. marmoratus*, forest associated species. Moreover, these species are able to display greater movement patterns by performing larger number of jumps during prolonged periods of time. These characteristics may enable a greater movement between fragments or between these fragments and breeding sites with a higher probability of survival, and, consequently, a higher probability to survive in this landscape. However, these characteristics are different between genus and between locations, which highlight the importance of the species' evolutionary history and its close relationship to environmental characteristics. The interactions of these two factors, associated with synergistic action of human activities, makes the effects of habitat fragmentation on population decline of amphibians in the Atlantic Forest extremely complex. Thus, this study emphasizes the importance of integrative studies on comparative physiology, ecology and biology of amphibians, to understand this complex relationship.

Key-words: Locomotor performance, population decline, *Physalaemus*, *Leptodactylus*, Habitat fragmentation.

Resumo

A conectividade da paisagem é um fator importante para a manutenção do fluxo gênico e, assim, importante para a persistência das populações em ambientes fragmentados. O presente trabalho visa contemplar as relações entre a capacidade fisiológica associada ao desempenho locomotor e a capacidade de persistência em habitats fragmentados em anfíbios anuros da Floresta Atlântica. De modo geral, *Physalaemus cuvieri* e *Leptodactylus mystacinus*, espécies persistentes em habitats fragmentados, apresentam maior tamanho corpóreo e maior índice corpóreo, o que pode favorecê-los diante de ambientes abertos quando comparados com *P. spiniger*, *L. notoakitites* e *L. marmoratus*, espécies associadas a florestas. Além disso, essas espécies são capazes de percorrer maiores distâncias executando um maior número de saltos durante períodos de tempo mais prolongados. Tais características possibilitariam uma maior movimentação com maior probabilidade de sobrevivência entre fragmentos ou entre estes fragmentos e os sítios reprodutivos. Entretanto, quando comparamos os dois gêneros, *Leptodactylus* e *Physalaemus* apresentam diferenças nessas características, as quais também diferem entre localidades. Estes padrões ressaltam a importância da história evolutiva das espécies e sua íntima relação com as características ambientais peculiares dos habitats em que elas se inserem. A interação desses dois fatores, ainda associados com a ação sinérgica das atividades antrópicas, tornam os efeitos da fragmentação de habitat sobre o declínio populacional de anfíbios anuros na Floresta Atlântica extremamente complexa. Dessa maneira, o presente trabalho visa principalmente destacar a importância de estudos integrativos, tanto na fisiologia comparativa quanto na ecologia e biologia de anfíbios, para o entendimento desta complexa relação.

Palavras-chave: Capacidade locomotora, Declínio populacional, *Physalaemus*, *Leptodactylus*, Fragmentação de habitat.

2. Introdução

As diversas atividades humanas têm como consequência alterações ambientais drásticas, dentre as quais a perda e a fragmentação de habitats acabam por se destacar (Miller e Cale, 2000; Primack e Rodrigues, 2001; Frankham *et al.*, 2004). Este processo pode levar ao aumento do isolamento das populações, que, associada a outros fatores, acarreta em alterações nas comunidades biológicas (Fahring e Merriam, 1994; Zuidema *et al.*, 1996; Hedrick, 2000; Frankham *et al.*, 2004; Drinnan, 2005). O isolamento populacional acontece quando a capacidade de dispersão dos indivíduos de uma população é incompatível com as condições e distancias médias típicas entre fragmentos. Nestas condições a probabilidade de dispersão dos indivíduos diminui, e tal redução da dispersão pode tornar as populações mais susceptíveis à depressão endogâmica, à redução da diversidade genética e a outros problemas associados ao isolamento e ao pequeno tamanho populacional (Fahrig e Merriam, 1994; Zuidema *et al.*, 1996; Hedrick, 2000; Frankham *et al.*, 2004).

Os principais riscos da redução do tamanho populacional envolvem o aumento do endocruzamento, redução na taxa de nascimentos e aumento da mortalidade dos descendentes endogâmicos, o que acarreta maior probabilidade de extinção da população (Fahrig e Merriam, 1994; Zuidema *et al.*, 1996; Hedrick, 2000; Frankham *et al.*, 2004; Drinnan, 2005). Além disso, a perda da diversidade genética associada à diminuição da população reduz as possibilidades de adaptação local via seleção natural (Frankham *et al.*, 2004; Hedrick, 2000). Dessa maneira, a combinação entre a redução do tamanho da população, a depressão da diversidade genética e o aumento da endogamia é considerada um elemento chave para as extinções populacionais que ocorrem dentro do contexto da fragmentação de habitats (Frankham *et al.*, 2004; Hedrick, 2000). Entretanto, a atuação desses três fatores é influenciada, principalmente,

pelo grau de isolamento entre as populações e a manutenção de metapopulações (Neckel-Oliveira e Gascon, 2006).

De acordo com a teoria de metapopulações, populações locais isoladas espacialmente em fragmentos de habitat, porém unidas funcionalmente por fluxos biológicos, teriam uma dinâmica de extinção e recolonização local (Levins, 1970; Hanski e Gilpin 1991; Hanski 1998). A permanência da metapopulação dependeria de um equilíbrio entre estes dois processos, sendo que o tamanho dos fragmentos determina a probabilidade de extinção de populações locais, e a conectividade determina a probabilidade de recolonização (Levins, 1970). A conectividade da paisagem, por sua vez, abrange dois aspectos: o estrutural e o funcional (Urban e Shugart, 1986; Tischendorf e Fahrig, 2000). A conectividade estrutural diz respeito às características fisionômicas da paisagem, como a densidade e a complexidade de corredores, o distanciamento entre os fragmentos (Metzger e Décamps, 1997), a distribuição geográfica, estruturas de conexão (corredores ou “pontos de ligação”, Haddad e Baum, 1999; Metzger, 1999), e a permeabilidade da matriz (Antongiovanni e Metzger, 2005; Gascon *et al.*, 1999; Stevens *et al.*, 2004) e obstáculos aos fluxos biológicos (por exemplo, estradas e grandes rios) (Noss e Csuti, 1997), que se refere à resistência da matriz aos fluxos biológicos. No caso da conectividade funcional, a habilidade específica de um indivíduo em transitar em ambientes distintos de seu habitat determinará o grau de conectividade da paisagem. Ou seja, a conectividade funcional é o resultado da resposta de cada espécie à estrutura da paisagem (Tischendorf e Fahrig, 2000).

Parece lógico assumir que a conectividade funcional é espécie-específica e depende da capacidade de dispersão de uma população animal em uma paisagem fragmentada (Frankham *et al.*, 2004; Hedrick, 2000; Navas e Otani, 2007). Estes fatores

intrínsecos envolvem, sem ambiguidade, fatores morfofisiológicos associados ao desempenho locomotor, entre outros fatores (Frankham *et al.*, 2004; Hedrick, 2000). Sendo assim, quando nos remetemos os fatores relacionados a características intrínsecas da espécie, especificamente à habilidade de dispersão dos indivíduos, diversas características morfológicas e fisiológicas relacionadas à capacidade locomotora devem ser observadas e analisadas (Navas e Otani, 2007).

A ordem Anura, em especial, seria um dos grupos possivelmente mais afetados pela fragmentação de habitat (Silvano e Segalla, 2005) e, ao mesmo tempo, extremamente diverso em termos de fisiologia associada à locomoção (Taigen *et al.*, 1982; Wells, 2001; 2007; Gomes, 2002). Este grupo em particular parece sofrer com a perda massiva de seus ambientes típicos de ocupação, e, associada à fragmentação de habitat, estas alterações ambientais têm levado ao declínio populacional de anfíbios em todo o mundo (Silvano *et al.*, 2003; Funk *et al.*, 2005; Neckel-Oliveira e Gascon, 2006). A fragmentação florestal também pode influenciar de várias maneiras as características comportamentais de anuros, como proposto por Neckel-Oliveira e Gascon (2006). Estes autores observaram que em ambientes fragmentados os indivíduos da espécie *Phyllomedusa tarsius* apresentaram maior deslocamento em comparação com indivíduos de áreas contínuas preservadas. A premissa discutida nesse trabalho é que o movimento dos indivíduos entre subpopulações pode aumentar o fluxo gênico de acordo com o conceito de metapopulação, reduzindo assim a endogamia. Entretanto, isso acarreta um custo, pois os indivíduos provenientes das paisagens fragmentadas apresentaram menor tamanho corpóreo e um período reprodutivo mais longo (Neckel-Oliveira e Gascon, 2006).

Diante dos fatores apresentados, torna-se evidente que a fisiologia é uma disciplina importante para se compreender uma parte específica da complexa interação

entre o impacto da fragmentação e o declínio das populações de anfíbios. A locomoção, em particular, está estritamente ligada aos diversos fatores ambientais, tanto bióticos como abióticos que compõem o ecossistema no qual o indivíduo está inserido (Bennett, 1974; Bennett e Licht, 1974; Bennett, 1985; Navas, 1996; Gomes *et al.*, 2009; Titon Jr *et al.*, 2010). Em anfíbios anuros, a atividade locomotora é um evento sustentado predominantemente pelas vias energéticas independentes do oxigênio, principalmente nas espécies que se deslocam de forma rápida em um curto intervalo de tempo (Bennett e Licht, 1973; Taigen e Pough, 1985). No entanto, algumas espécies apresentam uma alta capacidade oxidativa relacionada ao hábito locomotor sustentado ligado à busca ativa por presas (Taigen *et al.*, 1982; Taigen e Pough, 1985; Pough e Taigen, 1990, Hutchison e Dupré, 1992; Pough *et al.*, 1992).

Segundo Becker (2007), além da problemática relacionada à fragmentação de habitats, as populações de anuros com desenvolvimento larval aquático são mais susceptíveis ao declínio populacional em paisagens fragmentadas associadas à desconexão de habitat, que se refere à desconexão física entre os diferentes habitats utilizados ao longo da vida. Dessa forma, as diferenças interespecíficas na capacidade locomotora podem representar diferenças na susceptibilidade ao desmatamento, não só pelo isolamento populacional, mas também pelo aumento das distâncias entre os fragmentos florestais e os sítios reprodutivos. Este tipo de considerações pode ser importante para entender por que para certas espécies de anuros a destruição do habitat é extremamente prejudicial, ao passo que para outras resultam em praticamente nenhum efeito ou até mesmo as beneficiam (Carnaval, 2002; Duellman 1999a,b).

Dado o possível papel da fisiologia no estabelecimento dos fatores que possibilitam a manutenção de metapopulações de anuros de ambientes fragmentados, o objetivo principal deste trabalho é testar a hipótese de que **“as espécies de anuros com**

menor sensibilidade aparente à fragmentação de hábitat possuem maior capacidade fisiológica para a locomoção”. Para testar tal hipótese é necessário comparar espécies e populações de paisagens fragmentadas e contínuas. Tendo em vista que essa hipótese abrange uma série de questões, visamos responder seis perguntas específicas, sendo elas: 1) existem diferenças morfológicas relacionadas ao tamanho corpóreo e proporções dos membros e órgãos entre espécies próximas de paisagens fragmentadas e contínuas? 2) espécies de paisagens fragmentadas apresentam maior desempenho locomotor do que espécies de paisagens contínuas? 3) quais são as características morfológicas e fisiológicas relacionadas com o desempenho locomotor que são mais relevantes para a discriminação das espécies que conseguem ou não se manter em paisagens fragmentadas? 4) caso existam diferenças no desempenho locomotor entre as espécies de paisagens fragmentadas e contínuas, estas diferenças também se refletem no metabolismo energético de repouso e pós-exercício? 5) quais as relações entre as diferenças no desempenho locomotor das espécies que ocupam diferentes paisagens com as características bioquímicas dos músculos responsáveis pelo movimento, especificamente sobre as atividades máximas de enzimas da via glicolítica e de vias aeróbias? 6) essas mesmas respostas podem ser observadas em espécies de anuros que não possuem larvas aquáticas?

3. Material e Métodos

3.1. Local de estudo e espécies experimentais

O bioma escolhido para a realização do presente estudo foi a Floresta Atlântica do Estado de São Paulo, um dos *hot-spots* da biodiversidade mais ameaçados (Myers *et al.*, 2000). Dentro deste grande bioma, selecionamos duas localidades específicas (vide Figura 1 do Capítulo 1). A primeira encontra-se entre a Serra da Mantiqueira e a Serra

do Mar, no município de São Luiz do Paraitinga (SLP - 23°13'S, 45°20' W); enquanto a segunda situa-se no Planalto Paulista, no município de Ribeirão Grande (RG - 24°05'S, 48°22' W). Em ambas as localidades podemos encontrar paisagens de floresta contínua (SLP – Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Santa Virgínia; RG – Parque Estadual de Intervales) e de paisagens fragmentadas. Em SLP os fragmentos florestais são cercados por matrizes de pastagens, enquanto em RG estes são rodeados por matrizes de monocultura.

Nestas áreas foram coletados exemplares de oito espécies de anuros, sendo estas: *Physalaemus cuvieri*, *Physalaemus olfersii* e *Physalaemus spiniger* (Leiuperidae); *Leptodactylus mystacinus*, *Leptodactylus marmoratus* e *Leptodactylus notoakitites* (Leptodactylidae). Os indivíduos de *Physalaemus spiniger* e *Leptodactylus notoakitites* são encontrados apenas nas paisagens contínuas de RG. Já a espécie *Leptodactylus marmoratus*, apesar de ser encontrada em ambas as paisagens, apresenta larvas endotróficas, as quais não necessitam de corpos d'água para seu desenvolvimento (Heyer *et al.*, 1990, Haddad e Prado, 2005), o que a torna bastante conveniente para testar a hipótese relacionada ao impacto da desconexão de habitat. Outra questão importante a ser mencionada é o fato de que, apesar de *L. mystacinus* e *P. cuvieri* serem espécies de áreas abertas (Heyer *et al.* 2003; Frost 2004; Dixo, 2005), a primeira não é encontrada nas paisagens contínuas dos locais de estudo como a segunda.

As coletas foram realizadas durante o período reprodutivo das espécies (Novembro a Março de 2007, 2008, 2009, 2010 e 2011). Todas as espécies, com exceção de *L. mystacinus*, foram capturadas através de coleta manual ativa. No caso de *L. mystacinus* utilizamos armadilhas de queda distribuídas no interior e na borda dos fragmentos e nas matrizes adjacentes. Devido a esta peculiaridade metodológica, a amostragem desta espécie apresenta indivíduos machos e fêmeas, ao passo que para as

outras espécies foram amostrados apenas os machos. Assim, os resultados obtidos para este gênero foram analisados e discutidos levando em consideração este viés metodológico.

Após a captura, os animais foram identificados, transportados ao laboratório e mantidos dentro de potes plásticos individuais em uma sala com temperatura de $(20,0 \pm 1,0)^{\circ}\text{C}$. O fotoperíodo foi ajustado para 12h de luz além da iluminação natural do ambiente. Todos os indivíduos foram mantidos nestas condições por, no máximo, dois dias após a coleta, tempo suficiente para a realização de todos os experimentos sem que houvesse possíveis interferências do tempo de cativeiro nas características fisiológicas analisadas (Navas e Gomes, 2001).

3.2. Massa corpórea e morfologia

Inicialmente quantificamos massa corpórea (Mc) de todos os indivíduos coletados no início e término de cada experimento realizado. Posteriormente, medimos o comprimento rostro-cloacal (CRC), do fêmur, da tíbia, do pé, total do membro posterior. Também calculamos o índice corpóreo (IC) através da razão entre o CRC e a Mc. Por fim, após o término de todos os experimentos de medida da taxa de consumo de oxigênio e desempenho locomotor, os animais foram previamente anestesiados em água com gelo e mortos por decapitação seguida de espinhalação. Os órgãos (coração, fígado, rim) e tecidos (músculos do membro posterior, músculos oblíquo externo e interno do tronco) foram retirados íntegros, pesados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado em freezer -80°C . Todos os músculos do membro posterior esquerdo foram retirados e pesados em conjunto, como representativo da massa muscular total do membro.

3.3. Desempenho locomotor e Metabolismo energético

Os experimentos relacionados à quantificação das variáveis do desempenho locomotor (resistência, tempo de exaustão, número de saltos e potência de saltos), à quantificação do consumo de oxigênio durante o repouso (VO_{2rep}) e imediatamente após atividade (VO_{2ativ}), do escopo metabólico foram realizados de acordo com o protocolo descrito no Capítulo 1 desta tese. Desta mesma maneira, as amostras de tecido foram homogeneizadas e diluídas para a determinação das atividades máximas das enzimas lactato desidrogenase (LDH), pertencente à via glicolítica, e da citrato sintase (CS), pertencente ao Ciclo de Krebs, nas amostras de músculos do membro posterior de acordo com as modificações feitas a partir de Bergmeyer (1983), relatadas no Capítulo 1 desta tese.

3.4. Análises estatísticas

Tendo em vista que cada espécie apresenta tamanho corpóreo distinto, ponderamos pelos efeitos da Mc sobre as variáveis diretamente relacionadas a ela (massa dos órgãos e tecidos, VO_2 de repouso e após-atividade) e do CRC sobre as medidas morfométricas através da razão entre as variáveis dependentes e Mc ou CRC. Posteriormente, os dados foram transformados em Log na base 10 para a sua normalização.

Para a comparação geral do perfil morfofisiológico de espécies e populações de paisagens fragmentadas e contínuas utilizamos de uma análise discriminante passo a passo (*stepwise*). Assim, realizamos duas análises discriminantes para cada gênero separadamente e a acurácia dessas funções foi definida pela porcentagem de acertos na classificação das observações originais em seus respectivos grupos de origem. A primeira análise discriminante foi aplicada com o intuito de identificar os conjuntos de

características morfofisiológicas relacionadas ao desempenho locomotor, que são mais informativos na diferenciação entre os indivíduos residentes nas paisagens fragmentadas ou contínuas, de modo que as espécies que ocorrem no mesmo tipo de paisagem foram inseridos no mesmo grupo (Função 1). A segunda análise também teve como intuito identificar as variáveis que diferenciam os indivíduos provenientes de RG e SLP, sem levar em consideração as paisagens fragmentadas e contínuas dentro de cada local de estudo (Função 2). Comparando essas duas funções podemos-se verificar qual delas possui o maior poder de discriminação e se compartilham das mesmas variáveis morfofisiológicas. Se a discriminação da Função 1 for maior que a Função 2, podemos deduzir que a paisagem está mais proximamente relacionada com os aspectos estudados do que a população específica de origem dos animais. Dado o limitado número de indivíduos para determinadas espécies não foi possível realizar este teste em amostras independentes.

Uma vez que a análise discriminante não informa sobre diferenças entre espécies para cada uma das variáveis, mas para o conjunto das mesmas, utilizamos como método complementar ANOVA para a comparação pontual de todas as variáveis entre as três espécies de cada gênero. Tendo em vista três das espécies coletadas não estão presentes em ambas as localidades, essas comparações foram feitas separadamente para SLP e para RG. Além disso, devido às diferenças interpopulacionais em *P. cuvieri* e *P. olfersii*, cada população destas duas espécies foram consideradas separadamente nas análises. Todos os resultados das ANOVAS são apresentadas no Anexo 2. Assim, as variáveis relatadas nos resultados como diferentes, menores ou maiores refletem diferenças estatisticamente significativas resultantes destas análises.

Para verificar a correlação entre as variáveis do desempenho locomotor e destas variáveis com as taxas metabólicas (VO_{2rep} e VO_{2rativ}) utilizamos a correlação de

Pearson. Por fim, testamos a influência das características morfológicas (Mc, CRC, IC, comprimento do fêmur, da tíbia, do pé e do membro posterior, massa dos músculos do membro posterior e do coração) e fisiológicas (atividade da CS e da LDH dos músculos do membro posterior) diretamente relacionadas com o desempenho sobre estas variáveis através de regressões lineares. Tanto as regressões quanto as correlações foram realizadas para cada espécie de cada local de estudo individualmente. Todos os procedimentos foram empregados segundo Zar (1996), com o auxílio do programa SPSS statistics 18.

4. Resultados

As análises discriminantes para o gênero *Physalaemus* utilizaram 75 indivíduos (79.8% dos indivíduos coletados). Tanto a função discriminante 1, utilizada para discriminar os indivíduos da paisagem fragmentada dos indivíduos da paisagem contínua, quanto à função 2, que visa discriminar os indivíduos de acordo com o local de origem, apresentam o poder de discriminação similar (Tabela 1). Entretanto, cada função é composta por um conjunto de variáveis distintas, compartilhando apenas da potência do salto (Tabela 1). Assim, podemos destacar que a discriminação entre paisagens é baseada principalmente em variáveis teoricamente associadas à locomoção, enquanto a discriminação entre local de estudo abrange variáveis morfológicas não associadas diretamente à locomoção. Além disso, a eficiência de discriminação de indivíduos de paisagens contínuas e paisagens fragmentadas são iguais (80%), enquanto que a eficiência da classificação dos indivíduos de RG (72.7%) é menor que dos indivíduos de SLP (82.1%).

Tabela 1 – Autovalor referente à análise discriminante, as variáveis que compõem as funções discriminantes, as variáveis que compõem as funções e seus coeficientes (coef.) e a porcentagem de indivíduos classificados corretamente em seu grupo de origem (validação) obtida para o gênero *Physalaemus*.

<i>Função 1 – discriminação entre paisagens</i>		<i>Função 2 – discriminação entre locais</i>	
Autovalor	0.382	Autovalor	0.470
Variáveis	Coef.	Variáveis	Coef.
Índice Corpóreo	-0.459	Comprimento Rostro-Cloacal	-0.554
Comprimento do Fêmur	0.582	Potência do Salto	-0.511
Potência do Salto	-0.492	Massa dos Músculos do Tronco	-0.547
Massa dos Músculos do Membro Posterior	0.684	Massa dos Rins	0.842
		Atividade da Lactato Desidrogenase	0.914
Validação	72.7%	Validação	80.0%

Função 1 - entre os indivíduos residentes em paisagens fragmentadas ou contínuas independente da espécie ou do local de origem; **Função 2** - entre os indivíduos provenientes de São Luiz do Paraitinga ou Ribeirão Grande, independente da espécie ou paisagem

Assim como para *Physalaemus*, desenvolvemos 2 funções discriminantes para *Leptodactylus* utilizando 83.3% dos indivíduos coletados (N=30) e em ambos os casos a eficiência de discriminação foi de 100%. Apesar de todas elas apresentarem mesma eficiência, o conjunto de variáveis que compõem cada função é parcialmente distinto (Tabela 2). Assim como para *Physalaemus*, a discriminação entre paisagens baseia-se principalmente em variáveis associadas diretamente ao desempenho locomotor, enquanto que a discriminação entre local de estudo engloba variáveis não diretamente associadas ao desempenho locomotor. Além do mais, essas variáveis, em especial a massa dos músculos do tronco e dos rins, são comuns na discriminação dos locais de estudos tanto para *Physalaemus* quanto para *Leptodactylus*.

Tabela 2 – Autovalor referente à análise discriminante, as variáveis que compõem as funções discriminantes, as variáveis que compõem as funções e seus coeficientes (coef.) e a porcentagem de indivíduos classificados corretamente em seu grupo de origem (validação) obtida para o gênero *Leptodactylus*.

<i>Função 2 – discriminação entre paisagens</i>		<i>Função 3 – discriminação entre locais</i>	
Autovalor	16.47	Autovalor	8.667
Variáveis	Coef.	Variáveis	Coef.
Índice Corpóreo	1.057	Comprimento do Membro Posterior	2.417
Comprimento do Pé	0.842	Tempo de Exaustão	2.487
Tempo de Exaustão	-0.657	Massa dos Músculos do Tronco	-0.603
Potência do Salto	0.984	Massa dos Rins	0.589
Validação	100%	Validação	100%

Função 1 - entre os indivíduos residentes em paisagens fragmentadas ou contínuas independente da espécie ou do local de origem; **Função 2** - entre os indivíduos provenientes de São Luiz do Paraitinga ou Ribeirão Grande, independente da espécie ou paisagem

4.1. Massa corpórea e morfologia

Tanto em SLP quanto em RG, as diferenças na Mc e no CRC são facilmente observadas dentro dos gêneros *Physalaemus* e *Leptodactylus* (Figura 1). Dentre as espécies de *Leptodactylus* estudadas, *L. mystacinus* é maior tanto em Mc quanto em CRC, porém seu IC não difere de *L. notoakitites*, em RG, e é maior que de *L. marmoratus*, no caso de SLP (Figura 1). As diferenças no tamanho corpóreo entre as espécies de *Physalaemus* são mais sutis, principalmente entre *P. olfersii* e *P. cuvieri*. Em RG, *P. spiniger* é a menor espécie com relação à Mc e o CRC. De maneira singular, *P. olfersii* possui Mc similar ao de *P. cuvieri* de paisagem fragmentada, mas maior que de *P. cuvieri* de paisagem contínua. O seu CRC é maior que de *P. cuvieri* de ambas as paisagens. Com relação ao IC, em especial, *P. spiniger*, assim como *L. marmoratus*, apresentou menor IC do que a espécie de paisagem fragmentada. Por outro lado, as diferenças no IC entre *P. olfersii* e *P. cuvieri* são distintas para cada local de estudo.

Enquanto *P. olfersii* apresentou IC similar ao de *P. cuvieri* de paisagem fragmentada e maior que de *P. cuvieri* de paisagem contínua em RG, em SLP *P. olfersii* apresentou, juntamente com *P. cuvieri* de paisagem contínua, menor IC que *P. cuvieri* de paisagem fragmentada. (Figura 2).

Figura 1. Diferenças no tamanho corpóreo das espécies e populações estudadas. As barras indicam médias e desvio padrão da massa corpórea (Mc - g), comprimento rostro-cloacal (CRC - cm) e do índice corpóreo (Mc/CRC) de cada população de *Leptodactylus mystacinus*, *L. marmoratus* e *L. notoakitites* provenientes das paisagens contínuas e fragmentadas de São Luiz do Paraitinga e Ribeirão Grande. As análises foram realizadas para cada local de estudo. As letras A e B indicam as diferenças significativas e as cores indicam as variáveis que estão sendo comparadas.

As diferenças nas características morfométricas e na massa dos órgãos são distintas tanto entre locais (SLP e RG) quanto entre os gêneros (*Physalaemus* e *Leptodactylus*). Em RG, *P. spiniger* apresentou menores comprimentos da tíbia e do pé, e, conseqüentemente, menor comprimento e massa dos músculos do membro posterior. Além disso, os indivíduos desta espécie também apresentaram menor massa dos músculos do tronco, mas maior massa dos rins quando comparado com *P. cuvieri* de

paisagem contínua (Figura 2). Neste mesmo local, *P. olfersii*, assim como *P. cuvieri* de paisagem fragmentada, possui maior comprimento da tíbia, porém o comprimento do pé está entre o de *P. cuvieri* de paisagem contínua e o de *P. spiniger*. Dessa forma, o comprimento total do membro posterior desta espécie se iguala ao de *P. cuvieri* de paisagem contínua, e é maior que dos outros dois grupos (Figura 2). Por fim, *P. olfersii* apresentou menor massa dos rins que do que *P. cuvieri* de paisagem contínua, mas similar à de *P. cuvieri* de paisagem fragmentada e de *P. spiniger* (Figura 2).

Figura 2. Diferenças no tamanho corpóreo das espécies e populações estudadas. As barras indicam médias e desvio padrão da massa corpórea (Mc - g), comprimento rostro-cloacal (CRC - cm) e do índice corpóreo (Mc/CRC) de cada população de *Physalaemus cuvieri*, *P. olfersii* e *P. spiniger* provenientes das paisagens contínuas e fragmentadas de São Luiz do Paraitinga e Ribeirão Grande. As análises foram realizadas para cada local de estudo. As letras A e B indicam as diferenças significativas, letras iguais indicam ausência de diferenças significativas e as cores indicam as variáveis que estão sendo comparadas.

Diferente do observado em RG, as espécies de *Physalaemus* em SLP não diferiram em suas características morfométricas, de modo que diferenças significativas foram encontradas apenas na massa dos músculos do membro posterior, do coração, do fígado e dos rins (Figura 3). Onde, *P. olfersii* apresentou menores massas de todos estes órgãos, mas a diferença entre as populações de *P. cuvieri* é significativa apenas pra a massa do coração (Figura 3).

Figura 3. Boxplot do Log da razão do comprimento do pé, da tibia e do membro posterior pelo comprimento rostro-cloaca, e Log da razão da massa dos músculos do membro posterior, dos músculos do tronco e dos rins pela massa corpórea das populações das espécies de *Physalaemus*.

Figura 4. Boxplot do Log da razão do comprimento do fêmur, do pé, da tíbia e do membro posterior pelo comprimento rostro-cloacal, e do Log da razão da massa dos músculos do membro posterior e do coração pela massa corpórea das populações das espécies de *Leptodactylus*.

Entre as espécies de *Leptodactylus* pudemos observar que as espécies das paisagens contínuas apresentaram maiores valores para as variáveis morfométricas onde a diferença estatística foi significativa (Figura 4). Contudo, *L. mystacinus* possui maior massa do coração em ambos os locais de estudo, e menor massa do fígado em RG (Figura 4)

4.2. Metabolismo energético e atividade enzimática

O $VO_2\text{rep}$ diferiu apenas entre as espécies de *Physalaemus* em RG, onde as populações de *P. cuvieri* apresentaram $VO_2\text{rep}$ semelhantes entre si, e maior do que de *P. olfersii*. *P. spiniger* apresentou um $VO_2\text{rep}$ intermediário, menor que de *P. cuvieri* de paisagem fragmentada e maior que de *P. olfersii*, porém semelhante ao de *P. cuvieri* de paisagem contínua.

Tanto o $VO_2\text{ativ}$ quanto o escopo metabólico diferiram entre as de *Physalaemus* e entre as espécies de *Leptodactylus* em SLP. No caso de RG, os indivíduos provenientes da paisagem contínua apresentaram valores similares para o $VO_2\text{ativ}$. Entretanto, *P. cuvieri* da paisagem fragmentada apresentou um maior $VO_2\text{ativ}$ do que *P. spiniger* e *P. olfersii*, seu $VO_2\text{ativ}$ foi similar ao de *P. cuvieri* de paisagem contínua. Apesar das diferenças no $VO_2\text{rep}$ e $VO_2\text{ativ}$ entre estas espécies, nenhuma diferença significava foi observada no escopo metabólico (Figura 5). Já no caso de SLP, *P. olfersii* apresentou menores $VO_2\text{ativ}$ e escopo metabólico do que *P. cuvieri*, não havendo diferenças entre as populações desta última espécie (Figura 5).

Figura 5. Médias e desvios padrão do VO₂ de repouso, VO₂ pós-atividade e escopo metabólico das populações de *Physalaemus* *cuvieri*, *P. spiniger*, *P. olfersii*, *Leptodactylus* *mystacinus* e *L. marmoratus*, coletados em paisagens fragmentadas (Frag.) e contínuas (Cont.) de Ribeirão grande e São Luiz do Paraitinga. Letras diferentes indicam as diferenças estatísticas significativas, letras iguais indicam ausência de diferenças significativas. As letras brancas indicam as comparações do VO₂ de repouso, em vermelho as comparações do VO₂ pós-atividade e em preto as do escopo metabólico.

Figura 6. Média e desvio padrão da atividade máxima da citrato sintase (CS – U/g tecido) e da lactato desidrogenase (LDH – U/g tecido) de cada população de *Physalaemus cuvieri*, *P. olfersii*, *P. spiniger*, *Leptodactylus mystacinus*, *L. marmoratus* e *L. notoakitites* provenientes das paisagens contínuas (Cont.) e fragmentadas (Frag.) de São Luiz do Paraitinga e Ribeirão Grande. As análises foram realizadas para cada local de estudo, e a ausência ou letras iguais indicam inexistência de diferença e letras diferentes a existência de diferença.

No caso de *Leptodactylus*, não foi possível avaliar diferenças no metabolismo energético das espécies provenientes de RG, devido à ausência de dados para *L.*

notoakitites. Todavia, foi possível verificar diferença foi entre *L. mystacinus* e *L. marmoratus* com relação ao VO_2 ativ e ao escopo metabólico. Neste caso, *L. mystacinus* apresentou maior VO_2 ativ e escopo metabólico do que *L. marmoratus* (Figura 5). Desta mesma maneira, observamos também que *L. mystacinus* possui maior atividade das enzimas CS e LDH nos músculos dos membros posteriores do que as espécies de *Leptodactylus* das paisagens contínuas (Figura 6).

No caso de *Physalaemus* de SLP, *P. cuvieri* de paisagem fragmentada apresentou menores atividades de CS e LDH que *P. olfersii* e *P. cuvieri* de paisagem contínua. Diferente do caso anterior, *P. olfersii* apresentou maior atividade de CS e LDH que *P. cuvieri* e *P. spiniger* em RG. Entretanto, estas duas últimas espécies diferiram apenas com relação à atividade de LDH entre *P. cuvieri* de paisagem fragmentada e *P. spiniger* (Figura 6).

4.3. Desempenho locomotor

De modo geral podemos destacar que as diferenças observadas nas características relacionadas ao desempenho locomotor entre as espécies de *Physalaemus* são distintas das observadas em *Leptodactylus* (Anexo 2).

As comparações do desempenho locomotor entre as espécies do gênero *Physalaemus* mostram que, tanto em SLP quanto em RG, *P. olfersii* possui resistência e tempo de exaustão similares aos de *P. cuvieri*, porém desempenharam um menor número de saltos do que *P. cuvieri*. Neste caso em particular, podemos observar que essa diferença só existe entre *P. olfersii* e *P. cuvieri* de paisagem fragmentada em SLP, e entre *P. olfersii* e ambas as populações de *P. cuvieri* em RG (Figura 7). A potência do salto, por outro lado, não diferiu entre as espécies deste gênero em RG, mas em SLP, *P. olfersii* e *P. cuvieri* de paisagem contínua apresentaram potência do salto similar e

maior do que *P. cuvieri* de paisagem fragmentada (Figura 7). *Physalaemus spiniger*, no entanto, apresentou menor resistência e número de saltos do que *P. cuvieri*, mas o tempo de exaustão e a potência do salto foram similares entre estas espécies. Contudo, quando comparado com *P. olfersii*, *P. spiniger* apresentou menor resistência, mas executou similares números de saltos, tempos de exaustão e potências do salto (Figura 7).

As diferenças no desempenho entre as espécies do gênero *Leptodactylus* são similares entre os locais de estudo. Tanto em SLP quanto em RG, a espécie restrita a paisagem fragmentada (*L. mystacinus*) apresentou maior resistência, tempo de exaustão e desempenhou um maior número de saltos do que as espécies de paisagem contínua (SLP: *L. marmoratus*, RG: *L. notoakitites*). Em contrapartida, as espécies das paisagens contínuas apresentaram maior potência do salto do que *L. mystacinus* (Figura 8).

As correlações entre as quatro variáveis do desempenho locomotor foram distintas para cada espécie em cada local de estudo. A resistência, o tempo de exaustão e o número de saltos estão positivamente correlacionados entre si para a maioria das espécies estudadas (Tabela 3 e 4). A potência do salto, por outro lado, está correlacionada positivamente com a resistência apenas para *P. spiniger*, *P. cuvieri* da paisagem contínua de SLP, *L. mystacinus* de RG e *L. notoakitites*, a qual também apresentou correlação positiva entre esta variável e o número de saltos (Tabela 4). Com relação à interação entre o desempenho locomotor e o metabolismo energético, observamos dentro da paisagem contínua, o tempo de exaustão está diretamente correlacionado com o escopo metabólico em *P. spiniger* ($r=0.901$; $P=0.036$) e inversamente com a potência do salto em *P. cuvieri* de RG ($r=-0.663$; $P=0.036$), e para esta mesma população, o $VO_{2\text{ativ}}$ está negativamente correlacionado com a resistência ($r=-0.661$; $P=0.037$). De maneira oposta, dentro da paisagem fragmentada, a potência do

salto está diretamente correlacionada tanto com o VO_2ativ ($r=0.648$; $P=0.031$) quanto com o escopo metabólico ($r=0.610$; $P=0.046$) para *P. cuvieri* de SLP. Além disso, para *L. mystacinus* de RG, o número de saltos e o escopo metabólico também estão correlacionados positivamente ($r=0.589$; $P=0.034$).

Figura 7. Boxplot do Log daa variáveis relacionadas ao desempenho locomotor de cada população de *Physalaemus cuvieri*, *P. olfersii* e *P. spiniger* provenientes das paisagens contínuas e fragmentadas de São Luiz do Paraitinga e Ribeirão Grande.

Figura 8. Boxplot do Log daa variáveis relacionadas ao desempenho locomotor de cada população de *Leptodactylus mystacinus*, *L. marmoratus* e *L. notoakitites* provenientes das paisagens contínuas e fragmentadas de São Luiz do Paraitinga e Ribeirão Grande.

Tabela 3. Coeficiente de correlação de Pearson (R), valor de P (P) e o número amostral (N) referentes às correlações de Pearson entre as variáveis do desempenho locomotor para cada população de *Physalaemus cuvieri*, *P. olfersii* e *P. spiniger* provenientes das paisagens contínuas e fragmentadas de São Luiz do Paraitinga e Ribeirão Grande. As tabelas estão separadas por gênero e por localidade. Em amarelo estão destacadas as correlações significativas.

<i>Physalaemus</i>		Ribeirão Grande			São Luiz do Paraitinga		
		Tempo de Exaustão	Número de Saltos	Potência do Salto	Tempo de Exaustão	Número de Saltos	Potência do Salto
Resistência	<i>P. spiniger</i> Contínua	R = 0.605; P=0.028; N=13	R = 0.432; p = 0.141; N= 13	R = 0.689; p < 0.001; N= 13			
	<i>P. olfersii</i> Contínua.	R = 0.609; P = 0.016; N= 15	R = 0.634; P = 0.011; N= 15	R = 0.349; P = 0.203; N= 15	R = 0.793; P = 0.003; N = 11	R = 0.658; P = 0.028; N = 11	R = 0.30; P = 0.339; N = 10
	<i>P. cuvieri</i> Contínua	R = 0.879; P < 0.001; N= 17	R = 0.941; P < 0.001; N= 17	R = 0.303; P = 0.237; N= 17	R = 0.110; P = 0.697; N = 15	R = 0.268; P = 0.335; N = 15	R = 0.704; P = 0.003; N = 15
	<i>P. cuvieri</i> Fragmentada	R = 0.701; P = 0.035; N= 9	R = 0.913; P < 0.001; N= 9	R = 0.502; P = 0.168; N= 9	R = 0.570; P = 0.067; N = 11	R = 0.738; P = 0.009; N = 11	R = 0.178; P = 0.601; N = 11
Tempo de Exaustão	<i>P. spiniger</i> Contínua		R = 0.239; P = 0.432; N = 13	R = 0.297; P = 0.325; N = 13			
	<i>P. olfersii</i> Contínua.		R = 0.246; P = 0.376; N = 15	R = -0.026; P = 0.926; N = 15		R = 0.926; P < 0.001; N = 11	R = 0.010; P = 0.978; N = 10
	<i>P. cuvieri</i> Contínua		R = 0.935; P < 0.001; N= 17	R = 0.040; P = 0.879; N= 17		R = 0.565; P = 0.028; N = 15	R = -0.175; P = 0.532; N = 10
	<i>P. cuvieri</i> Fragmentada		R = 0.820; P = 0.007; N = 9	R = -0.103; P = 0.793; N = 9		R = 0.906; P < 0.001; N = 11	R = -0.035; P = 0.917; N = 11
Número de Saltos	<i>P. spiniger</i> Contínua			R = 0.183; P = 0.551; N = 13			
	<i>P. olfersii</i> Contínua.			R = 0.243; P = 0.838; N = 17			R = 0.082; P = 0.821; N = 10
	<i>P. cuvieri</i> Contínua			R = 0.011; P = 0.966; N= 17			R = -0.111; P = 0.695; N = 15
	<i>P. cuvieri</i> Fragmentada			R = 0.145; P = 0.71; N= 9			R = -0.098; P = 0.775; N = 11

Tabela 4. Coeficiente de correlação de Pearson (R), valor de probabilidade (P) e o número amostral (N) referentes às correlações de Pearson entre as variáveis do desempenho locomotor para cada população de *Leptodactylus mystacinus*, *L. marmoratus* e *L. notoakitites* provenientes das paisagens contínuas e fragmentadas de São Luiz do Paraitinga e Ribeirão Grande. As tabelas estão separadas por gênero e por localidade. Em amarelo estão destacadas as correlações significativas.

<i>Leptodactylus</i>		Ribeirão Grande			São Luiz do Paraitinga		
		Tempo de Exaustão	Número de Saltos	Potência do Salto	Tempo de Exaustão	Número de Saltos	Potência do Salto
Resistência	<i>L. marmoratus</i> Contínua				R = 0.372; P = 0.365; N = 8	R = 0.820; P = 0.013; N = 8	R = -0.224; P = 0.593; N = 8
	<i>L. notoakitites</i> Contínua	R = -0.555; P = 0.196; N = 7	R = 0.586; P = 0.17; N = 7	R = 0.785; P = 0.036; N = 7			
	<i>L. mystacinus</i> Fragmentada	R = 0.886; P < 0.001; N = 11	R = 0.916; P < 0.001; N = 11	R = 0.414; P = 0.206; N = 11	R = 0.567; P = 0.184; N = 7	R = 0.982; P < 0.001; N = 7	R = -0.372; P = 0.411; N = 8
Tempo de Exaustão	<i>L. marmoratus</i> Contínua					R = 0.354; P = 0.389; N = 8	R = -0.032; P = 0.939; N = 8
	<i>L. notoakitites</i> Contínua		R = -0.165; P = 0.724; N = 7	R = -0.372; P = 0.411; N = 7			
	<i>L. mystacinus</i> Fragmentada		R = 0.978; P < 0.001; N = 11	R = 0.405; P = 0.216; N = 11		R = 0.657; P = 0.109; N = 7	R = -0.135; P = 0.773; N = 7
Número de Saltos	<i>L. marmoratus</i> Contínua						R = -0.261; P = 0.533; N = 8
	<i>L. notoakitites</i> Contínua			R = 0.927; P = 0.002; N = 7			
	<i>L. mystacinus</i> Fragmentada			R = 0.359; P = 0.279; N = 11			R = -0.380; P = 0.401; N = 7

Assim como as diferenças entre as características morfológicas e fisiológicas diferiram entre os gêneros e os locais de estudo, a influência destas variáveis sobre o desempenho locomotor foi distinta para cada espécie de cada local de estudo. As espécies de paisagem contínua apresentaram um menor número de variáveis influenciando significativamente o desempenho locomotor do que as espécies de paisagens contínuas. Dentro desta paisagem, o desempenho locomotor de *P. olfersii*, *P. spiniger* e *L. notoakitites* não está relacionado com nenhuma das variáveis testadas. Para

a população de *P. cuvieri* em RG, a Mc e o IC estão positivamente relacionados com a resistência e o tempo de exaustão, mas apenas a Mc está relacionada com o número de saltos. O contrario de RG, o desempenho locomotor da população de *P. cuvieri* de SLP não se apresentou relacionada com o tamanho corpóreo, mas a massa dos músculos do membro posterior explica 71.9% da potência do salto ($r=0.719$; $P=0.016$), e as atividades da LDH ($r=0.493$; $P=0.023$) e da CS ($r=0.401$; $P=0.049$) estão positivamente relacionadas com o número de saltos.

Apesar das espécies de paisagem fragmentadas apresentaram um maior número de variáveis influenciando significativamente o desempenho locomotor, essas relações só foram observadas para as populações de RG, principalmente dentre os indivíduos de *L. mystacinus*. Neste caso, a Mc, o CRC e o IC estão positivamente relacionados com a resistência (Mc: $r=0.501$; $P=0.015$; CRC: $r=0.516$; $P=0.019$; IC: $r=0.516$; $P=0.019$), o tempo de exaustão (Mc: $r=0.694$; $P=0.001$; CRC: $r=0.776$; $P=0.001$; IC: $r=0.814$; $P=0.0003$) e o número de saltos (Mc: $r=0.681$; $P=0.0005$; CRC: $r=0.465$; $P=0.015$; IC: $r=0.755$; $P=0.0002$). Além disso, o tempo de exaustão ainda está relacionado com o comprimento da tíbia ($r=0.426$; $P=0.041$) e do pé ($r=0.543$; $P=0.015$), com a massa dos músculos do membro posterior ($r=0.630$; $P=0.003$) e com a atividade da CS ($r=0.506$; $P=0.014$) neste tecido, e o número de saltos está positivamente relacionada com o comprimento do pé ($r=0.464$; $P=0.015$), a massa dos músculos do membro posterior ($r=0.392$; $P=0.022$) e a atividade da LDH ($r=0.494$; $P=0.007$). No caso de *P. cuvieri*, o comprimento da tíbia explica 54.2% da variação do tempo de exaustão ($r=0.542$; $P=0.037$), enquanto a atividade da LDH explica 51.0% da potência do salto ($r=0.513$; $P=0.030$).

5. Discussão

5.1. Diferenças interespecíficas e desempenho locomotor

A conectividade funcional abrange as características morfológicas e fisiológicas intrínsecas de cada espécie são importantes na determinação da sua tolerância à fragmentação por influenciar diretamente na habilidade de dispersão dos indivíduos (Frankham *et al.*, 2004; Hedrick, 2000; Navas e Otani, 2007). De acordo com os obtido neste trabalho, podemos sugerir que o desempenho locomotor, principalmente associado à resistência, ao número de saltos e ao tempo de exaustão, é um fator importante na distinção entre populações de paisagens fragmentadas e contínuas das diferentes espécies de anuros dentro do gênero *Leptodactylus*. De fato, as funções discriminantes de *Physalaemus* e *Leptodactylus* elaboradas com o intuito de diferenciar os indivíduos entre as duas paisagens (Função 1) apresentaram variáveis diretamente relacionadas ao desempenho locomotor enquanto a função discriminante entre os locais de estudos também incorpora variáveis associadas a outras funções fisiológicas, como a massa dos músculos do tronco e a massa dos rins. Essas diferenças entre as duas funções nos levam a sugerir que as singularidades nas características ambientais entre paisagens exigem maior diferenciação nas características morfológicas e fisiológicas associada ao desempenho locomotor devido à importância da conectividade na persistência das populações em paisagens contínuas.

Além da sua relação com a conectividade funcional, a locomoção está intimamente associada a relevantes aspectos da ecologia, como a eficiência de forrageio, fuga contra predadores e orçamento energético (Dickinson *et al.*, 2000) e seu desempenho está correlacionado com o uso do habitat e modo de vida (Zug, 1978; Gomes *et al.*, 2009). Essas características na história natural e na morfologia das espécies pode ser um fator importante na determinação das variáveis que compõem as

funções discriminantes de cada gênero abordado neste trabalho. No caso de *Leptodactylus* o tempo de exaustão e a potência do salto são as duas variáveis do desempenho locomotor que contribuem na diferenciação entre espécies de paisagens fragmentadas e contínuas. Dentro deste gênero a relação de compensação entre potência do salto e resistência é clara, de modo que as espécies que apresentam maior potência não são capazes de manter uma atividade locomotora sustentada por muito tempo, reduzindo assim a distância que esses indivíduos são capazes de percorrer.

No caso de *Physalaemus*, entretanto, essa relação não é tão clara e deve levar em consideração outros fatores, como o tempo entre cada salto e a distância média dos saltos. Os indivíduos de *P. spiniger*, por exemplo, apresentaram potência de salto similar ao das outras espécies, mas executaram um menor número de saltos com maior espaço de tempo entre cada salto, o que acarretou numa menor distância total percorrida (resistência). Por outro lado, quando a potência do salto foi similar entre os indivíduos de *P. olfersii* e *P. cuvieri* de paisagem fragmentada, *P. olfersii* apresentou maior resistência, um mesmo tempo de exaustão e um menor número de saltos executados. Quando a potência dos indivíduos de *P. olfersii* foi maior que dos indivíduos *P. cuvieri* de paisagem fragmentada, a resistência e o tempo de exaustão foram similares, mas o número de saltos foi menor. Em ambos os casos, as diferenças e similaridades na potência do salto não parecem determinar a resistência, mas sim a distância média dos saltos. Dessa maneira, é possível que outras variáveis relacionadas ao desempenho locomotor possam aumentar a eficiência da função discriminante deste gênero.

Entretanto, as variáveis do desempenho locomotor não contribuíram sozinhas para a formulação das Funções 1 e 2. Além das variáveis do desempenho locomotor, características como tamanho e formato do corpo, comprimento relativo dos membros e da massa dos órgãos podem influenciar no desempenho locomotor (Rand, 1952;

Emerson, 1978; Zug, 1978; Garland *et al.*, 1987; Gomes *et al.*, 2009) e em outros processos fisiológicos que podem ser importantes para a sobrevivência dos indivíduos em paisagens fragmentadas.

5.2. Massa corpórea e morfologia

Dentre as características morfológicas, o tamanho corpóreo e as proporções dos membros e órgãos podem ser especialmente importantes para a sobrevivência dos indivíduos em habitats fragmentados. Em uma comparação intraespecífica, onde o CRC tende ser semelhante dentro de uma espécie, o IC é frequentemente considerado um indicador da condição nutricional associada à quantidade de reserva energética do indivíduo (Pond, 1978; Palkovacs, 2003; Buckley *et al.*, 2005; Lowe *et al.*, 2006), e esta linha de raciocínio não pode ser abordada em nossa comparação interespecífica por se tratar de espécies de morfologia significativamente diferentes. Assim, em uma comparação interespecífica, indivíduos de maior tamanho corpóreo possuem menor razão superfície-volume e, conseqüentemente, menor perda relativa de água por evaporação (Thorson, 1955; Schmidt-Nielsen, 1984; Wells, 2007). Além disso, espécies adaptadas a ambientes áridos apresentam o formato do corpo mais globular, o que diminui a razão superfície-volume (Wells, 2007). Então, aplicando o mesmo raciocínio em comparações interespecíficas, indivíduos com maior IC apresentam o formato do corpo mais globular, uma vez que o aumento do IC é a consequência do aumento da Mc e/ou diminuição do CRC. Por conseguinte, esses indivíduos apresentam menor razão superfície-volume e menor perda de água evaporativa.

De acordo com os dados obtidos para as espécies de *Leptodactylus* podemos sugerir que tal raciocínio é plausível, uma vez que *L. marmoratus* e *L. notoakitites* apresentaram menores MC e CRC do que *L. mystacinus*. Além disso, *L. marmoratus*

apresenta também menor IC que *L. mystacinus*. Evidenciando que espécies associadas à floresta são mais susceptíveis a dessecação do que espécies de áreas abertas, devido a sua maior relação superfície-volume corpórea. Para as espécies do gênero *Physalaemus* essa relação não é tão clara. Ainda que verdadeira entre *P. spiniger* e *P. cuvieri* em RG e entre *P. olfersii* e *P. cuvieri* em SLP, esta relação foi oposta para *P. olfersii* e *P. cuvieri* em RG. Assim, a influência do tamanho corpóreo na persistência em paisagens fragmentadas parece não estar relacionada apenas a questão do balanço hídrico.

Além do balanço hídrico, o tamanho corpóreo está intimamente relacionado com o desempenho locomotor. Diversos trabalhos têm mostrado uma correlação significativa e negativa entre a potência do salto e o tamanho corpóreo, e essa relação é influenciada não só pela filogenia, mas também pelo modo de vida da espécie (Taylor *et al.*, 1970; Taylor, 1977; Emerson, 1978; Zug, 1978; Bennett, 1989; Gomes *et al.*, 2009). Tendo em vista que as espécies estudadas podem ser classificadas como tendo o mesmo modo de vida (semiaquático, Gomes *et al.*, 2009), e indivíduos maiores apresentarem menor perda de água por evaporação, menor potência do salto e maior resistência, as espécies de maior tamanho corpóreo são privilegiadas em ambientes fragmentados. Além disso, as proporções dos membros e órgãos entre espécies de paisagens fragmentadas e contínuas também podem contribuir com o desempenho locomotor (Rand, 1952; Emerson, 1978; Zug, 1978; Garland *et al.*, 1987; Gomes *et al.*, 2009), e, por consequência, na persistência da população em paisagens fragmentadas.

Animais com maior comprimento do membro posterior apresentam maior desempenho locomotor relacionado à potência do salto (John-Alder e Morin, 1990; Emerson, 1978, 1991; Gomes *et al.*, 2009). Assim como o comprimento do fêmur e do pé e a massa dos músculos do membro posterior também são frequentemente

relacionados com a potência e a velocidade do salto em anfíbios (Choi *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2000; Nauwelaerts *et al.*, 2007). De acordo com os dados obtidos das, o comprimento relativo do membro posterior e de cada parte deste membro destas variáveis sobre o desempenho locomotor só foram observadas para os indivíduos de *L. mystacinus* e *P. cuvieri* provenientes da paisagem fragmentada de RG. De fato, apenas os comprimentos do pé e da tíbia estão relacionados negativamente com o tempo de exaustão e o número de saltos executados. Essas correlações, ainda que restritas as populações de espécies persistentes em paisagens fragmentadas, juntamente com a sua contribuição na função discriminante, pode ser um indicativo a importância da capacidade locomotora na persistência em habitats fragmentados. Porém, é possível que estes padrões estejam associados a outras alterações ambientais, como, por exemplo, a predação e não apenas à manutenção de metapopulações. A potência e a velocidade do salto, que está intimamente relacionada com o comprimento relativo dos pés, são importantes fatores dentro do contexto de fuga contra predador (Bennett e Licht, 1974; Dickinson *et al.*, 2000; Wells, 2007), e tal contexto parece ser relevante para as espécies gênero *Physalaemus*, que fazem ninho de espuma em poças d'água ou entre a vegetação em áreas abertas, o que as tornam mais expostas a predadores.

Assim, como no caso de *Physalaemus*, a função discriminante de *Leptodactylus*, o comprimento do pé e a potência do salto também compõem sua função discriminante, sugerindo uma possível influencia da predação na discriminação entre indivíduos de paisagens contínuas e fragmentadas. Por outro lado, o destaque do tempo de exaustão pode ser um indicativo de que o isolamento populacional pode ser um fator importante na persistência de *L. notoakitites* e *L. marmoratus* em paisagens fragmentadas.

5.3. Metabolismo energético e atividades enzimáticas

Além das características morfométricas do membro posterior, outros aspectos morfológicos e fisiológicos também podem estar relacionados com o desempenho locomotor como, por exemplo, a massa dos músculos do membro posterior e a atividade de enzimas de vias metabólicas energéticas nestes músculos (Zug, 1972; Emerson, 1978, 1985; Wilson *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2003; James *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2009). Todas as espécies restritas às paisagens contínuas apresentaram menores massas dos músculos do membro posterior. Entretanto, esta variável morfológica está relacionada positivamente com a potência do salto apenas em *P. cuvieri* proveniente da paisagem contínua de SLP, e inversamente relacionada com o tempo de exaustão e o número de saltos em *L. mystacinus* de RG. Ademais, as atividades das enzimas CS e LDH foram menores para todas as espécies de paisagens contínuas com exceção de *P. olfersii*.

Embora a atividade locomotora em anfíbios anuros seja predominantemente um evento sustentado pelas vias energéticas independentes do oxigênio, principalmente nas espécies que se deslocam de forma rápida em um curto intervalo de tempo, certas evidências indicam que para outras espécies uma alta capacidade oxidativa está relacionada ao hábito locomotor sustentado por longos períodos ligado à busca ativa por presas (Taigen *et al.*, 1982; Taigen e Pough, 1985; Pough e Taigen, 1990, Hutchison e Dupré, 1992; Pough *et al.*, 1992). Para estas espécies, o comportamento de forrageio ativo está associado, sobretudo, às modificações tanto nos sistemas bioquímicos metabólicos quanto na composição estrutural da musculatura do membro posterior, favorecendo a produção de ATP por vias aeróbias (Putnam e Bennett, 1983; Marsh e Taigen, 1987). Alguns estudos demonstram uma alta atividade da CS em tecidos musculares que desempenham atividades mais intensas, uma vez que esta enzima é um

indicador da capacidade oxidativa (ver revisão em Wells, 2001), e um aumento na atividade da LDH com o aumento do treinamento para atividades que envolvem geração de grande potência por curto período de tempo (ver Hochachka e Somero, 2002). Desta maneira, nossos dados sugerem que as espécies persistentes em paisagens fragmentadas possuem uma maior capacidade oxidativa dos músculos do membro posterior, quando comparadas com espécies restritas a paisagens contínuas. Essas características fisiológicas, mesmo que sua relação com o desempenho locomotor seja restrito às espécies de paisagens fragmentadas, possibilitariam execução de uma atividade mais prolongada, de modo a garantir sua permanência em habitats fragmentados.

Tendo em vista que a manutenção de uma atividade sustentada apresenta uma relação com as capacidades oxidativa e glicolítica dos tecidos, esses tipos específicos de atividade podem levar os animais a operarem próximo do esforço aeróbio e glicolítico máximos e, segundo alguns autores, a capacidade para a transformação de energia nestes casos pode estar intimamente relacionada com a aptidão (Wells, 1977 e 1978; Taigen *et al.*, 1982). Apesar de *P. olfersii* apresentar maior atividade da CS e LDH nos músculos do membro posterior, esta espécie percorreu a mesma distância durante o mesmo tempo e possui metabolismo energético (VO_{2rep} , VO_{2ativ} e escopo metabólico) menor do que de *P. cuvieri*, principalmente em SLP. Tais características podem ser um indicativo de que a persistência desta espécie em paisagens fragmentadas não está relacionada às questões fisiológicas a cerca da capacidade locomotora ou do metabolismo energético, mas pode estar associada a questões comportamentais e/ou ecológicas da espécie não abordadas neste trabalho.

Diversos fatores comportamentais e ecológicos podem ser identificados como responsáveis pela redução da conectividade funcional de anfíbios anuros, e algumas delas podem estar relacionadas não somente com a extinção das populações de *P.*

olfersii nas paisagens fragmentadas estudadas, como também para *P. spiniger*, *L. notoakitites* e *L. marmoratus*. Uma vez que *P. olfersii* apresenta capacidade locomotora similar ao de *P. cuvieri* e seu gasto energético é menor, é possível que esses animais não transitem entre fragmentos devido a questões de motivação, relacionado a questões do comportamento, ou devido a questões de tolerância aos fatores bióticos (e.g. predação) e abióticos (e.g. temperatura, umidade, radiação) encontrados nas matrizes entre fragmentos. Esses fatores também devem atuar sobre as outras espécies estudadas, porém sua relevância, assim como da capacidade locomotora, para a persistência de *P. spiniger*, *L. notoakitites* e *L. marmoratus* ainda devem ser analisadas. De fato, esses fatores parecem ser mais importantes para espécies de desenvolvimento larval aquático, uma vez que, mesmo com menor desempenho locomotor associado à resistência, tempo de exaustão e número de saltos, *L. marmoratus* ainda é encontrado frequentemente em fragmentos florestais (Becker, 2007).

Leptodactylus marmoratus é uma espécie encontrada tanto em área aberta quanto no interior de mata e apresentam de maior atividade crepuscular, mas também são frequentemente observados vocalizando na alvorada podendo se estender durante o dia em períodos de forte neblina. Já as fêmeas desta espécie são encontradas deslocando-se na serapilheira. Tendo em vista que esta espécie não necessita de corpos d'água para a reprodução e, aparentemente, deslocam-se apenas em dias úmidos e no interior dos fragmentos florestais, um alto desempenho locomotor ou ajustes morfológicos para a redução da perda de água parecem ser desnecessários para sua permanência em paisagens fragmentadas. Entretanto, quando pensamos em manutenção de metapopulações e fluxo gênico entre fragmentos, esta espécie pode estar em desvantagem e sofrer as consequências da perda de diversidade genética em longo prazo. Assim, dados relacionados à genética de populações associados a outras questões

fisiológicas, como tolerância térmica e a dessecação e aspectos da endocrinologia, neurofisiologia e imunologia, também devem ser levados em consideração e associados aos dados obtidos neste trabalho, para que possamos obter uma visão integrada de como a fragmentação de habitat afeta as diferentes espécies de anfíbios.

6. Conclusões

Em resumo, podemos concluir que, ainda que existam diferenças entre os gêneros, as espécies persistentes em fragmentos florestais apresentam uma maior capacidade fisiológica associada a diferenças morfológicas, tanto nas proporções do membro posterior quanto na massa dos órgãos e músculos, que as possibilitam desempenhar uma maior movimentação. Como muitos trabalhos têm mostrado que a capacidade de dispersão através da matriz é um dos fatores determinantes na persistência de algumas espécies em áreas fragmentadas (Laurance, 1991; Laurance & Bierregaard, 1997; Gascon *et al.*, 1999), estas características morfofisiológicas que diferem espécies de paisagens contínuas de fragmentadas podem, por sua vez, contribuir para que estas espécies sejam mais bem sucedidas na persistência em habitats fragmentados. Contudo, as diferenças encontradas entre os gêneros e os dados obtidos para *L. marmoratus* ressaltam a complexidade nos efeitos da fragmentação de habitat sobre a diversidade de anfíbios anuros. Assim, estudos que abrangem de maneira integrada a diversidade fisiológica e comportamental associada com o contexto ecológico e de história de vida das diferentes espécies de anuro deve ser cautelosamente explorada para obtermos um melhor entendimento dos mecanismos pelos quais a fragmentação está associada ao declínio populacional de anfíbios anuros. No Brasil, pouco se conhece a respeito das outras causas de declínio dos anfíbios observadas mundialmente e cada pequena contribuição neste sentido são essenciais para o

aprimoramento das políticas de conservação brasileiras, e infelizmente a fisiologia ainda é um campo pouco explorado neste sentido.

DISCUSSÃO GERAL

A fragmentação de habitats é considerada uma das principais causas do declínio global das populações de anfíbios, principalmente na Floresta Atlântica (Silvano e Segalla, 2005). Em uma paisagem fragmentada, a manutenção de metapopulações viáveis é essencial para a permanência das populações das paisagens (Levins, 1970; Hanski e Gilpin 1991; Hanski 1998). Entretanto, a manutenção deste fluxo não depende somente das características físicas das paisagens (Urban e Shugart, 1986; Tischendorf e Fahrig, 2000). A conectividade funcional entre as populações está relacionada com a habilidade específica de um indivíduo em transitar em ambientes distintos de seu habitat, a qual envolve fatores morfofisiológicos associados ao desempenho locomotor (Frankham *et al.*, 2004; Hedrick, 2000; Navas e Otani, 2008). Desta maneira, as comparações inter e intraespecíficas dos nossos dados mostram que as características morfofisiológicas associadas ao desempenho locomotor estão relacionadas às diferenças ambientais causadas pela fragmentação florestal. Entretanto, tal relação depende da localidade geográfica e das espécies que estão sendo avaliadas.

Diferenciação entre populações

De acordo com as análises intraespecíficas, as populações de *P. cuvieri* e *P. boiei* apresentam diferentes padrões morfofisiológicos associados ao desempenho locomotor. Entretanto, estes padrões variam dependendo da espécie em questão. Enquanto os indivíduos de *P. cuvieri* provenientes de paisagens contínuas e fragmentadas são discriminados apenas por variáveis morfológicas, os indivíduos de *P. boiei* são discriminados por características morfológicas e metabólicas. Além disso, quando comparamos os indivíduos de RG e SLP, no caso de *P. cuvieri* essa

discriminação é baseada tanto em características morfométricas quanto do desempenho locomotor. Já no caso de *P. boiei*, mais uma vez são as características metabólicas e morfológicas que guiam essa discriminação.

As análises interespecíficas, realizadas dentro dos gêneros *Physalaemus* e *Leptodactylus*, também ressaltam a importância das variáveis morfofisiológicas diretamente relacionadas ao desempenho locomotor na discriminação dos indivíduos provenientes de paisagens contínuas e fragmentadas. Porém, a discriminação dos indivíduos de RG e SLP é baseada não só em variáveis associadas à locomoção como também a características morfológicas associadas a outras funções fisiológicas, como a massa do músculo do tronco e a massa dos rins.

Dessa maneira, podemos sugerir que tanto diferenças ambientais entre localidades (RG e SLP), quanto entre paisagens (fragmentada e contínua), estão associados a diferenças no fenótipo dentro das espécies e entre as espécies de anfíbios anuros. Além disso, as alterações ambientais acarretadas pela fragmentação afetam de maneira distinta cada espécie, dependendo da sua história de vida (Laurance, 1991; Tocher *et al.*, 1997; Cosson *et al.*, 1999; Dixo, 2005; Steinicke, 2008).

Desempenho locomotor

Além da sua relação com a conectividade funcional, a locomoção está intimamente associada a relevantes aspectos da ecologia, como a eficiência de forrageio, fuga contra predadores e orçamento energético (Dickinson *et al.*, 2000) e seu desempenho está correlacionado com o uso do habitat e modo de vida (Zug, 1978; Gomes *et al.*, 2009). Apesar de alguns componentes do desempenho locomotor contribuir para a discriminação entre os indivíduos de *P. cuvieri*, diferenças estatísticas não foram detectadas dentro desta espécie. Já no caso de *P. boiei*, a maior capacidade

locomotora das populações de paisagens contínuas sugere que a relação entre fragmentação e morfofisiologia associada à locomoção é diferente à originalmente proposta.

Um fator que pode influenciar nos padrões observados na capacidade locomotora desta espécie é a própria estrutura do habitat. Se levarmos em consideração que processo dominante a diferenciação fenotípica for plasticidade associada ao comportamento (por exemplo, os efeitos análogos ao treinamento a atividades físicas sustentadas por longos períodos), a paisagem contínua possibilitaria aos indivíduos percorrer grandes distâncias com um menor risco de dessecação, predação ou elevação excessiva da temperatura corpórea, uma vez que não necessitariam percorrer por ambientes abertos. Ainda que nossos resultados não nos possibilitem determinar os processos pelos quais as diferenças entre as populações de *P. boiei* ocorreram, podemos sugerir que a estrutura da paisagem influencia nas diferenças observadas entre as populações estudadas. Mesmo que esta seja uma das diversas possibilidades possíveis, devemos ressaltar que diferentes espécies podem ser afetadas de maneira distintas, e inclusive, contrastantes. Dessa maneira, a relação entre características estruturais do habitat entre as paisagens e o comportamento de deslocamento e a capacidade locomotora de *P. boiei* ainda devem ser analisados em trabalhos futuros.

Assim como as diferenças intraespecíficas, as diferenças interespecíficas também variam de acordo com o gênero abordado. No caso de *Leptodactylus* observamos uma clara relação de compensação entre potência do salto e resistência, onde as espécies que apresentam maior potência não são capazes de manter uma atividade locomotora sustentada por muito tempo, reduzindo assim a distância que esses indivíduos são capazes de percorrer. Desta maneira, podemos sugerir que o desempenho locomotor, principalmente associado à resistência, ao número de saltos e ao tempo de

exaustão, é um fator importante na permanência das populações das diferentes espécies de anuros dentro do gênero *Leptodactylus* em paisagens fragmentadas.

Por outro lado, dentro do gênero *Physalaemus* essa relação não é tão clara e deve levar em consideração outros fatores, como o tempo entre cada salto e a distância média dos saltos. Neste caso, as diferenças e similaridades na potência do salto não parecem determinar a resistência, mas sim a distância média dos saltos. Dessa maneira, é possível que outras variáveis relacionadas ao desempenho locomotor possam aumentar a eficiência da função discriminante deste gênero. Além das variáveis do desempenho locomotor, características como tamanho e formato do corpo, comprimento relativo dos membros e da massa dos órgãos podem influenciar no desempenho locomotor (Rand, 1952; Emerson, 1978; Zug, 1978; Garland *et al.*, 1987; Gomes *et al.*, 2009) e em outros processos fisiológicos que podem ser importantes para a sobrevivência dos indivíduos em paisagens fragmentadas.

Massa corpórea e morfologia

Em uma comparação intraespecífica, onde o comprimento rostro-cloacal tende ser semelhante dentro de uma espécie, o índice corpóreo (razão entre a massa corpórea e o comprimento rostro-cloacal) é frequentemente considerado um indicador da condição nutricional associada à quantidade de reserva energética do indivíduo (Pond, 1978; Palkovacs, 2003; Buckley *et al.*, 2005; Lowe *et al.*, 2006). Entretanto, esta linha de raciocínio não pode ser abordada em uma comparação interespecífica, por se tratar de espécies de morfologia significativamente diferentes. Dentro da comparação intraespecífica, a *Mc* foi a principal variável na discriminação dos indivíduos de *P. cuvieri* de paisagens contínuas e fragmentadas, e na discriminação dos indivíduos de *P. boiei* de RG e SLP. Contudo, o efeito da fragmentação de habitat sobre a *Mc* de *P.*

cuvieri e *P. boiei* é distinto, pois enquanto os indivíduos de *P. cuvieri* apresentam maiores Mc em paisagens fragmentadas, os indivíduos de *P. boiei* apresentam menores Mc do que os indivíduos de mesma espécie em paisagens contínuas. Estes padrões distintos observados entre as populações de *P. cuvieri* e *P. boiei* podem estar relacionados com diversas características ambientais, como a temperatura do sítio reprodutivo (Neckel-Oliveira e Gascon, 2006), a taxa de perda de água evaporativa (Schmidt-Nielsen, 1984), o índice de predação (Lind e Johansson, 2007), entre outros.

A comparação interespecífica do tamanho corpóreo também evidenciou padrões distintos entre os gêneros *Physalaemus* e *Leptodactylus*. Os padrões de tamanho corpóreo observado dentro do gênero *Leptodactylus* sugerem que as espécies associadas à floresta são mais susceptíveis a dessecação do que espécies de áreas abertas, devido a sua maior relação superfície-volume corpórea (Thorson, 1955; Schmidt-Nielsen, 1984; Wells, 2007). Por outro lado, o padrão mais complexo observado dentro do gênero *Physalaemus* não parece não estar relacionado apenas à questão do balanço hídrico. Além disso, o tamanho corpóreo também está intimamente relacionado com o desempenho locomotor, assim como as outras características morfométricas, como comprimento do membro posterior, do fêmur, da tíbia e do pé (Taylor *et al.*, 1970; Taylor, 1977; Emerson, 1978; Zug, 1978; Bennett, 1989; Gomes *et al.*, 2009).

Anfíbios com maiores membros apresentam maior potência do salto, (Choi *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2000; Nauwelaerts *et al.*, 2000), o que está associado a atividades anaeróbicas (Taigen e Pough, 1985). Ao contrário de *Leptodactylus*, mais uma vez os padrões no comprimento do membro posterior e seus componentes em *Physalaemus* não corroboram com a hipótese de que espécies persistentes em paisagens fragmentadas apresentam características morfológicas que possibilitam uma maior capacidade locomotora. Dentro da comparação intraespecífica, os padrões

morfométricos também são contrários aos propostos. Ainda que, diferenças significativas foram observadas nestas características entre as populações de paisagens contínuas e fragmentadas. Essas diferenças foram distintas para *P. cuvieri* e *P. boiei*. Mais uma vez, nossos resultados enfatizam a importância da história de vida das espécies o entendimento das relações entre a fragmentação de habitat e as características morfofisiológicas das espécies (Laurance, 1991; Tocher *et al.*, 1997; Cosson *et al.*, 1999; Dixo, 2005; Steinicke, 2008).

Metabolismo energético e atividades enzimáticas

Além das características morfométricas do membro posterior, as características metabólicas do músculo apresenta uma forte relação com a capacidade locomotora em anfíbios anuros (Taigen *et al.*, 1982; Taigen e Pough, 1985; Pough e Taigen, 1990, Hutchison e Dupré, 1992; Pough *et al.*, 1992). Tendo em vista que a manutenção de uma atividade sustentada apresenta uma relação com as capacidades oxidativa e glicolítica dos tecidos, esses tipos específicos de atividade podem levar os animais a operarem próximo do esforço aeróbio e glicolítico máximos e, segundo alguns autores, a capacidade para a transformação de energia nestes casos pode estar intimamente relacionada com a aptidão (Wells, 1977 e 1978; Taigen *et al.*, 1982). Dentro desta perspectiva, as análises intraespecíficas mostram que os indivíduos de *P. cuvieri* e *P. boiei* provenientes de paisagens fragmentadas apresentam um maior gasto energético associado à locomoção. Além disso, estes mesmos indivíduos de *P. boiei* apresentaram menor atividade da citrato sintase no músculo do membro posterior. Tais resultados é um indicativo de que as alterações morfológicas e no desempenho locomotor nesta espécie acarretam em alterações no metabolismo energético, o que pode ser um

indicativo de um comprometimento no orçamento energético destes indivíduos em paisagens fragmentadas.

Já as análises interespecíficas para o gênero *Physalaemus* evidenciam que as espécies restritas a paisagens contínuas apresentam menores taxas metabólicas e escopo metabólico do que a espécie de paisagem fragmentada. Além disso, a capacidade oxidativa e glicolítica do músculo do membro posterior da espécie de paisagem fragmentada é intermediária com relação às duas espécies de paisagens contínuas estudadas. Já no caso de *Leptodactylus*, a espécie de paisagem contínua apresentou maiores $VO_{2\text{ativ}}$ e escopo metabólico, além possuírem maior capacidade oxidativa e glicolítica do músculo do membro posterior. Tais resultados sugerem que a relevância a capacidade fisiológica associada à capacidade locomotora não é o único componente da conectividade funcional em paisagens fragmentadas. Devemos levar em consideração que os fatores comportamentais (e.g. motivação para sair do fragmento) e ecológicos (e.g. temperatura, umidade, radiação, predação) podem apresentar grande participação na determinação da persistência das populações em paisagens fragmentadas, porém a relevância de cada um destes fatores depende da espécie em questão.

Dessa maneira, nossos resultados mostram uma grande diversidade de respostas frente à fragmentação de habitat, tanto entre espécies quanto dentro de espécies, e também depende da localidade onde se realizam os estudos. Tendo em vista que este estudo tem como principal objetivo iniciar uma construção teórica sobre os efeitos da fragmentação de habitat sobre as características morfofisiológica em anfíbios anuros, nossos resultados trazem a tona uma série de hipótese a serem testadas dentro deste contexto. Assim, estudos que abrangem de maneira integrada a diversidade fisiológica e comportamental associada com o contexto ecológico e de história de vida das diferentes espécies de anuro deve ser cautelosamente explorada para obtermos um melhor

entendimento dos mecanismos pelos quais a fragmentação está associada ao declínio populacional de anfíbios anuros.

CONCLUSÕES

1) Os indivíduos provenientes de paisagens contínuas e fragmentadas podem ser discriminados através de características morfofisiológicas relacionadas ao desempenho locomotor, entretanto estas características diferem entre as espécies. Enquanto os indivíduos de *Physalaemus cuvieri* são discriminados por meio da massa corpórea, do comprimento do fêmur e do pé, já os indivíduos de *Proceratophrys boiei* por meio do consumo de oxigênio após-atividade ($VO_{2\text{ativ}}$), comprimento do membro posterior e da atividade de citrato sintase.

2) A populações de *P. cuvieri* provenientes de paisagens contínuas e fragmentadas diferem em relação à: massa corpórea, comprimento rostro-cloacal, comprimento do fêmur, comprimento da tíbia, comprimento do pé, massa do músculo do tronco e do trato gastrointestinal.

3) Em *P. boiei*, as diferenças morfológicas entre suas populações de paisagens contínuas e fragmentadas foram encontradas nas seguintes características: massa corpórea, comprimento da tíbia, do pé e do membro posterior e massa do músculo do membro posterior.

4) Os indivíduos provenientes de Ribeirão Grande e São Luiz do Paraitinga também podem ser discriminados através de características morfofisiológicas relacionadas ao desempenho locomotor, mas o conjunto de características difere entre espécies. Para *P. cuvieri*, a discriminação se dá pela ação conjunta do comprimento do membro posterior, número de saltos executados até a exaustão, potência do salto e massa dos rins. Os indivíduos de *P. boiei* são discriminados através da massa corpórea, $VO_{2\text{ativ}}$, do comprimento da cabeça, da massa do coração e da atividade de citrato sintase.

5) Enquanto as populações de *P. cuvieri* não apresentam diferenças nas variáveis do desempenho locomotor, a população da paisagem contínua de *P. boiei* em São Luiz do Paraitinga apresentaram maiores resistência ao exercício, tempo de exaustão, número de saltos executados até a exaustão e maior potência do salto. Porém, em Ribeirão Grande, este padrão é distinto, onde a resistência e o número de saltos não diferem entre as paisagens e o tempo de exaustão e a potência do salto são maiores na população da paisagem fragmentada.

6) Em *P. cuvieri*, a única diferença no metabolismo energético entre as populações foi observada no $VO_{2\text{ativ}}$. Porém, *P. boiei* de paisagens contínuas apresentaram menores consumos de oxigênio durante o repouso ($VO_{2\text{rep}}$), $VO_{2\text{ativ}}$ e maior atividade da citrato sintase no músculo do membro posterior.

7) Os padrões distintos das características morfofisiológicas associadas à locomoção não estão somente relacionadas à manutenção de metapopulações, mas também a complexa interação das diferenças ambientais entre as paisagens fragmentadas e contínuas, além de ser uma resposta espécie-específica.

8) Enquanto as espécies de *Physalaemus* são discriminadas através do índice corpóreo, comprimento do fêmur, potência do salto e massa do músculo do membro posterior, as espécies do gênero *Leptodactylus* são discriminadas através do índice corpóreo, comprimento do pé, tempo de exaustão e potência do salto.

9) As diferenças morfológicas interespecíficas diferiram entre os gêneros *Physalaemus* e *Leptodactylus*. No primeiro caso, os padrões dessas diferenças não são claras, ao passo que, no segundo caso, as espécies restritas às paisagens contínuas apresentaram menores massa corpórea, comprimento rostro-cloacal e índice corpóreo, e maiores comprimento do membro posterior e seus componentes.

10) Dentro do gênero *Leptodactylus*, as espécies de paisagens fragmentadas apresentam maior desempenho locomotor do que espécies de paisagens contínuas. Porém, para o gênero *Physalaemus*, tal padrão só foi observado entre *P. cuvieri* e *P. spiniger*.

11) Apesar das diferenças marcantes na capacidade locomotora entre as espécies do gênero *Leptodactylus*, diferenças metabólicas só foram observadas no VO₂ativ entre *L. mystacinus* e *L. marmoratus*. Entretanto, *L. mystacinus* apresentou maior atividade da citrato sintase e da lactato desidrogenase no músculo do membro posterior do que as outras duas espécies do gênero.

12) *Physalaemus olfersii* e *P. spiniger* apresentaram menor gasto energético, tanto em repouso quanto após atividade, do que *P. cuvieri*. Entretanto, esta espécie apresentou uma capacidade oxidativa e glicolítica do músculo do membro posterior intermediária entre *P. spiniger* e *P. olfersii*.

13) *L. marmoratus* apresenta menor capacidade locomotora do que *L. mystacinus*. Apesar de não necessitar de corpos d'água para reprodução esta espécie pode estar em desvantagem e sofrer as consequências da perda de diversidade genética em longo prazo, dentro do contexto da manutenção de metapopulações e fluxo gênico entre fragmentos.

14) Os dados apresentados corroboram parcialmente com as hipóteses propostas inicialmente. Entretanto, um maior número de dados sobre outras espécies e gêneros é necessário para entendermos melhor a relação entre a capacidade locomotora e a fragmentação de habitat.

RESUMO GERAL

Diversos aspectos metabólicos e comportamentais possuem uma estreita relação com as condições do ambiente, havendo um compromisso entre as condições naturais e a dinâmica de modificações sobre os organismos. Devido ao grande índice de degradação ambiental proveniente da atividade humana nos últimos tempos, populações de anfíbios têm sido particularmente mais afetadas devido a sua alta sensibilidade a alterações ambientais. Em uma paisagem fragmentada, a manutenção de metapopulações viáveis é um importante fator a persistência das populações. Dentro deste contexto, este estudo propõe investigar as relações entre a fragmentação florestal e habilidade das algumas espécies de anuros para se deslocar entre os fragmentos, ou entre estes e corpos d'água. Assim, realizamos comparações, fisiológicas e comportamentais intra e interespecífica de espécies de anuros residentes em paisagens contínuas e fragmentadas em duas localidades da Floresta Atlântica, com base em suas características morfológicas. De acordo com nossos resultados, as diferenças ambientais entre as paisagens estão relacionadas com as diferenças morfofisiológicas entre as espécies.

ABSTRACT

In the last few decades, human activity has changed environmental condition, resulting in amphibian populations decline all around the world. In this study we analyze the relationships between forest fragmentation and the ability of some frog species to move between forest fragments or between fragments and breeding sites. Our study focus relies on anuran locomotor performance and supporting physiology, and the relationship between these traits and resistance to forest fragmentation. We compare morphological, physiological and behavioral traits between populations of anurans species living in different landscapes (continuous or fragmented) of two sites in the Atlantic Forest. According to our data, differences in environmental conditions of landscape are related to morpho-physiological traits. This relationship, however, depends on the site of the Atlantic Forest and also varies between species.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altwegg, R., Reyer, H.U. 2003. Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. **Evolution**, 57: 872-882.
- Andersen, L.W., Fog, K., Damgaard, C. 2004. Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). **Proc. R. Soc. Lond. B**, 271: 1293–1302
- Angilletta, M.J.; Niewiarowski, P.H., Navas, C.A. 2002. The evolution of thermal physiology in ectotherms. **J. Therm. Biol.**, 27: 249-268.
- Antongiovanni, M., Metzger, J.P. 2005. Influence of the matrix habitats on the occurrence of insectivorous bird species in Amazonian forest fragments. **Biological Conservation**, 122: 441-451.
- Becker, C.G., Fonseca, C.R., Haddad, C.F.B, Batista, R.F., Prado, P.I. 2007. Habitat split and the global decline of amphibians. **Nature**, 318: 1775-1777.
- Becker, G. 2007. Desconexão de habitats e o declínio global dos anfíbios. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- Bellis, E.D. 1962. The influence of humidity on Wood frog activity. **Am. Midl. Nat.**, 68: 139-148.
- Bennett, A. E. 1997. Adaptation and the evolution of physiological characters. In: **Handbook of physiology. Section 13: comparative physiology**, W. H. Dantzler (ed.), Vol. I, pp. 3-16. Oxford University Press, New York.
- Bennett, A.F. 1974. Enzymatic correlates of activity metabolism in anuran amphibians. **Am. J. Physiol.**, 226:1149-1151.
- Bennett, A.F. 1985. Measuring Behavioral Energetics. In: **Functional Vertebrate Morphology**, M. Hildebrand, D.M. Bramble, K.F. Liem, and D.B. Wake (Eds), pp. 69-81. Cambridge, MA: Harvard Univ. Press.
- Bennett, A.F. 1987. Interindividual variability: an underutilized resource. In: **New Directions in Ecological Physiology**, M.E Feder, A.F. Bennett, W.W. Burggren, R.B. Huey (Eds.). Cambridge Univ. Press, Cambridge. pp147-166.

- Bennett, A.F. 1989. Integrated studies of locomotor performance. In: **Complex Organismal Functions: Integration and Evolution in Vertebrates**. Eds. D.B. Wake e G. Roth. pp. 191-202. John Wiley & Sons Ltd.
- Bennett, A.F., Licht, P. 1974 Anaerobic metabolism during activity in amphibians. **Comp. Biochem. Physiol. A**, 48: 319-327.
- Bergmeyer, H.U. 1983. **Methods of Enzymatic Analysis**, vol. 2. Enzymes. Verlag Chemic, Weinheim.
- Bertolucci, J.A. 2001. Anfíbios anuros. In: **Intervalos: fundação para a conservação e produção florestal do estado de São Paulo**, C. Leonel (ed.). Editora Secretaria do Meio Ambiente; Fundação Florestal, São Paulo, p.159-168.
- Berven, K.A., 1981. Mate choice in the wood frog, *Rana sylvatica*. **Evolution** 35, 707–722.
- Berven, K.A., 1982. The genetic-basis of altitudinal variation in the wood frog *Rana sylvatica* I: an experimental analysis of life-history traits. **Evolution**, 36: 962-983.
- Bevier, C.R. 1995. Biochemical correlates of calling activity in neotropical frogs. **Physiol. Zool.**, 66: 1118-1142.
- Bierregaard Jr, R.O., Lovejoy, T.E., 1989. Effects of forest fragmentation on Amazonian understory bird communities. **Acta Amazonica**, 19: 215-241.
- Bruscagin, R.T. 2010. **Diversidade de anfíbios anuros e lagartos de serrapilheira em uma paisagem fragmentada de Ribeirão Grande**, São Paulo. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- Buchholz, D.R., Hayes. T.B. 2002. Evolutionary patterns of diversity in spadefoot toad metamorphosis (Anura? Paleobatidae). **Copeia**, 1: 180-189.
- Buckley, C.R., Michael, S.F., Irschick, D.J. 2005. Early hatching decreases jumping performance in a direct-developing frog, *Eleutherodactylus coqui*. **Func. Ecol.**, 19: 67-72.
- Buhler, D.R., Stokes, R.M., Caldwell, R.S. 1977. Tissue accumulation and enzymatic effects of hexavalent chromium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Fish. Res. Board Can.**, 34 9-18.

- Calow, P. 1991. Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. **Comp. Biochem. Physiol.**, 100 (1/2): 3-6.
- Cardoso, A.J.; Andrade, G.V., Haddad, C.F.B. 1989. Distribuição espacial em comunidades de anfíbios (Anura) no sudeste do Brasil. **Rev. Bras. Biol.**, 49 (1): 241-249.
- Carey, C. 2005. How physiology methods and concepts can be useful in conservation biology. **Integr. Comp. Biol.**, 45: 4-11.
- Carnaval, A.C.O.Q. 2002. Phylogeography of four frog species in forest fragments of northeastern Brazil – a preliminary study. **Integr. Comp. Biol.**, 42:913-921.
- Carvalho, J.E.; Gomes, F.R., Bevier, C.R., Navas, C.A. 2002. Correlations between energy metabolism, thermal environment, and activity in anuran amphibians from genus *Scinax* (Amphibia/Hylidae) **The Physiologist**, 45(4): 352.
- Choi, I., Shim, J.H. & Ricklefs, R.E. 2003. Morphometric relationships of take-off speed in anuran amphibians. **J. Exp. Zool.**, 299A: 99–102.
- Choi, I., Shim, J.H., Lee, Y.S., Ricklefs, R.E. 2000. Scaling of jumping performance in anuran amphibians. **J. Herp.**, 34:222–227.
- Cosson, J.F., Ringuet, S., Claessens, O., Massary, J.C., Dalecky, A., Villiers, J.F., Granjon, L., Pons, J.M., 1999. Ecological changes in recent land-bridge island in French Guiana, with emphasis on vertebrate communities. **Biol. Cons.**, 91: 213-222.
- Daan, S., Masman, D. & Groenewold, A. 1990. Avian basal metabolic rates: their association with body composition and energy expenditure in nature. **Am. J. Physiol.**, 259: 333-340.
- Dejours, P. 1981. **Principles of Comparative Respiratory Physiology**. 2^oed. Elsevier North. Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Diamond, J. and Hammond, K. 1992. The matches, achieved by natural selection, between biological capacities and their natural loads. **Experientia**, 48: 551-557.
- Diaz, M., Santos, T., Telleria, J.L. 1999. Effects of Forest fragmentation on the winter body condition and population parameters of habitat generalist, the Wood mouse *Apodemus sylvaticus*? A test of hypotheses. **Acta Oecol.**, 20: 39-49.

- Dickinson, M.H., Farley, C.T., Full, R.J., Hoehl, M.A.R., Kram, R., Lehman, S. 2000. How animals move: an integrative view. **Science**, 288, Abril., 100-106.
- Dixo, M.B.O. 2005. **Diversidade de sapos e lagartos de serrapilheira numa paisagem fragmentada do Planalto Atlântico de São Paulo**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, USP – SP. 180p.
- Drinnan, I.N. 2005. The search for the fragmentation thresholds in southern Sydney suburb. **Biol. Cons.**, 124: 339-349.
- Duellman, W.E. 1999a. Global distribution of amphibians: patterns, conservation, and future challenges. In: **Patterns of Distribution of Amphibians: a Global Perspective**. Duellman W.E. (ed.), pp. 1-30. The John Hopkins University Press.
- Duellman, W.E. 1999b. Distribution patterns of amphibians in South America. In: **Patterns of Distribution of Amphibians: a Global Perspective**. Duellman W.E. (ed.), pp. 255-328. The John Hopkins University Press, Baltimore.
- Duellman, W.E., Trueb, L., 1994. **Biology of Amphibians**. The Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore.
- Else, P.L., Bennett, A.F. 1987. The thermal dependence of locomotor performance and muscle contractile function in the salamander *Ambystoma tigrinum nebulosum*. **J. Exp. Biol.**, 128: 219–233.
- Emerson, S.B. 1978. Allometry and jumping in frogs: helping the twain to meet. **Evolution** 32: 551–564.
- Emerson, S.B. 1985. Jumping and leaping. In: **Functional Vertebrate Morphology** (M.E. Hildebrand, D. Bramble, K. Laim & D. Wake, eds), pp. 58–76. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Emerson, S.B. 1991. A biomechanical perspective on the use of forelimb length as a measure of sexual selection in frogs. **J. Evol. Biol.** 4:671–78.
- Ewers, R.M.; Didham, R.K. 2006. Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. **Biol. Rev.**, v. 81, n. 1, p. 117-142.
- Fahrig, L., Merriam, G. 1994. Conservation of fragmented populations. **Cons. Biol.**, 8: 50–59.

- Feder, M. E. 1992. **A perspective on environmental physiology of the Amphibians. In Environmental Physiology of the Amphibians** (ed. M. E. Feder and W. W. Burggren), pp. 1-16. Chicago, IL: The University of Chicago Press.
- Feder, M.E. 1987. The analysis of physiological diversity: the prospects for pattern documentation and general questions in ecological physiology. In: **New Directions in Ecological Physiology**, Feder, M.E.; Bennett, A.F.; Burggren, W.W. and Huey, R.B. (eds.) Cambridge Univ. Press, Cambridge. pgs: 38-70.
- Frankham, r., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. 2004. Genetic consequences of small populaion size. In: **A primer of conservation genetics**. Ed. Cambridge University press. Cambridge – UK. Pp 52 a 74.
- Frost, D. R. 2004. **Amphibian Species of the World: an Online Reference**. Version 3.0. New York, American Museum of Natural History. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>>.
- Fuery, c., Withers, P. C. and Guppy, M. 1998. Protein synthesis in the liver of *Bufo marinus*: cost and contribution to oxygen consumption. **Comp.Biochem.Physiol.A** 119, 459-467.
- Funk, W.C., Greene, A.F., Corn, P.S, Allendorf, F.W. 2005. High dispersal in a frog species suggests that it is vulnerable to habitat fragmentation. **Biol. Lett.**, 1: 13–16.
- Galindo-Leal, C., Câmara, I.G. 2005. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. In: **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. C. Galindo-Leal, I.G. Câmara (Eds.). Fundação SOS Mata Atlântica, Centro de Ciências Aplicadas à Biodiversidade, Belo Horizonte. Pp. 3-23.
- Gardner, T. 2001. Decline amphibian population: a global phenomenon in conservation biology. **Anim. Biodiv. Cons.**, 24, 2: 25-44.
- Garland, T.Jr., Else, P.L., Hulbert, A.J., Tap, P. 1987. Effects of endurance training and captivity on activity metabolism of lizards. **Am. J. Physiol.**, Mar;252(3 Pt 2):R450-456.
- Gascon, C., T. E. Lovejoy, R. O. Bierregaard, J. R. Malcolm, P. C. Stouffer, H. L. Vasconcelos, W. F. Laurance, B. Zimmerman, M. Tocher, and S. Borges. 1999. Matrix habitat and species richness in tropical forest remnants. **Biol. Cons.**, 91:223–229.

- Giasson, L.O.M. 2008. **Atividade sazonal e uso do ambiente por anfíbios da Mata Atlântica no alto da Serra do Mar**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Paulista, Rio Claro.
- Gibbons, M.M., McCarthy, T.K., 1986. The reproductive output of frogs *Rana temporaria* (L.) with particular reference to body size and age. **J. Zool. Lond.** 209, 579–593.
- Gleeson, T.T. 1991. Patterns of metabolic recovery from exercise in amphibians and reptiles. **J. Exp. Biol.**, 160: 187–207
- Gleeson, T.T. and Hancock, T.V. 2002. Metabolic implications of a “run now, pay later” strategy in lizards: an analysis of post-exercise oxygen consumption. **Comp. Biochem. Physiol.**, 133A: 259-267.
- Gomes, F.R. 2002. **Estudo Comparativo das Inter-relações Entre Comportamento, Ecologia Térmica e Fisiologia Metabólica no Gênero *Scinax* (Anura : Hylidae)**. Tese de doutorado. Instituto de Biociências da USP, São Paulo.
- Gomes, F.R., Rezende, E.L., Grizante, M.R. e Navas, C.A. 2009. The evolution of jumping performance in anurans: morphological correlates and ecological implications. **J. Evol. Biol.**, 22: 1088-1097.
- Gonzalez-Voyer, A., Padial, J.M., Castroviejo-Fisher, S., De La Riva, I., Vilà, C. 2011. Correlates of species richness in the largest Neotropical amphibian radiation. **J. Evol. Biol.**, 24: 931-942.
- Haddad, C.F., Sazima, I. 1992. Anfíbios Anuros da Serra do Japi. In: **História Natural da Serra do Japi**. Morellato, L.P.C. (org.). Ed. Unicamp.
- Haddad, C.F.B. 1998. Biodiversidade dos anfíbios do Estado de São Paulo. In: **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**. Castro, R.M.C. (Ed.). São Paulo: Editora FAPESP. v.6, p.17-26.
- Haddad, C.F.B. e Prado, C.P.A. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScienc.**, 55(3):207-217.
- Haddad, N.M., Baum, K.A., 1999. An experimental test of corridors on butterfly densities. **Ecological Applications**, 9: 623-633.

- Hammond, K. A., Szewczak, J., Krol, E. 2001. Effects of altitude and temperature on organ phenotypic plasticity along an altitudinal gradient. **J. Exp. Biol.**, 204:1991-2000.
- Hanski, I., 1998. Metapopulation dynamics. **Nature**, 396, 41-49.
- Hanski, I., Gilpin, M., 1997. **Metapopulation Biology: Ecology, Genetics, and Evolution**. Academic Press. San Diego. 512p.
- Hedrick, P. W. 2000 **Genetics of Populations** (Second Edition). Jones and Bartlett, Boston, MA, 553p.
- Henle, K., Davies, K.F., Kleyer, M., Margules, C., Settele, J. 2004. Prediction of species sensitivity to fragmentations. **Biodiv. Conserv.** 13: 207-251.
- Hensley, F.R. 1993. Ontogenic loss of phenotypic plasticity of age at metamorphosis in tadpoles. **Ecology**, 74: 2405-2412.
- Hentschel, B.T. 1999. Complex life cycles in avariable environment: predicting when the timing metamorphosis shift from resource dependent ot developmentally fixed. **Am. Nat.**, 154: 549-558.
- Heyer, M. M., Heyer, W. R. Spear, S.and O. de Sá, R.. 2003. *Leptodactylus mystacinus*. **Catalogue of American Amphibians and Reptiles**, 767:1-11.
- Heyer, W.R., Rand, A.S., Cruz, C.A.G., Peixoto, O.L. & Nelson C.E. 1990. Frogs of Boracéia. **Arq. Zool.**, 31(4):231-410.
- Hillman, S., Withers, P., Drewes, R. e Hillyard, S. 2009. **Ecological and Environmental Physiology of Amphibians**. Oxford University Press Inc., New York.
- Hochachka, P.W., Somero, G.N. 2002. **Biochemical Adaptations**. Princeton University Press, New Jersey.
- Horowitz, M. 2001. Heat acclimation: phenotypic plasticity and cues to the underlying molecular mechanisms. **J. Thermal Biol.**, 26:357-363.
- Huey, R.B., Stevenson, R.D. 1979. Integration thermal physiology and ecology of ectotherms: discussion of approaches. **Am. Zool.**, 19: 357-366.
- Hunt, J.A., Farrar, E.S., 2002. Phenotypic plasticity of the digestive system of tadpoles in response to diet. **Integr. Comp. Biol.**, 42: 1247.

- Hutchison, V.H., Dupré, K.R. 1992. Thermoregulation. In: **Enviromental Physiology of the Amphibians**. M.E. Ferder, W.M. Burggren (Eds.) The Univ. Chicago Press. Chicago. Pp. 206-249.
- Jakob, E.M., Marshall, S.D., Uetz, G.W. 1996. Estimating fitness? A comparison of body condition indices. **Oikos**, 77: 61-67.
- James, R.S., Wilson, R.S., Carvalho, J.E., Kohlsdorf, T., Gomes, F.R. & Navas, C.A. 2006. Interindividual differences in leg muscle mass and pyruvate kinase activity correlate with interindividual differences in jumping performance in *Hyla multilineata*. **Physiol. Biochem. Zool.** 78: 857–867.
- John-Alder, H.B., Morin, P.J., 1990. Effects of larval density on jumping ability and stamina in newly metamorphosed *Bufo woodhousei fowleri*. **Copeia**, 1990:856–860.
- Kapos, V. 1989, Effects of isolation on the water status of forest patches in the Brazilian Amazon. **J. Trop. Ecol.**, 5: 173-185
- Knowles, T.W., Weigl, P. 1990. Thermal dependence of anuran burst locomotor performance. **Copeia**, 3: 796-802.
- Koeman, J.H. 1991. From comparative physiology to toxicological risk assessment. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, 100 (1/2): 7-10.
- Launay, T., Cabelguen, J.M., Marini, J.F., Chanoine, C. 2001. Effects of locomotor training on hindlimb regeneration in the urodele amphibian *Pleurodeles waltlii*. **J. Physiol.**, 535: 241-248.
- Laurance, W. F., Yensen, E. 1991. Predicting the impacts of edge effects in fragmented habitats. **Biol. Cons.**, 55(1): 77-92.
- Laurance, W.F., 1991. Ecological correlates of extinction proneness in Australian tropical rain forest mammals. **Conserv. Biol.** 5, 79-89.
- Laurance, W.F., Bierregaard Jr., R.O., 1997. **Tropical Forest Remnants: ecology, management, and conservation of fragmented communities**. Univ. Chicago Press. Chicago.
- Leitão-Filho, H.F. 1987. Considerações sobre a florística de florestas tropicais e subtropicais do Brasil. **IPEF**, n. 35, p. 41-46.

- Levins, R. 1970. Extinction. In: **Some mathematical questions in biology. Lectures on mathematical in life sciences**, Gerstenhaber, M. (Ed.). American Mathematical Society. Providence, Rhode Island, pp. 77-107.
- Lind, M.I., Johansson, F., 2007. The degree of adaptive phenotypic plasticity is correlated with the spatial environmental heterogeneity experienced by island populations of *Rana temporaria*. **J. Evol. Biol.**, 20: 1288-1297.
- Longphre, M., Gatten, R.E. Jr. 1994. Individual variability in sustained performance, aerobic metabolism, oxygen transport, and enzyme activity in toads (*Bufo marinus*). **Copeia**, 4: 887-896.
- Lovejoy, T.E., Bierregaard, R.O., Rylands, A.B., Malcolm, J.R., Quintela, C.E., Harper, K.S., Brown Jr., K.S., Powell, A.H., Powell, G.V.N., Schubart, H.O.R., Hays, M.B. 1986. Edge and other effects of isolation on Amazon forest fragments. In: **Conservation Biology: the science of scarcity and diversity**, Soule, M.E. (ed.), Sinauer Associates, Inc., pp. 257-285.
- Lowe, W.H., Likens, G.E., Cosentino, B.J. 2006. Self-organisation in streams: the relationship between movement behavior and body condition in a headwater salamander. **Fresh. Biol.**, 51: 2052-1062.
- Mangum, C.P., Hochachka, P.W. 1998. New directions in comparative physiology and biochemistry: mechanism, adaptation, and evolution. **Physiol. Zool.**, 71: 471-484.
- Marsh, R.L., Taigen, T.L. 1987. Properties enhancing aerobic capacity of calling muscle in gray tree frogs *Hyla versicolor*. **Am. J. Physiol.**, 252: R 786-793.
- Mazerolle, M.J. 2001. Amphibian activity, movement patterns, and body size in fragmented peat bogs. **J. Herpetol.**, 35: 13-20.
- Metzger, J.P. 1999. Estrutura da paisagem e fragmentação: análise bibliográfica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 71(3-I): 445-463.
- Metzger, J.P., Décamps, H. 1997. The structural connectivity threshold: an hypothesis in conservation biology at the landscape scale. **Acta Oecol.-Inter. J. of Ecol.**, 18: 1-12.
- Miller, J.R., Cale, P. 2000. Behavioural mechanisms and habitat use by birds in a fragmented agricultural landscape. **Ecol. Appl.**, 10 (6), 1732–1748.

- Miller, K., Monteforte, P.B., Landis, L.F. 1993. Scaling of locomotor performance and enzyme activity in the leopard frog, *Rana pipiens*. **Herpetologica**, 49: 383-399.
- Morey, S., Reznick, D. 2000. A comparative analysis of plasticity in larval development in three species of spadefoot toads. **Ecology**, 82: 510-522.
- Morey, S., Reznick, D. 2001. The relationship between habitat permanence and larval development in California spadefoot toads: field and laboratory comparisons of developmental plasticity. **Oikos**, 104: 172-190.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B., Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 403: 853-858.
- Nauwelaerts, S., Ramsay, J., Aerts, P., 2007. Morphological correlates of aquatic and terrestrial locomotion in a semi-aquatic frog, *Rana esculenta*: no evidence for a design conflict. **J. Anat.**, 210: 304-317.
- Navas, C.A. 1995. **Ecological Implications of Physiology and Behaviour in High Elevation Neotropical Anurans**. Ph D thesis. University of Connecticut, Storrs.
- Navas, C.A. 1996. Metabolic physiology, locomotor performance and thermal niche breadth in neotropical anurans. **Physiol. Zool.**, 69: 1481-1501.
- Navas, C.A. e Otani, L. 2007. Physiology, environmental change, and anuran Conservation. **Phyllomedusa** 6: 83-103.
- Navas, C.A., GOMES, F.R. Time in captivity as a confounding variable in herpetological research: an example from the metabolic physiology of Tree frogs (*Scinax*). **Herpetol. Rev.**, v. 32, p. 228-230, 2001.
- Navas, C.A., James, R.S., Wakeling, J.M., Kemp, K.M., Johnston, I.A. 1999. An integrative study of the temperature dependence of whole animal and muscle performance during jumping and swimming in the frog *Rana temporaria*. **J. Comp. Physiol**, 169: 588-596.
- Naya, D.E., Farfán, G., Sabat, P., Méndez, M.A. e Bozinovic, F. 2005. Digestive morphology and enzyme activity in the Andean toad *Bufo spinulosus*: hard-wired or flexible physiology? **Comp. biochem. physiol.,A**, 140: 165– 170

- Naya, D.E., Veloso, C., Sabat, P., Bozinovic, F. 2009. The effect of short- and long-term fasting on digestive and metabolic flexibility in the andean toad, *Bufo spinulosus*. **J. Exp. Biol.**, 212: 2167-2175.
- Neckel-Oliveira, S., Gascon, C. 2006. Abundance, body size and movement patterns of a tropical treefrog in continuous and fragmented Forest in brazilian Amazon. **Cons. Biol.**, 128: 308-315.
- Niehaus, A.C., Wilson, R.S., Franklin, C.E. 2006. Short- and long-term consequences of thermal variation in the larval environment of anurans. **J. Animal Ecol.**, 75: 686-692.
- Noss, R.F., Csuti, B., 1997. Habitat Fragmentation. In: **Principles of Conservation Biology**. Meffe, K.G., Carroll, C.R. (Eds.). Segunda edição. Sinauer Press, Sunderland, pp. 269-304.
- Oliveira, F.B. 2002. **Comportamento vocal de *Scinax* gr. *Perpusillusi* (Anura, Hylidae): correlações fisiológicas e ecológicas da variação intraespecífica**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociência, Depto. Fisiologia, 124p.
- Palkovacs, E.P. 2003. Explaining adaptative shifts in body size on islands: a life history approach. **Oikos** 103:37-44.
- Palmer, M., Bernhardt, E., Chornesky, E., Collins, S., Dobson, A., Duke, C., Gold, B., Jacobson, R., Kingsland, S., Kranz, R., Mappin, M., Matrinez, M.L., Micheli, F., Morse, J., Pace, M., Pacual, M., Palumbi, S., Riechman, O.J., Simons, A., Townsend, A., Turner, M. 2004. Ecology for a crowded planet. **Science**, 304: 1251-1252.
- Pearman, P.B. 1997. Correlates of amphibian diversity in an altered landscape of Amazonian Ecuador. **Cons. Biol.**, 11: 1211–1225.
- Pinto, L.P., Brito, M.C.W. 2005. Dinâmica da perda da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira: uma introdução. In: **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. C. Galindo-Leal and I.G. Câmara (Eds.). Fundação SOS Mata Atlântica, Centro de Ciências Aplicadas à Biodiversidade, Belo Horizonte. Pp. 27-30.

- Pond, C.M. Morphological aspects and ecological and mechanical consequences of fat deposition in wild vertebrates. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, 9: 519-570. 1978.
- Porter, W.P., Budaraju, S., Stewart, W.E., Ramankutty, N. 2000. Calculating climate effects o birds and mammals: impacts on biodiversity, conservation, population parameters, and global community structure. **Amer. Zool.**, 40: 597-630.
- Pough, F.H. 1989. Organismal performance and Darwinian fitness: approaches and interpretations. **Physiol. Zool.**, 62: 199-236.
- Pough, F.H., Magnusson, W.E., Ryan, M.J. Wells, K.D., Taigen, T.L. 1992. Behavioral energetics. In: **Enviromental Physiology of the Amphibians**. M.E. Ferder, W.M. Burggren (Eds.). The Univ. Chicago Press. Chicago. pg: 395-436.
- Pough, F.H., Taigen, T.L. 1990. Metabolic correlates of the foraging and social behaviour of dart-poison frogs. **Anim. Behav.**, 39: 145-155.
- Primack, R.B., Rodrigues, E. 2001. **Biologia da Conservação**. Londrina, PR.
- Putnam, R.W., Bennett, A.F. 1983. Histochemical, enzymatic and contractile properties of skeletal muscle of three anuran amphibians. **Am. J. Physiol.**, 244:R558-567.
- Putnam, R.W., Bennett, A.F. 1983. Histochemical, enzymatic and contractile properties of skeletal muscle of three anuran amphibians. **Am. J. Physiol.**, 244:R558-567.
- Rand, A.S. 1952. Jumping ability of certain anurans, with notes on endurance. **Copeia** 1952: 15–20.
- Relyea, A.R. 2004. Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. **Environ. Toxicol. Chem.**, 23: 1737-1742.
- Ribeiro, W.C. 2002. Mudanças climáticas, realismo e multilateralismo. **Terra Livre São Paulo**, 18: 75-84.
- Rocha, C. F. D., H. G. Bergallo, J. P. Pombal Jr., L. Geise, M. Van Sluys, R. Fernandes, and U. Caramaschi. 2004. **Fauna de anfíbios, répteis e mamíferos do Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil**. Publicações Avulsas do Museu Nacional, Rio de Janeiro 104: 1-24
- Rolfe, D.F.S., Brown, G.C. 1997. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. **Physiol. Rev.**, 77: 731-758.

- Rome, L.C., Stevens, E.D., John-Alder, H.B. 1992. The influence of temperature and thermal acclimation on physiological function. In: M.E. Ferder, W.M. Burggren (eds.). **Enviromental Physiology of the Amphibians**. The Univ. Chicago Press. Chicago. Pp. 183-205.
- Rowe, C.L., Hopkins W.A., Congdon, J.D. 2001. Integrating individual-based indices of contaminant effects. How multiple sublethal effects may ultimately reduce amphibian recruitment from a contaminated breeding site. **Sci. World J.**, 29:703-712.
- Ruse, M. 1973. **The phylosophy of biology**. Hutchinson & Co., New York.
- Sabat., P., Riveros, J.M. e López-Pinto, C. 2005. Phenotypic flexibility in the intestinal enzymes of the African clawed frog *Xenopus laevis*. **Comp. biochem. physiol.,A**, 140: 135–139.
- Saunders, D.A., Hobbs, R.J., Margules, C.R. 1991. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. **Cons. Biol.**, 5: 18-32.
- Schmidt-Nielsen, K. 1984. **Scaling, why is animal size so important?** Cambridge University Press, Cambridge, New York, 241p.
- Silvano, D.L., Segalla, M.V. 2005. Conservation of Brazilian amphibians. **Cons. Biol.**, 19: 653–658
- Silvano, D.L., Colli, G.R., Dixo, M., Wiederhecker, H.C, Pimenta, B.V.S. 2003. Anfíbios e Répteis. In: D.M. Rambaldi, D.A.S. Oliveira (Eds.) **Fragmentação de ecossistemas. Causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas**. Brasília, Ministério do Meio Ambiente, Pp. 183-200.
- Smith, D.C. 1987. Adult Recruitment in Chorus Frogs: Effects of Size and Date at Metamorphosis. **Ecology** 68:344–350.
- Smith-Gill, S.J., Berven, K.A. 1979. Predicting amphibian metamorphosis. **Am. Nat.**, 113: 563-585.
- SOS Mata Atlântica. 2010. **Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica no período 2008-2010**. Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo, Brasil.

- Speakman, J.R. 2000. The cost of living: field metabolic rates of small mammals. **Adv. Ecol. Res.**, 30: 178-297.
- Spicer, J.I., Gaston, K.J. 1999. **Physiological Diversity and Its Ecological Implications**. Blackwell Science Ltd. London.
- Steinicke, H. 2008. **Impact of habitat fragmentation on selected amphibian species in the fragmented landscape of Mata Atlântica at the Atlantic Plateau of São Paulo**, Brazil. Dissertação de mestrado. Naturwissenschaftlichen Fakultät I Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. 139p.
- Stevens, V.M., Polus, E., Wesselingh, R.A., Schtickzelle, N., Baguette, M. 2004. Quantifying functional connectivity: experimental evidence for patch-specific resistance in the Natterjack toad (*Bufo calamita*). **Landscape Ecology**, 19: 829–842.
- Steyermark A. C., Miamen A. G., Feghahati H. S., Lewno A. W. 2005. Physiological and morphological correlates of among-individual variation in standard metabolic rate in the leopard frog *Rana pipiens*. **J. Exp. Biol.** 208: 1201–1208.
- Taigen, T.L., Emerson, S.B., Pough, F.H. 1982. Ecological correlates of anuran exercise physiology. **Oecologia**, 52: 49-56.
- Taigen, T.L., Pough, F.H. 1985. Metabolic correlates of anuran behaviour. **Amer. Zool.**, 25: 987-997.
- Taylor, C. R., Schmidt-Nielsen, K. and Raab, J. L. 1970. Scaling of energetic cost of running to body size in mammals. **Am. J. Physiol.** 219, 1104- 1107.
- Taylor, C.R. 1977. The energetics of terrestrial locomotion and body size in vertebrates. In: **Scale Effects in Animal Locomotion** (ed. T. J. Pedley), pp. 111–125. London: Academic Press.
- Thomas, C.D., Hill, J.K., Lewis, O.T., 1998. Evolutionary consequences of habitat fragmentation in a localised butterfly. **J. Anim. Ecol.** 67, 485±497.
- Thorson, T. B. 1955. The relationship of water economy to terrestriality in amphibians. **Ecology**, 36:100–16.
- Tischendorf, L., Fahrig L., 2000. On the use and measurement of landscape connectivity. **Oikos**, 90: 7–19.

- Titon Jr., B., Navas, C.A., Jim, J., Gomes, F.R., 2010. Water balance and locomotor performance in three species of neotropical toads that differ in geographical distribution. *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Molecular & Integrative Physiology*, v. 156, p. 129-135.
- Tocher, M.D., Gaston, C., Zimmerman, B.L. 1997. Fragmentation effects on a central Amazonian frog community: a ten-year study. In: **Tropical Forest Remnants: Ecology, Management, and Conservation of Fragmented Communities**. W.F. Laurance, R.O. Bierregaard, Jr. (Eds.). The University of Chicago Press, Chicago, Illinois. Pp. 124-137.
- Urban, D.L., Shugart, H.H.Jr., 1986. Avian demography in mosaic landscapes: modeling paradigm and preliminary. In: **Wildlife 2000. Modeling habitat relationships of terrestrial vertebrates**. Verner, M.L., Morrison, M.L., Ralph, C.J. (Eds.). The University of Wisconsin Press. Wisconsin, pp. 273-279.
- Vallan, D. Influence of Forest Fragmentation on Amphibian Diversity in the Nature Reserve of Ambohitantely, Highland Madagascar. **Biol. Conserv.**, v. 96, p. 31-43, 2000.
- Van Buskirk, J. 2002. A comparative test of the adaptive plasticity hypothesis: relationships between habitat and phenotype in anuran larvae. **Am. Nat.**, 160: 87-102.
- Van Buskirk, J., and R. A. Relyea. 1998. Natural selection for phenotypic plasticity: predator-induced morphological responses in tadpoles. **Biol. J. of the Linnean Soc.**, 65:301–328.
- Vonesh, J.R. 2005. Sequential predator effects across three life stages of African tree frog, *Hyperolius spinigularis*. **Oecologia**, 143: 280-290.
- Wade, M.J. 2004. Selection in metapopulations? The coevolution of phenotype and context. – In: **Ecology, genetics, and evolution of metapopulations**, Hanski, I. & Gaggiotti, O.E. (Eds.), Elsevier Academic Press, pp. 259-274.
- Wells, K.D. 1977. Territoriality and male mating success in the green frog (*Rana clamitans*). **Ecology**, 58: 750-762.
- Wells, K.D. 1978. Territoriality in the green frog (*Rana clamitans*): vocalizations and agonistic behaviour. **Anim. Behav.**, 26: 1051-1063.

- Wells, K.D. 2001. The Energetics of Calling in Frogs. In: **Anuran Communication**. Ryan, M.J. (ed.). Smithsonian Inst. Press. Washington.
- Wells, K.D. 2007. **The ecology and behavior of amphibians**. The University of Chicago Press, Chicago. 1148p.
- Wells, K.D., Taigen, T.L., Rusch, S.W., Robb, C.C. 1995. Seasonal and nightly variation in glycogen reserves of calling gray treefrogs (*Hyla versicolor*). **Herpetologica**, 51: 359-368.
- Wikelski M., Cooke, S.J. 2006. Conservation physiology. **Trends in Ecology and Evolution**, 21:38-46.
- Wilson, R.S., Franklin, C.E., James, R.S. 2000. Allometric scaling relationships of jumping performance in the striped marsh frog *Limnodynastes peronii*. **J. Exp. Biol.**, 203: 1937-1946.
- Wilson, R.S., James, R.S., Van Damme, R. 2002. Trade-offs between speed and endurance in the frog *Xenopus laevis*: a multi-level approach. **J. Exp. Biol.**, 205:1145–1152.
- Zachariassen, K.E., Aunaas, T., Borseth, J.F., Einarson, S., Nordtug, T. Olsen, A., Skejervo, G. 1991. Physiological parameters in ecotoxicology. **Comp. Biochem. Physiol.**, 100 (1/2): 77-79.
- Zar, J.H. 1996. **Biostatistical Analysis**. Prentice-Hall Inc.; Englewood Cliffs, New Jersey.
- Zina, J., Ennsen, J., Pinheiro, S.C.P., Haddad, C.F.B., Toledo, L.F. 2007. Taxocenose de anuros de uma mata semidecídua do interior do Estado de São Paulo e comparações com outras taxocenoses do Estado, sudeste do Brasil. **Biota Neotrop.** 7: 49-58.
- Zug, G.R. 1972. Anuran locomotion: structure and function. 1. Preliminary observations on the relation between jumping and osteometrics of appendicular and postaxial skeleton. **Copeia**, 1972: 613–624.
- Zug, G.R. 1978. Anuran locomotion – structure and function, 2: jumping performance of semiaquatic, terrestrial, and arboreal frogs. **Smithson. Contrib. Zool.** 276: 1–31.
- Zuidema, P.A., Sayer, J.A., Dijkman, W., 1996. Forest fragmentation and biodiversity: the case for intermediate-sized conservation areas. **Environ. Cons.**, 23: 290–297.

ANEXO 1

Resultados das análises de variância proveniente das comparações intraespecífica de todas as variáveis morfológicas e fisiológicas relacionadas ao desempenho locomotor entre as populações das espécies *Physalaemus cuvieri* e *Proceratophrys boiei* provenientes de paisagens fragmentadas e contínuas de Ribeirão Grande e São Luis do Paraitinga.

	<i>Physalaemus cuvieri</i>			<i>Proceratophrys boiei</i>		
	Local	Ambiente	Local*Ambiente	Local	Ambiente	Local*Ambiente
Massa Corpórea	$F_{3,51}=2,76$; $P=0,103$	C<F $F_{3,51}=10,82$; $P=0,002$	$F_{3,51}=2,53$; $P=0,118$	$F_{3,39}=0,00$; $P=0,998$	$F_{3,39}=0,63$; $P=0,432$	RG: C=F SLP: C>F C: RG=SLP F: RG>SLP $F_{3,39}=7,68$; $P=0,009$
Comprimento Rostro-Cloacal	RG>SLP $F_{3,49}=4,80$; $P=0,033$	C<F $F_{3,49}=6,49$; $P=0,014$	$F_{3,49}=1,15$; $P=0,289$	$F_{3,38}=0,73$; $P=0,399$	$F_{3,38}=0,07$; $P=0,789$	$F_{3,38}=1,70$; $P=0,201$
Comprimento do Fêmur	$F_{3,51}=0,01$; $P=0,936$	C<F $F_{3,51}=6,99$; $P=0,011$	$F_{3,51}=1,12$; $P=0,295$	RG<SLP $F_{3,39}=13,29$; $P=0,0001$	$F_{3,39}=0,53$; $P=0,473$	$F_{3,39}=4,13$; $P=0,050$
Comprimento da Tíbia	$F_{3,48}=2,26$; $P=0,599$	C<F $F_{3,48}=4,16$; $P=0,047$	$F_{3,48}=0,06$; $P=0,815$	$F_{3,39}=0,06$; $P=0,810$	C>F $F_{3,39}=7,57$; $P=0,009$	RG: C=F SLP: C>F C: RG=SLP F: RG=SLP $F_{3,39}=4,70$; $P=0,037$
Comprimento do Pé	$F_{3,48}=2,26$; $P=0,139$	$F_{3,48}=0,56$; $P=0,457$	RG: C=F SLP: C<F C: RG>SLP F: RG=SLP $F_{3,48}=9,70$; $P=0,003$	$F_{3,39}=1,40$; $P=0,242$	C>F $F_{3,39}=4,23$; $P=0,047$	$F_{3,39}=0,16$; $P=0,696$
Comprimento do Membro Posterior	RG>SLP $F_{3,50}=0,99$; $P=0,038$	$F_{3,50}=4,54$; $P=0,038$	$F_{3,50}=3,32$; $P=0,075$	$F_{3,39}=0,08$; $P=0,779$	C>F $F_{3,39}=11,84$; $P=0,001$	$F_{3,39}=0,01$; $P=0,919$
Comprimento da Cabeça	RG<SLP $F_{3,44}=16,24$; $P=0,0002$	$F_{3,44}=0,95$; $P=0,334$	$F_{3,44}=3,21$; $P=0,080$	RG<SLP $F_{3,39}=5,80$; $P=0,021$	$F_{3,39}=0,04$; $P=0,842$	$F_{3,39}=0,81$; $P=0,374$
Comprimento do Membro Anterior	$F_{3,45}=0,33$; $P=0,584$	$F_{3,45}=1,22$; $P=0,275$	$F_{3,45}=0,99$; $P=0,325$	$F_{3,38}=0,02$; $P=0,896$	$F_{3,38}=3,50$; $P=0,069$	$F_{3,38}=3,12$; $P=0,086$

	<i>Physalaemus cuvieri</i>			<i>Proceratophrys boiei</i>		
	Local	Ambiente	Local*Ambiente	Local	Ambiente	Local*Ambiente
Massa do Músculo do Membro Posterior	$F_{3,44}=2,26;$ $P=0,140$	$F_{3,44}=0,13;$ $P=0,722$	$F_{3,44}=0,11;$ $P=0,754$	RG>SLP $F_{3,39}=4,54;$ $P=0,040$	$F_{3,39}=1,14;$ $P=0,292$	RG: C=F SLP: C>F C: RG=SLP F: RG>SLP $F_{3,39}=5,10;$ $P=0,030$
Massa do Músculo do Tronco	$F_{3,44}=3,02;$ $P=0,089$	$F_{3,44}=1,49;$ $P=0,229$	RG: C>F SLP: C=F C: RG=SLP F: RG<SLP $F_{3,44}=4,27;$ $P=0,045$	$F_{3,38}=0,00;$ $P=0,947$	$F_{3,38}=1,83;$ $P=0,184$	$F_{3,38}=0,38;$ $P=0,541$
Massa do Fígado	$F_{3,43}=1,19;$ $P=0,0281$	$F_{3,43}=0,69;$ $P=0,410$	$F_{3,43}=0,73;$ $P=0,397$	$F_{3,39}=1,47;$ $P=0,234$	C>F $F_{3,39}=5,01;$ $P=0,031$	$F_{3,39}=1,55;$ $P=0,221$
Massa do Coração	$F_{3,45}=1,18;$ $P=0,283$	$F_{3,45}=0,69;$ $P=0,411$	$F_{3,45}=0,01;$ $P=0,920$	RG>SLP $F_{3,38}=45,35;$ $P<0,0001$	$F_{3,38}=1,55;$ $P=0,221$	$F_{3,38}=0,08;$ $P=0,785$
Massa dos Rins	RG>SLP $F_{3,47}=9,16;$ $P=0,004$	$F_{3,47}=2,43;$ $P=0,126$	$F_{3,47}=0,57;$ $P=0,456$	RG>SLP $F_{3,38}=10,84;$ $P=0,002$	$F_{3,38}=2,68;$ $P=0,110$	$F_{3,38}=1,81;$ $P=0,187$
Massa do Trato Gastrointestinal	RG>SLP $F_{3,42}=9,43;$ $P=0,004$	C<F $F_{3,42}=7,19;$ $P=0,011$	$F_{3,42}=2,25;$ $P=0,118$	RG<SLP $F_{3,36}=5,65;$ $P=0,023$	$F_{3,36}=0,05;$ $P=0,827$	$F_{3,36}=0,28;$ $P=0,600$
VO2 repouso	$F_{3,44}=1,17;$ $P=0,285$	$F_{3,44}=0,17;$ $P=0,678$	RG: C=F SLP: C=F C: RG=SLP F: RG>SLP $F_{3,44}=4,77;$ $P=0,035$	RG>SLP $F_{3,38}=19,53;$ $P<0,0001$	C<F $F_{3,38}=11,02;$ $P=0,002$	RG: C=F SLP: C<F C: RG>SLP F: RG=SLP $F_{3,38}=11,51;$ $P=0,001$
VO2 pós atividade	$F_{3,44}=0,07;$ $P=0,789$	$F_{3,44}=1,84;$ $P=0,182$	RG: C<F SLP: C=F C: RG=SLP F: RG=SLP $F_{3,44}=5,39;$ $P=0,025$	RG>SLP $F_{3,39}=9,76;$ $P=0,003$	C<F $F_{3,39}=7,54;$ $P=0,009$	RG: C=F SLP: C<F C: RG>SLP F: RG=SLP $F_{3,39}=8,41;$ $P=0,006$
Escopo Metabólico	$F_{3,44}=0,48;$ $P=0,490$	$F_{3,44}=0,67;$ $P=0,418$	$F_{3,44}=2,01;$ $P=0,163$	$F_{3,38}=1,41;$ $P=0,243$	$F_{3,38}=2,58;$ $P=0,117$	$F_{3,38}=2,04;$ $P=0,162$
Atividade máxima da Citrato Sintase	$F_{3,40}=0,00;$ $P=0,993$	$F_{3,40}=0,01;$ $P=0,941$	RG: C=F SLP: C=F C: RG=SLP F: RG=SLP $F_{3,40}=4,22;$ $P=0,047$	$F_{3,39}=2,81;$ $P=0,102$	C>F $F_{3,39}=7,33;$ $P=0,010$	$F_{3,39}=0,11;$ $P=0,739$

	<i>Physalaemus cuvieri</i>			<i>Proceratophrys boiei</i>		
	Local	Ambiente	Local*Ambiente	Local	Ambiente	Local*Ambiente
Atividade máxima da Lactato Desidrogenase	$F_{3,40}=3,53$; $P=0,068$	$F_{3,40}=0,70$; $P=0,408$	$F_{3,40}=0,85$; $P=0,363$	$F_{3,39}=1,90$; $P=0,176$	$F_{3,39}=0,56$; $P=0,458$	$F_{3,39}=2,22$; $P=0,145$
Resistência	$F_{3,51}=0,07$; $P=0,794$	$F_{3,51}=0,56$; $P=0,458$	$F_{3,51}=0,21$; $P=0,650$	$F_{3,37}=1,33$; $P=0,256$	$F_{3,37}=6,04$; $P=0,019$	RG: C=F SLP: C>F C: RG<SLP F: RG>SLP $F_{3,37}=26,43$; $P<0,0001$
Tempo de Exaustão	$F_{3,51}=0,01$; $P=0,923$	$F_{3,51}=0,27$; $P=0,605$	$F_{3,51}=0,71$; $P=0,404$	$F_{3,39}=1,00$; $P=0,324$	$F_{3,39}=0,77$; $P=0,386$	RG: C<F SLP: C>F C: RG<SLP F: RG>SLP $F_{3,39}=19,82$; $P<0,0001$
Número de saltos	$F_{3,51}=0,56$; $P=0,459$	$F_{3,51}=0,11$; $P=0,739$	$F_{3,51}=1,38$; $P=0,246$	$F_{3,37}=0,78$; $P=0,385$	$F_{3,37}=1,11$; $P=0,299$	RG: C=F SLP: C>F C: RG=SLP F: RG>SLP $F_{3,37}=8,49$; $P=0,006$
Potência do Salto	$F_{3,51}=0,56$; $P=0,458$	$F_{3,51}=3,76$; $P=0,058$	$F_{3,51}=1,50$; $P=0,226$	$F_{3,37}=3,55$; $P=0,068$	$F_{3,37}=7,12$; $P=0,012$	RG: C<F SLP: C>F C: RG<SLP F: RG>SLP $F_{3,37}=23,69$; $P<0,0001$

	Physalaemus				Leptodactylus			
	Ribeirão Grande		São Luis do Paraitinga		Ribeirão Grande		São Luis do Paraitinga	
VO2 repouso	P. cuvieri - frag.	A	F _{2,36} =1.56; P=0.224				F _{1,11} =0.01; P=0.921	
	P. cuvieri - cont.	AB						
	P. sipiniger - cont.	B						
	P. olfersii - cont.	C						
	F ₃₄₀ =13.98; P<0.0001							
VO2 pós atividade	P. cuvieri - frag.	A	P. cuvieri - cont.	A			L. mystacinus - frag.	A
	P. cuvieri - cont..	AB	P. cuvieri - frag.	A			L. marmoratus- cont.	B
	P. sipiniger - cont.	B	P. olfersii - cont.	B			F _{1.13} =102.79; P<0.0001	
	P. olfersii - cont.	B	F _{2,33} =0.05; P=0.954					
	F _{3,38} =5.42; P=0.004							
Escopo Metabólico			P. cuvieri - cont.	A			L. mystacinus - frag.	A
	F _{3,39} =1.40; P=0.259		P. cuvieri - frag.	A			L. marmoratus- cont.	B
			P. olfersii - cont.	B			F _{1,9} =146.22; P<0.0001	
			F _{2,36} =3.77; P=0.033					
Atividade máxima da Citrato Sintase	P. olfersii - cont.	A	P. cuvieri - frag.	A	L. mystacinus - frag.	A	L. mystacinus - frag.	A
	P. cuvieri - cont..	B	P. olfersii - cont.	A	L. notoakitites - cont.	B	L. marmoratus- cont.	B
	P. cuvieri - frag.	B	P. cuvieri - cont.	B	F _{1.19} =8.45; P=0.009	F _{1.14} =8.05; P=0.014		
	P. sipiniger - cont.	B	F _{2,27} =5.93; P=0.008					
	F _{3,48} =6.07; P=0.001							
Atividade máxima da Lactato Desidrogenase	P. olfersii - cont.	A	P. olfersii - cont.	A	L. mystacinus - frag.	A	L. mystacinus - frag.	A
	P. cuvieri - frag.	B	P. cuvieri - frag.	A	L. notoakitites - cont.	B	L. marmoratus- cont.	B
	P. cuvieri - cont..	BC	P. cuvieri - cont.	B	F _{1.19} =12.23; P=0.003	F _{1.14} =36.35; P<0.0001		
	P. sipiniger - cont.	C	F _{2,27} =9.85; P=0.001					
	F _{3,48} =14.77; P<0.0001							