

RELATÓRIO DE PÓS-DOCTORADO

Processo Fapesp 2018/25554-2

Período de vigência: Maio de 2019 à Maio de 2023

Período coberto pelo Relatório Científico: Maio de 2019 à Maio de 2023

PROJETO

A fauna parasitária de anfíbios responde a variações na integridade de ecossistemas ripários?

Dra. Aline Aguiar

Pós-doutoranda

Prof. Dr. Célio Fernando Baptista Haddad

Supervisor

Depto. Biodiversidade, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus Rio Claro

Rio Claro

Maio 2023

RESUMO DO PLANO INICIAL

As florestas ripárias são extremamente importantes para a estrutura e para o funcionamento de riachos de primeira ordem, constituindo complexos que podem ser considerados um único ecossistema ripário. Estudos anteriores constataram que florestas ripárias com faixas mais largas e com vegetação mais íntegra indicam melhor qualidade da água e riachos com maior integridade. A presente proposta tem o objetivo de estudar a diversidade de parasitas associados a anfíbios que circulam em seis ecossistemas ripários (fragmentos de floresta ripária com riachos de primeira ordem) com diferentes níveis de integridade, no norte do Paraná. Avaliaremos se a fauna parasitária reflete a integridade desses ecossistemas, testando a hipótese de que ambientes íntegros apresentam alta diversidade, baixa abundância e maior proporção de espécie de parasitas com ciclo de vida complexo. Esses parâmetros podem fornecer dados sobre a integridade do habitat antes mesmo que algum prejuízo seja detectado nas populações de anfíbios, além de potencialmente qualificar a fauna parasitária de anfíbios como um indicador de integridade para o ecossistema como um todo. Assim, o ineditismo desta proposta consiste em verificar se a variação de características bem estabelecidas de ecossistemas ripários, como quantidade (largura) e qualidade (integridade) da vegetação ripária influenciam a fauna parasitária de anfíbios, bem como em propor o uso integrado dessas informações em medidas de conservação.

RESUMO DO QUE FOI REALIZADO NO PERÍODO

As expedições a campo para coleta dos anfíbios foram realizadas em três momentos: de 04 a 10 de dezembro de 2019, de 03 a 09 de fevereiro de 2020, e de 26 de janeiro a 05 de fevereiro de 2021, totalizando 22 dias de amostragens. Em campo, também foram realizadas análises da qualidade da água (temperatura, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, e concentrações de nitrato e fosfato). A partir da necropsia dos anuros, todos os parasitas encontrados foram triados, fixados e processados conforme protocolos para análise de microscopia de luz e eletrônica, além daqueles para análises moleculares. Além dos principais resultados sobre a influência da integridade florestal na comunidade parasitária, outros manuscritos de cunho taxonômico estão sendo desenvolvidos com informações do primeiro registro do Digenea *Creptotrema lynchi* para anuros brasileiros, além das redescrições de duas espécies de Digenea do gênero *Gorgoderina*, com base em análises moleculares e microscopia eletrônica de varredura. Assim, como forma de aprimorar a determinação destas espécies de *Gorgoderina* bem como as relações filogenéticas do grupo, fomos coletar espécimes de *G. parvicava* da localidade tipo (Angra dos Reis, RJ) para análise genética.

Durante o desenvolvimento do projeto, foram estabelecidas algumas colaborações das quais outros dados estão sendo analisados: I) estudo dos macroinvertebrados aquáticos provenientes destas áreas para verificar o potencial desses animais como hospedeiros intermediários de parasitas de anfíbios; e II) estudo de biomarcadores genotóxicos em duas espécies de anfíbios (*Dendropsophus nanus* e *Proceratophrys avelinoi*) provenientes destas áreas. Embora não tenham relação direta com essa proposta, essas colaborações foram importantes para o trabalho de campo e para o envolvimento de alunos de pós-graduação (mestrado e doutorado) no desenvolvimento de projetos relacionados a esses dados.

Após a diminuição da crise causada pela pandemia da Covid-19 foi possível a solicitação da BEPE e então a possibilidade de adquirir experiências no laboratório do professor Jason Rohr da Universidade de Notre Dame, Estados Unidos, durante o período de dezembro de 2021 a dezembro de 2022. O objetivo do projeto desse estágio foi avaliar se a exposição a contaminantes PFOS (Ácido perfluorooctanessulfônico) aumentaria o risco de infecções causadas por *Ranavirus*.

A seguir, as principais atividades e resultados relacionados ao projeto da bolsa do país (processo 2018/25554-2) são apresentados.

ATIVIDADES REALIZADAS E RESULTADOS OBTIDOS

Amostragem dos anuros e procedimentos em campo

Esse estudo foi desenvolvido em seis fragmentos florestais circundados por matriz agrícola, pertencentes à região rural de Londrina, Norte do Paraná. Esses fragmentos foram categorizados previamente de acordo com a largura da faixa de floresta ripária e a composição de espécies vegetais (Medeiros & Torezan, 2013; Cavalheiro, 2018), e através desses dois parâmetros bem estabelecidos, classificamos a integridade florestal desses seis fragmentos, sendo dois fragmentos como referência em integridade, dois com integridade moderada e dois com integridade baixa (Tabela 1).

Os anuros foram coletados por busca ativa noturna nos seis fragmentos, durante três expedições: de 04 a 10 de dezembro de 2019, de 03 a 09 de fevereiro de 2020, e de 26 de janeiro a 05 de fevereiro de 2021, totalizando 22 dias de amostragens com cinco pesquisadores em campo. As amostragens iniciavam-se no crepúsculo e terminavam por volta das 23 horas, percorrendo as margens à jusante e em direção à nascente, além de trechos perpendiculares ao riacho em direção à faixa de floresta. Não foi possível realizar as transecções fielmente ao que foi proposto inicialmente e em alguns pontos tivemos certa dificuldade no acesso aos riachos devido à densa mata fechada. Além disso, em todas as expedições, observamos um baixo número de indivíduos em atividade. Houve a intenção de colocarmos armadilhas de interceptação e queda para complementar a amostragem por busca ativa, mas algumas características como relevo acidentado e a presença de muitas rochas em algumas áreas inviabilizaram a padronização das armadilhas. No entanto, acreditamos que essas dificuldades não prejudicaram as amostragens dos anuros. A nomenclatura dos anuros está seguindo a classificação adotada por Frost (2023) e pela Sociedade Brasileira de Herpetologia (Segalla et al., 2019).

A qualidade da água foi analisada a partir das concentrações de fósforo, nitrogênio, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e temperatura. O fósforo e o nitrogênio, denominados aqui como P e N, respectivamente, foram quantificados através das concentrações de fosfato ($\text{PO}_4\text{-P}$) e nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$), utilizando um fotômetro portátil (Macherey-Nagel, modelo PF-12 Plus). Foram utilizados os kits de leitura direta Visocolor Eco, teste 5-84 para P, com limites de detecção entre 0,2 mg L⁻¹ e 5,0 mg L⁻¹, e teste 5-41 para N, com limites de detecção entre 1,0 mg L⁻¹ e 14,0 mg L⁻¹. Valores abaixo do limite de detecção foram assumidos como iguais a 50% deste (Dinelli et al., 2012): 0,1 mg L⁻¹ para P e 0,5 mg L⁻¹ para N. Para as medidas de oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e temperatura da água foi utilizado um multiparâmetro YSI 85, que

possui compensação automática de temperatura para 25°C para as medidas de condutividade elétrica, com fator de compensação entre 0% a 4%. As medidas de pH não foram realizadas pois este equipamento apresentou problemas durante as amostragens em campo. A partir da instalação de um laboratório em campo, os anuros tiveram sua massa e seu comprimento rostro-cloacal (CRC) medidos, utilizando, respectivamente, dinamômetros com precisão de 0,1g e paquímetro com precisão de 0,1mm. Em seguida, os anuros foram mortos com superdosagem de lidocaína intraperitoneal para efetuarmos a necropsia e retirada dos órgãos internos em busca de parasitas. Os procedimentos de anestesia e necropsia dos anfíbios estão de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animal da UNESP (CEUA- protocolo 3042, N°19/2019). Amostras de músculo da perna dos anuros foram coletadas para análises moleculares para estudos taxonômicos que estão sendo depositados na coleção de tecidos. Sob estereomicroscópio, os parasitas foram separados em placas de petri contendo soro fisiológico para serem limpos e, em seguida, foram fixados de acordo com os diferentes protocolos para microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análises moleculares. Todos os parasitas que apresentaram vários espécimes tiveram amostras fixadas em etanol absoluto para extração de DNA e posterior sequenciamento em laboratório. Os parasitas nematóides foram fixados com etanol 70% a quente tanto para microscopia de luz quanto para MEV. Os platelmintos, como cestóides e digenéticos, foram fixados com etanol 90% com leve compressão entre lâmina e lamínula para microscopia de luz, enquanto outros espécimes foram fixados a quente para MEV. Parasitas acantocéfalos foram submetidos à refrigeração por alguns minutos para exposição da probóscide e, então, fixados a frio com etanol 70%. Todos os parasitas foram contabilizados e mantidos em etanol 70% em frascos contendo informações do hospedeiro e órgão parasitado.

Além dos parasitas, durante a necropsia dos anfíbios, coletamos tecidos como sangue, cérebro, músculo e fígado para posteriores análises de biomarcadores genotóxicos, bioquímicos, fisiológicos e de neurotoxicidade. O sangue foi coletado a partir do coração, usando seringas heparinizadas para confecção de esfregaços e para o Ensaio Alcalino do Cometa. Os esfregaços foram fixados com metanol e, a partir desses, análise de micronúcleo e alterações eritrocíticas nucleares e análises hematológicas (série branca) estão sendo realizadas para verificar o estado de saúde desses animais. O Ensaio do Cometa detectará possíveis danos no DNA desses anuros e, para isso, 20 µL de sangue foram separados em solução de criopreservação e mantidas em nitrogênio líquido, onde também foram mantidas as amostras dos demais tecidos. Amostras de cérebro e músculo

estão sendo avaliadas quanto à atividade da acetilcolinesterase (AChE), que é um biomarcador que responde a possíveis agentes neurotóxicos do ambiente. Enquanto as amostras de fígado permitirão a avaliação de enzimas do estresse oxidativo.

Após a necropsia e coleta dos parasitas, os anfíbios foram fixados em solução de formol 10% e preservados em etanol 70%, de acordo com a licença de captura/coleta/transporte expedida pelo Ministério do Meio Ambiente – MMA, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO (69194-1). Os exemplares de anfíbios estão sendo incorporados à coleção de anfíbios CFBH, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, campus Rio Claro.

Procedimentos em laboratório

Em laboratório foram montadas lâminas permanentes e temporárias com os parasitas. Nematóides foram clarificados com ácido láctico, enquanto digenéticos, cestóides e acantocéfalos foram corados com carmim clorídrico e, em seguida, submetidos à desidratação gradual em série alcoólica para então serem montados em lâminas com eugenol (Amato et al., 1991). As lâminas foram observadas em fotomicroscópio com sistema de captura e análise de imagem para fotodocumentação e análises morfológicas e morfométricas de interesse taxonômico.

Alguns espécimes de parasitas, que foram preservados em etanol absoluto, foram processados para extração de DNA e sequenciamento genético. Utilizamos o protocolo de extração de DNA por Acetato de Amônio (Adaptado de Maniatis et al 1982 por Lyra et al., 2017). Primeiramente, os espécimes foram retirados do etanol para secagem, em seguida receberam 125 µl de solução de lise e 2,5 µl de Proteinase-K (20 mg/ml), permanecendo assim até que o tecido estivesse diluído (aproximadamente quatro horas). Após esse tempo, em temperatura ambiente, foram adicionados 125 µl de acetato de amônia (7,5 M) nas amostras e, então, homogeneizadas e incubadas no gelo por 30 minutos. Na sequência, as amostras foram centrifugadas (13.000 rpm) por 20 minutos sob refrigeração (4 °C) e, então, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos contendo 250 µl de isopropanol absoluto, mantendo-os no gelo para evitar que o precipitado voltasse a diluir na solução. As amostras foram levadas ao freezer -80 °C por 20 minutos para ocorrer a precipitação e, em seguida, foram centrifugadas novamente por 20 minutos (13.000 rpm; 4 °C) e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 250 µl de etanol (70%) resfriado para a lavagem do precipitado, invertendo o tubo gentilmente várias vezes e, novamente, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos (13.000 rpm;

4 °C). Então, o etanol foi descartado cuidadosamente sem mover o *pellet* de DNA e o tubo foi invertido em papel absorvente para secagem completa sem resíduos de etanol. Por último, o *pellet* de DNA foi dissolvido em 1 × TE (50 µl) *overnight* na geladeira e estocado em freezer -20 °C para a posterior reação PCR.

Os fragmentos de DNA foram amplificados usando o gene mitocondrial COI com primers padrões LCO1490 (forward) e HCO2198 (reverse) (Folmer et al., 1994). As reações de amplificação consistiram em 20 µl final com 1µl do DNA extraído, 10 µl de Taq DNA master mix (Anpliqon), 0,4 µl (10 pmol) de cada primer e H2O milli-Q para completar volume final. A PCR foi realizada no termociclador Applied Biosystem, com as condições de temperaturas e ciclos seguindo o protocolo de amplificação *step-up* (Lyra et al., 2017). Esse protocolo consiste em 10 ciclos com temperatura de anelamento em 45 °C aumentando + 0.5 °C em cada ciclo, seguido por 25 ciclos com temperatura de anelamento de 50 °C.

Os produtos de PCR (1,5µl) foram visualizados em gel de agarose (1%) usando o gel Red e Loading Buffer. Então, esses produtos foram purificados usando um mix de 0,5 unidades de fosfatase alcalina termosensitiva (FastAP) e 1 unidade de Exonuclease I (Thermo Fisher Scientific Inc.) diluída em 2,45 µl de água ultrapura para PCR, incubados por 30 minutos a 37 °C, seguidos por 5 minutos a 95 °C. Os produtos purificados foram enviados para Macrogen Inc. (Seoul, Republic of Korea) para sequenciamento. As sequências foram limpas para qualidade utilizando o programa Geneious V11 (Biomatter) e a identidade verificada através do BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Seguindo o mesmo protocolo de extração, amostras de tecidos de alguns espécimes de *Crossodactylus caramaschii* (Hylodidae) foram processados a fim de confirmar sua identidade através da comparação de suas sequências genéticas com outras disponíveis na literatura e no banco de dados do laboratório.

Análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas com alguns espécimes de *Gorgoderina* fixados previamente com álcool 70% à quente. Em seguida, foram desidratados em série alcoólica (80%, 90% e 100%) com 15 minutos em cada concentração para serem levados ao ponto crítico (CPD 020, Balzer Union); depois, foram montados em plataforma de alumínio com fita dupla-face para serem metalizados e então analisados em microscópio eletrônico de varredura (Quanta 200 scanning electron microscope) (adaptado de Allison et al. 1972).

Análise dos dados

Para analisar a riqueza de anuros, foram realizadas curvas de rarefação considerando o número de dias como unidade amostral. Assim, foram obtidas a riqueza observada e a riqueza estimada para cada um dos fragmentos, separadamente, e para os três níveis de integridade (alta, média e baixa) a partir dos quais os seis fragmentos foram classificados previamente. As curvas de extrapolação foram realizadas no ambiente R (R Core Team, 2023) com os pacotes *iNEXT*, *ggplot2* e *ggthemes* através das funções *iNEXT* e *ggiNEXT*; enquanto os estimadores de riqueza Chao 1, Jackknife 1 e Bootstrap foram obtidos através da função *specpool* do pacote *vegan*. Em todas as análises o número de anuros coletados foi extrapolado para 500 indivíduos. Além disso, também realizamos análises de escalonamento NMDS (Non-metric Multidimensional Scaling) seguida por ANOSIM (Analysis of Similarities) para verificar se haveria uma distinção entre as comunidades de anuros dos diferentes fragmentos através dos índices de Bray-curtis (para dados de abundância das espécies) e Jaccard (para dados de presença e ausência). Essas duas últimas análises foram realizadas no software PAST (Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis) (Hammer et al., 2001).

A partir da identificação dos parasitas, calculamos a prevalência parasitária (P), abundância média (AM) e intensidade média de infecção (IMI), bem como os valores mínimo e máximo de parasitas para espécies de anuros que apresentaram um N amostral a partir de 10 indivíduos (Bush et al., 1997). A prevalência é a porcentagem de anuros parasitados e a AM é dada pela média de parasitas encontrados em todos os anuros analisados de uma população (incluindo aqueles negativos), enquanto a IMI é dada pela média de parasitas somente nos anuros positivos em uma dada população. Esses dois parâmetros de abundância de parasitas (AM e IMI) fornecem informações sobre a quantidade de parasitas que um indivíduo hospedeiro pode abrigar. Essas médias são acompanhadas pelo erro-padrão, de acordo com Bush et al. (1997). A riqueza de parasitas é tratada aqui como o número de *taxa* de parasitas encontrado, e a distribuição de helmintos parasitas entre os fragmentos bem como o compartilhamento e a similaridade na composição de espécies foram avaliados a partir de análises de escalonamento NMDS e Analysis of Similarity (ANOSIM) no software PAST (Hammer et al., 2001). Também analisamos a extrapolação dos dados de riqueza de parasitas com estimadores e curva de rarefação através dos pacotes *iNEXT*, *ggplot2*, *ggthemes* (função *iNEXT* e *ggiNEXT*) e *vegan* (função *specpool*) no ambiente R (R Core Team, 2023).

Para analisar os efeitos dos parâmetros da integridade e dos fatores abióticos na comunidade parasitária, nós usamos Modelos Lineares Generalizados Multivariados (MLGM), através da função *manyglm* do pacote *mvabund* no ambiente R (R Core Team, 2023). Foram construídos diferentes modelos com as variáveis florestais (AER, largura da faixa de floresta e área da bacia de captação do fragmento; Tabela 1) e abióticas (nitrato, fosfato, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido e temperatura da água; Tabela 2) como preditoras e os parâmetros parasitários (composição, riqueza, diversidade e abundância) como variáveis respostas. Todos os modelos foram rodados usando a distribuição negativa binomial. Para padronizar as análises, nós selecionamos espécimes de *P. avelinoi* como espécie modelo presente em todos os fragmentos para esse estudo da influência da integridade nas comunidades parasitárias. Também excluimos das análises as fêmeas hospedeiras e diminuimos o N de anuros do fragmento MA para diminuir possíveis interferências de esforço amostral.

Principais Resultados

Como forma de organizar os principais resultados obtidos, estes são apresentados a seguir em três seções das quais estão sendo elaborados três manuscritos: i) Anfíbios anuros provenientes de fragmentos de floresta ripária do norte do Paraná, Brasil; ii) Comunidades parasitárias de anuros de fragmentos florestais com diferentes níveis de integridade; e iii) Influência da integridade de ecossistemas ripários nas comunidades parasitárias de anuros.

1) Anfíbios anuros de fragmentos de floresta ripária do Norte do Paraná

A partir das três expedições, foram coletados 334 anfíbios pertencentes a 21 espécies de sete famílias (Brachycephalidae, Bufonidae, Centrolenidae, Hylidae, Hylodidae, Leptodactylidae e Odontophrynidae) (Tabela 3). As áreas com integridade moderada (MA e RV) totalizaram nove espécies, enquanto as áreas com integridade alta (BL e GY) e baixa (PQ1 e PQ2) tiveram uma riqueza de 13 e 12 espécies respectivamente (Tabela 3). Embora tenhamos registrado 21 espécies de anuros e uma diversidade de 8,92 (Shannon-Weaver), os estimadores apontam para uma riqueza de 24,9 (Bootstrap) à 35,9 (Chao 1) e uma diversidade de 9,39 considerando todos anuros coletados (Tabela 4). Extrapolando os dados, observamos que a curva referente a todos os espécimes coletados tende a um leve crescimento mesmo depois dos 300 indivíduos, indicando que o número de espécies poderia ser maior do que aquele observado (Figura 1). Entre os fragmentos, as maiores estimativas de riqueza foram observadas para GY (alta integridade florestal)

variando de 13,65 (Bootstrap) à 23 espécies (Chao 1) (Tabela 4). Apesar de PQ2, baixa integridade, ter apresentado maior índice de diversidade de anuros ($H' = 8,14$), a sua diversidade estimada ($H' = 9,91$) não diferiu muito daquelas estimadas para as áreas com alta integridade (GY com $H' = 8,15$ e BL com $H' = 8,53$) (Tabela 4). Analisando as estimativas e a diversidade para cada nível de integridade, o padrão se mantém semelhante ao da análise por local, onde os maiores valores de riqueza e diversidade foram registrados para fragmentos com alta integridade, com exceção apenas do estimador Chao 1 que teve seu maior valor registrado para anurofauna dos fragmentos de baixa integridade (Tabela 5; Figura 2).

Nas análises de escalonamento da composição da anurofauna por local, podemos verificar que não houve uma separação totalmente definida entre os fragmentos de integridade média com os de alta integridade (Figura 3). Porém, fica claro que as áreas com baixa integridade PQ1 e PQ2 apresentam grande similaridade entre si (Figura 3). Além disso, também podemos observar nos scatterplots construídos a partir dos níveis de integridade que PQ1 e PQ2 apresentam-se totalmente separadas das demais áreas enquanto as áreas “alta” e “média” tendem a apresentar uma maior similaridade entre si (Figura 4). Testando essas similaridades através de ANOSIM, observamos que todas foram significativamente diferentes, tanto por local ($p_{\text{Jaccard}} = 0,0001$; $R_{\text{Jaccard}} = 0,544$; $p_{\text{Bray-curtis}} = 0,0001$; $R_{\text{Bray-curtis}} = 0,6343$; Tabelas 6 e 7) como por nível de integridade ($p_{\text{Jaccard}} = 0,0002$; $R_{\text{Jaccard}} = 0,4413$; $p_{\text{Bray-curtis}} = 0,0004$; $R_{\text{Bray-curtis}} = 0,4691$; Tabelas 8 e 9), corroborando com as análises de NMDS.

Anuros das espécies *Haddadus binotatus*, *Ischnocnema henselii*, *Rhinella diptycha*, *Vitreorana uranoscopa*, *Boana* aff. *caingua*, *Boana raniceps*, e *Leptodactylus mystacinus* foram colteados somente nas áreas com alta integridade florestal, e estas espécies corresponde a um terço das espécies amostradas para as seis áreas do estudo (Tabela 3). Verificamos também através de análises moleculares preliminares que espécimes identificados como *Crossodactylus* aff. *caramaschii* podem representar uma espécie nova, ressaltando a importância da preservação desses fragmentos pois o maior número de espécimes desta espécie foi registrado em um fragmento de integridade média com apenas 32 m de largura de faixa florestal.

Embora a riqueza observada nas áreas com alta integridade tenham diferido em apenas uma espécie quando comparadas com as áreas de integridade baixa, a composição de espécies foi significativamente distinta, assim como a abundância de indivíduos em cada área (Tabela 3).

Não tivemos capacidade de medir a influência da matriz agrícola sobre esses fragmentos, mas a cada expedição percebemos que mesmo aqueles classificados com alta integridade apresentavam diminuição da faixa de mata devido a expansão da área do plantio, e exemplos como as espécies *H. binotatus* e *I. henselii*, dependentes de ambientes florestais, foram encontrados em números muito baixo de indivíduos e em apenas uma única expedição à campo.

II) Comunidades parasitárias de anuros de fragmentos florestais com diferentes níveis de integridade

Dos 331 anuros necropsiados (22 espécies), 182 indivíduos apresentaram pelo menos um parasita, ($P = 54,98\%$), o que corresponde a 15 espécies de anuros. A abundância dos parasitas em cada anuro parasitado variou de 1 a 418, sendo a $IMI = 16,52 \pm 4,28$ e a $AM = 9,08 \pm 2,39$. No total, foram coletados 3007 helmintos parasitas pertencentes a 22 taxa distribuídos em Nematoda, Acantocephala, Digenea, Cestoda e Oligochaeta (Tabela 10).

Nosso protocolo de extração de DNA funcionou bem para os parasitas que analisamos (*Centrorhynchus* sp., Cosmocercidae, Physalopterinae gen. sp., *Rhabdias* sp., larvas de Cestoda, *Cylindrotaenia americana*, *Gorgoderina diaster*, *Gorgoderina parvicava*, *Gorgoderina* sp. e *Dero* sp.). No entanto, amostras que tiveram qualidade para sequenciar foram as de *Rhabdias* sp., Cosmocercidae e *Gorgoderina* sp.. Assim, conseguimos separar e identificar alguns desses parasitas revelando, por exemplo, novas espécies de *Gorgoderina*.

Considerando as três categorias de integridade dos fragmentos, a riqueza de parasitas foi maior nos fragmentos de baixa integridade totalizando 15 taxa de parasitas, seguido por 9 em integridade alta e 8 nos fragmentos com integridade média (Tabela 10).

Embora tenhamos registrado 22 espécies de helmintos e uma diversidade de 5,44 (Shannon-Weaver), os estimadores apontam para uma riqueza de 26,62 (Bootstrap) à 37,04 (Chao 1) e uma diversidade de 5,91 considerando todos os helmintos analisados (Tabela 11). Extrapolando os dados, observamos que a curva referente a todos os espécimes coletados tende a um notável crescimento, mesmo próximo dos 500 hospedeiros analisados, indicando que o número de espécies parasitas poderia ser bem maior do que aquele observado (Figura 5). Já a curva referente aos parasitas dos fragmentos de integridade média mostra uma estabilização na riqueza próximo dos 100 hospedeiros analisados (Figura 5); isso é corroborado quando olhamos os estimadores de riqueza e diversidade desses fragmentos (Tabela 11). Comparando os três níveis de

integridade, as maiores estimativas de riqueza usando Chao 1 foram para integridade alta, porém os demais estimadores apontam maiores estimativas para a integridade média seguida pela integridade alta (Tabela 11).

Nas análises de escalonamento da composição da helmintofauna por nível de integridade, podemos verificar que não houve uma separação totalmente definida entre os níveis de integridade, utilizando ambos os índices de Jaccard e Bray-curtis (Figura 6). Porém, o teste de similaridade ANOSIM utilizando Bray-curtis ($R = 0,06572$; $p = 0,0036$) mostra uma diferença significativa entre a composição de espécies de parasitas ao longo dos níveis de integridade florestal (Tabela 13). Embora a diferença não ter sido significativa usando o índice de Jaccard ($R = 0,03468$; $p = 0,057$) a similaridade em pares não passou de 0,45 entre os grupos (Tabela 12), mostrando que a similaridade entre eles não é alta.

Foram amostradas 10 espécies de parasitas de ciclo complexo (Tabela 10), as demais espécies completam seu ciclo utilizando apenas um hospedeiro e são generalistas em sua maioria (*e.g.* Cosmocercidae). Os parasitas de ciclo complexo foram mais frequentes em áreas de baixa integridade (*i.e.* *Gorgoderina* spp.) pois são parasitas que precisam de moluscos como hospedeiros intermediários, e a eutrofização dessas áreas aumenta a incidência desses invertebrados nos corpos d'água, aumentando a chance de encontrar esses parasitas. Também observamos que algumas parasitas foram exclusivas de ambientes de baixa integridade, como: *Centrorhynchus* sp., Pharyngodonidae, *Rhabdias* sp2, *Schrankiana formosula*, *Schrankiana* sp. *Gorgoderina* aff. *parvicava*, *Gorgoderina diaster* e *Dero* sp.. Por outro lado, os parasitas Cosmocercidae morfo 3, Physalopterinae, *Cylindrotaenia americana* e *Spirometra* sp. foram registrados em todos os níveis de integridade. O registro de *Spirometra* sp. em sua forma encistada em vários indivíduos deve ser considerada um alerta no contexto de conservação de habitats e saúde de anfíbios, pois alguns estudos (*e.g.* Berger et al., 2009; Borteiro et al., 2015) apontam para um potencial patogênico desse cestóide dada a severidade da infecção em diversos órgãos.

Além disso, novos registros de associações são apresentados como por exemplo o oligoqueta *Dero* sp., que comumente parasitam o trato urinário de hylídeos, e digenéticos do gênero *Creptotrema* que parasitam trato digestório de peixes de água doce e aqui é reportado pela primeira vez parasitando anfíbios brasileiros. Adicionalmente, constatamos que as espécies de anuros *P. avelinoi*, *A. perviridis* e *I. henselii*, nunca foram estudadas em relação à sua fauna de parasitas.

III) Influência da integridade de ecossistemas ripários nas comunidades parasitárias de anuros

A fauna parasitária de espécimes de *P. avelinoi* proveniente dos seis fragmentos estudados foi composta por oito taxa de helmintos: Cosmocercidae, *Raillietnema spectans*, *Raillietnema* sp., *Rhabdias* sp., *Physaloptera* sp. (Nematoda), *Spirometra* sp. (Cestoda), *Gorgoderina* sp.1 e *Gorgoderina* sp.2 (Digenea). No geral, todos os modelos mostraram que o fragmento florestal afetou a composição (LRT = 53,24; $p = 0,014$) (Tabela 14 e 15) e a diversidade de parasitas (LRT_{brillouin} = 1,181; $p = 0,001$) (Tabela 14 e 15), enquanto os fatores abióticos e as variáveis da floresta não mostraram efeito significativa na composição e diversidade da comunidade parasitária (Tabela 15). Esses resultados mostram que os parâmetros parasitológicos das populações de *P. avelinoi* estudadas são influenciados significativamente pelo local e que fatores como os abióticos, largura e AER da floresta não explicariam essas diferenças, mas considerando a importância dos mesmos, eles poderiam influenciar indiretamente essas comunidades parasitárias.

Conclusões gerais

A riqueza de anfíbios para alguns fragmentos ainda é subestimada, no entanto as análises mostram que há uma separação em relação a composição das espécies da anurofauna ao longo dos fragmentos estudados. Os resultados evidenciam uma significativa diferença entre elas, além da riqueza observada e estimada serem maiores nos fragmentos com alta integridade.

De modo geral, a riqueza de helmintos parasitas foi maior nos anfíbios dos fragmentos de baixa integridade. A baixa riqueza nos ambientes de alta integridade pode estar relacionada com o esforço amostral (número de anuros coletados), visto que foram coletados 61 indivíduos contra 108 dos fragmentos de baixa integridade. Por outro lado, alguns dados evidenciam diferenças na composição de espécies de parasitas nos diferentes níveis de integridade. Além disso, novos registros de parasitas são apresentados, espécies novas estão sendo descritas, e é apontado o potencial patogênico de alguns parasitas nessas populações de anfíbios.

Verificamos que o fragmento florestal enquanto variável com diferentes níveis de integridade influencia a composição de espécies de parasitas associados às populações de *P. avelinoi*, evidenciando que as comunidades parasitárias podem responder às alterações ambientais.

OUTRAS ATIVIDADES REALIZADAS NO PERÍODO

As atividades adicionais relacionadas abaixo não interferiram com as atividades programadas do período da bolsa e em alguns casos elas potencializaram o bom andamento do projeto de pós-doutoramento financiado pela FAPESP, como por exemplo, as orientações de estudantes e colaborações em trabalhos de campo. As orientações e/ou coorientações de alunos da UEL advém do período que a pós-doutoranda atuou como docente temporária nesta instituição ministrando aulas na graduação (de 2016 a 2018) antes do início do pós-doutoramento. Desde o término do contrato como docente temporária, a pós-doutoranda atua somente como docente colaborador no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da UEL orientando alunos de mestrado.

1) Artigos publicados

- A. Aguiar, D.H. Moraes, F.H. Yamada, L.A. dos Anjos, L.A.F. da Silva & R.J. da Silva (2020). Can differences between continental and insular habitats influence the parasites communities associated with the endemic frog *Haddadus binotatus*? Journal of Helminthology, 94, e178, 1–8. <https://doi.org/10.1017/S0022149X20000620>.

- D.H. Moraes, M.I. Müller, F.T.V. Melo, A. Aguiar, Y. Willkens, C. de Sousa Silva, E.G. Giese, R.W. Ávila & Reinaldo José da Silva (2020). A new species of *Rhabdias* (Nematoda: Rhabdiasidae), a lung parasite of *Pseudopaludicola pocoto* (Anura: Leptodactylidae) from north-eastern Brazil: description and phylogenetic analyses. Journal of Helminthology, 94, e209, 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0022149X20000929>.

- Aline Aguiar, Drausio Honorio Moraes, Lidiane A. Firmino Silva, Luciano Alves dos Anjos, Ottilie Carolina Foster & Reinaldo José da Silva. (2021). Biodiversity of anuran endoparasites from a transitional area between the Atlantic Forest and Cerrado biomes in

Brazil: new records and remarks. *Zootaxa*, v. 4948, p. 1-41.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4948.1.1>.

- Franceschini, L.; Aguiar, A.; Zago, A.C.; Yamada, P.O.F.; Ebert, M.B.; Silva, R.J. (2021). Three new species of *Creptotrema* (Trematoda, Allocreadiidae) with an amended diagnosis of the genus and reassignment of *Auriculostoma* (Allocreadiidae), based on morphological and molecular evidence. *Parasite*, v.28, p.69.
<https://doi.org/10.1051/parasite/2021065>.

2) Capítulo de livro

“Effects of pharmaceutical compounds in tadpoles”; Claudia Bueno dos Reis Martinez and Aline Aguiar; in *Toxicology of Amphibian Tadpoles*. Eds. Eduardo Alves de Almeida and Juliane Silberschmidt Freitas, CRC Press, Taylor & Francis Group (*no prelo*).

3) Revisão de artigos em revistas científicas

- Anais da Academia Brasileira de Ciências
- Biota Neotropica
- Helminthologia
- Journal of Natural History
- Parasitology research
- Revista Brasileira de Zoociências
- South American Journal of Herpetology

4) Orientações em pós-graduação

- Lucas Henrique dos Santos. 2020. Metazoários parasitas de *Proceratophrys avelinoi* em fragmentos de floresta ripária do Norte do Paraná. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina. (concluída).

- Jamille Mariana de Oliveira Marques. 2019. Itens alimentares influenciam as comunidades de parasitas em *Leptodactylus podicipinus*? Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina. (concluída).

Jamille Mariana de Oliveira Marques. 2021. Efeitos toxicológicos de anuros encontrados em fragmentos circundados por áreas agrícolas e em girinos expostos a diferentes pesticidas. Tese de doutorado (coorientação). Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina. (em andamento).

5) Participação em eventos e visitas técnicas

- 30/06/2019: “Sarau Científico” organizado pela APG (Associação de Pós-graduandos) da UNESP campus Rio Claro no Horto Florestal de Rio Claro – evento de divulgação científica com a apresentação das pesquisas realizadas no Laboratório de Herpetologia da UNESP de Rio Claro e de material didático para a comunidade do município.

- 18-21/12/2022: British Ecological Society Annual Meeting, Edinburgo, UK. Apresentação de poster: “PFOS effects on Ranaviral infections and disease in the African clawed frog, *Xenopus laevis*”.

- 09-11/05/2022: Visita técnica à coleção US National Parasite Collection from Smithsonian Institution (Washington D.C.) – análise morfológica dos espécimes tipos de platelmintos (*Gorgoderina*) e nematóide (*Rhabdias*).

6) Participação em bancas

- Tatiana Motta Tavares. **2019**. The matrix type influences in the relationship between patch size and Amphibia richness: a global meta-analysis. Qualificação de doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

- Fernanda Polli Paez. **2019**. Novas espécies de *Aegla* (Crustacea, Anomura, Aeglidae) bacia hidrográfica do rio Iguaçu, Paraná, Brasil. Qualificação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

- Fernanda Polli Paez. **2019**. Novas espécies de *Aegla* (Crustacea, Anomura) para a bacia hidrográfica do Rio Iguaçu, Paraná, Brasil. Defesa de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

- Herivelto Faustino de Oliveira. **2019**. Dieta e helmintofauna associada ao anuro *Pipa carvalhoi* (Anura: Pipidae) (Miranda Ribeiro, 1937) em duas áreas de Caatinga no Ceará, Brasil. Defesa de mestrado. Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular, Universidade Regional do Cariri.

- Tatiana Motta Tavares. **2020**. Os efeitos da perda do habitat florestal sobre a riqueza de anfíbios. Defesa de doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

- Raiane Lesley Santos Dainesi. **2021**. Contribuições de história natural para a conservação de *Bothrops cotiara* (Gomes, 1913). Defesa de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

- Priscila Frazato da Silva. **2022**. Descrição de juvenis recém-eclodidos, alometria e variações morfológicas de *Aegla jacutinga* (Decapoda, Anomura). Qualificação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

- Priscila Frazato da Silva. **2022**. Descrição de juvenis recém-eclodidos, alometria e variações morfológicas de *Aegla jacutinga* (Decapoda, Anomura). Defesa de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

- Amanda Caroline Dudczak. **2022**. Interaction patterns of anurans as hosts, prey and predators. Defesa de doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Zoologia, Universidade Federal do Paraná.

- Giovanna da Silva Girão Nobre Pitombeira. **2022**. Composição e estrutura comunitária de helmintos endoparasitos de anuros da Caatinga no Sul do Estado do Ceará. Qualificação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular, Universidade Regional do Cariri.

- Giovanna da Silva Girão Nobre Pitombeira. **2022**. Helmintos parasitos de anfíbios (Anura) no Nordeste brasileiro. Defesa de mestrado. Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular, Universidade Regional do Cariri.

- Hellen Mara Brunhane de Oliveira. **2022**. Inventário da Herpetofauna da Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN), Cisalpina, Brasilândia, MS. Qualificação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Qualidade Ambiental, Universidade Federal de Uberlândia.

7) Aulas ministradas

- De 03/08/2020 à 07/08/2020, disciplina “Diversidade de helmintos parasitas de animais silvestres” (2 créditos) pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

8) Coorientações na graduação

- Gabriel Pereira Gomes (2018–2019). Ectocomensais temnocefalídeos (Platyhelminthes) associados a populações de *Aegla* (Crustacea) do Centro-oeste e Norte do Paraná. Iniciação científica (Bolsa – Fundação Araucária). Graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Animal e Vegetal, da Universidade Estadual de Londrina.
- Arlan Kenichi Kodama (2021–2022). Inventário de Temnocefalídeos (Platyhelminthes; Temnocephalida) em crustáceos do gênero *Aegla* na Bacia do Rio Ivaí, Estado do Paraná. Graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Animal e Vegetal, da Universidade Estadual de Londrina.

REFERÊNCIAS

- Allison, V., Ubelaker, J., Webster Jr., R. & Riddle, J. 1972. Preparations of helminths for Scanning Electron Microscopy. *Journal of Parasitology*, 58, 414–416.
- Amato, J.F.R., Boeger, W. & Amato, S.B. 1991. Protocolos para laboratório: coleta e processamento de parasitos de pescado, Seropédica, UFRRJ.
- Berger, L., Skerratt, L.F., Zhu, X., Young, S. & Speare, R. 2009. Severe sparganosis in Australian tree frogs. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(4): 921–929.
- Borteiro, C., Castro, O., Sabalsagaray, M.J., Kolenc, F., Debat, C.M., & Ubilla, M. 2015. Spargana in the Neotropical frog *Hypsiboas pulchellus* (Hylidae) from Uruguay. *North-Western Journal of Zoology*, 11(1): 171-173.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., & Shostak, A.W. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology*, 83(4): 575-583.

- Cavalheiro, A.L. 2018. Florestas ripárias na paisagem agrícola do norte do Paraná, Brasil: relação com a qualidade da água em nascentes. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Londrina.
- Dinelli, E., Lima, A., Albanese, S., Birke, M., Cicchella, D., Giaccio, L., Valera, P. & De Vivo, B. 2012. Comparative study between bottled mineral and tap water in Italy. *Journal of Geochemical Exploration*, 112, 368-389.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.
- Frost, D.R. 2023. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.1 (accessed in February, 2023). Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Hammer, O., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electro* 4, 1–9.
- Lyra, M.L., Haddad, C.F.B. & Azeredo-Espin, A.M.L. 2017. Meeting the challenge of DNA barcoding Neotropical amphibians: polymerase chain reaction optimization and new COI primers. *Molecular Ecology Resources*, 17, 966–980.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp 545.
- Medeiros, H.R. & Torezan, J.M. 2013. Evaluating the ecological integrity of Atlantic Forest remnants by using rapid ecological assessment. *Environ. Monit. Assess.* 185: 4373- 4382.

R Core Team 2023. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Segalla, M.V., Caramaschi, U., Cruz, C.A.G., Garcia, P.C.A., Grant, T., Haddad, C.F.B., Santana, D.J., Toledo, L.F. & Langone, J.A. 2019. Brazilian amphibians: list of species. *Herpetologia Brasileira*, 08 (1), 65–96.

Tabela 1. Características dos seis fragmentos de floresta ripária na região do município de Londrina, Paraná, de acordo com Cavalheiro (2018). AER (Avaliação Ecológica Rápida); Largura (média da faixa de mata, em metros); Integridade (dos fragmentos florestais). PQ1 e PQ2 – fragmentos florestais de uma fazenda do distrito de Paiquerê; MA, RV, BL – fragmentos inseridos em fazendas particulares na zona rural de Londrina; GY – Parque Estadual Mata dos Godoy.

Localidades	Coordenadas	Entorno	AER	Largura (m)	Integridade
PQ1	23°30'59,07"S; 51° 4'58,60"O	Agrícola	0	0	Baixa
PQ2	23°31'4,28"S; 51° 4'29,56"O	Agrícola	1	1	Baixa
MA	23°24'11,00"S; 51°18'31,47"O	Agrícola	17	31	Moderada
RV	23°26'6,21"S; 51°16'21,87"O	Agrícola	16	32	Moderada
BL	23°24'6,84"S; 51°19'29,91"O	Florestal	25	647	Alta
GY	23°27'5,13"S; 51°15'17,81"O	Florestal	35	1284	Alta

Tabela 2. Resultado da análise das variáveis físico-químicas da água amostrada nos seis fragmentos de floresta ripária da região do município de Londrina, Paraná – PQ1 e PQ2 (integridade baixa), MA e RV (integridade moderada) e BL e GY (integridade alta).

Variáveis	PQ1	PQ2	MA	RV	BL	GY
Temperatura (°C)	22,7	22,6	22,1	21,5	21,1	21,9
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	5,61	8,7	7,48	9,6	8,65	7,85
Condutividade elétrica (µS cm ⁻¹)	164	40,6	54,4	29,8	36,1	60,8
Nitrato (mg L ⁻¹)	1,7	0,9	1,4	1,3	0,9	0,9
Fosfato (mg L ⁻¹)	3,1	2,9	2,8	2	2	2,6

Tabela 3. Anuros coletados nos seis fragmentos de floresta ripária da região de Londrina, Paraná (PQ1 e PQ2 – integridade baixa; MA e RV – integridade moderada; BL e GY – integridade alta).

Família	Espécie	PQ1	PQ2	MA	RV	BL	GY	Total
Brachycephalidae	<i>Haddadus binotatus</i>	-	-	-	-	-	1	1
	<i>Ischnocnema henselii</i>	-	-	-	-	6	4	10
Bufonidae	<i>Rhinella diptycha</i>	-	-	-	-	-	1	1
	<i>Rhinella ornata</i>	-	1	4	-	2	-	7
Centrolenidae	<i>Vitreorana uranoscopa</i>	-	-	-	-	-	4	4
	<i>Aplastodiscus perviridis</i>	-	1	7	-	1	2	10
Hylidae	<i>Boana albopunctata</i>	15	7	-	-	-	-	22
	<i>Boana</i> aff. <i>caingua</i>	-	-	-	-	-	3	3
	<i>Boana faber</i>	9	5	-	1	-	-	15
	<i>Boana raniceps</i>	-	-	-	-	-	1	1
	<i>Dendropsophus nanus</i>	13	13	24	-	1	-	51
	<i>Phyllomedusa tetraploidea</i>	-	6	-	-	-	-	6
	<i>Scinax perereca</i>	-	-	3	2	-	-	5
	<i>Scinax</i> sp.	-	1	2	2	-	-	5
	<i>Crossodactylus</i> aff. <i>caramaschii</i>	-	-	-	54	1	11	66
	<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	2	2	-	-	-	-	4
Leptodactylidae	<i>Leptodactylus latrans</i>	-	1	-	-	-	-	1
	<i>Leptodactylus mystacinus</i>	-	-	-	-	-	1	1
	<i>Physalaemus cuvieri</i>	7	2	6	-	1	1	17
	<i>Odontophrynus americanus</i>	-	1	-	-	-	-	1
	<i>Proceratophrys avelinoi</i>	14	8	53	7	3	17	102
Abundância de anfíbios		-	108	165		61		334 indivíduos
Riqueza de anfíbios		-	12 espécies	9 espécies		13 espécies		21 espécies

Tabela 4. Número de espécies de anuros (N espécies) observado, estimadores de riqueza (Chao 1, Jackknife 1, Bootstrap) e índice de Shannon (H') para cada fragmento (BL, GY, MA, RV, PQ1, PQ2) e para todos os anuros coletados nesse estudo (ALL).

Local	N espécies	Chao 1 (SE)	Jackknife 1 (SE)	Bootstrap (SE)	H' observado	H' estimado (SE)
ALL	21	36,24 (15,73)	28,62 (4,53)	24,19 (2,35)	8,92	9,39 (0,65)
BL	7	11,17 (5,17)	10,33 (2,21)	8,55 (1,16)	5,36	8,53 (3,58)
GY	11	23 (12,49)	17 (6)	13,65 (3,29)	6,46	8,15 (1,76)
MA	7	8,5 (2,37)	9 (1,15)	7,96 (0,79)	3,85	3,98 (0,37)
RV	5	8,37 (5,47)	7,25 (1,78)	6,01 (1,12)	1,96	2,04 (0,26)
PQ1	6	6 (0)	6 (0)	6,11 (0,31)	5,29	5,52 (0,36)
PQ2	12	15,37 (3,71)	16,5 (3,06)	14,15 (1,83)	8,14	9,91 (1,36)

Tabela 5. Número de espécies de anuros (N espécies) observado, estimadores de riqueza (Chao 1, Jackknife 1, Bootstrap) e índice de Shannon (H') para cada nível de integridade florestal: alta (GY e BL), média (MA e RV) e baixa (PQ1 e PQ2).

Integridade	N espécies	Chao 1 (SE)	Jackknife 1 (SE)	Bootstrap (SE)	H' observado	H' estimado (SE)
alta	13	16,05 (3,37)	18,14 (3,83)	15,52 (2,49)	7,52	8,86 (1,39)
média	9	9,43 (0,92)	10,71 (1,21)	10,1 (1,14)	4,88	5,01 (0,34)
baixa	12	24,85 (11,68)	17,14 (3,35)	14,04 (1,64)	7,12	7,84 (0,82)

Tabela 6. Índices de similaridades (Jaccard) entre as composições de espécies de anuros de seis fragmentos de florestas ripárias: BL, GY, MA, RV, PQ1 e PQ2.

	BL	GY	MA	RV	PQ1	PQ2
BL		0,1408	0,3016	0,0278	0,0967	0,0586
GY	0,1408		0,0572	0,175	0,0256	0,0282
MA	0,3016	0,0572		0,0316	0,1048	0,113
RV	0,0278	0,175	0,0316		0,0277	0,031
PQ1	0,0967	0,0256	0,1048	0,0277		1
PQ2	0,0586	0,0282	0,113	0,031	1	

Tabela 7. Índices de similaridades (Bray-curtis) entre as composições de espécies de anuros de seis fragmentos de florestas ripárias: BL, GY, MA, RV, PQ1 e PQ2.

	BL	GY	MA	RV	PQ1	PQ2
BL		0,2859	0,1054	0,0269	0,1016	0,0565
GY	0,2859		0,0593	0,0278	0,0573	0,0263
MA	0,1054	0,0593		0,0286	0,1017	0,0847
RV	0,0269	0,0278	0,0286		0,0299	0,0269
PQ1	0,1016	0,0573	0,1017	0,0299		0,827
PQ2	0,0565	0,0263	0,0847	0,0269	0,827	

Tabela 8. Índice de similaridade (Jaccard) entre as composições de espécies de anuros de florestas ripárias com três níveis de integridade (alta, média e baixa).

	Alta	Média	Baixa
Alta		0,1541	0,0016
Média	0,1541		0,0009
baixa	0,0016	0,0009	

Tabela 9. Índice de similaridade (Bray-curtis) entre as composições de espécies de anuros de florestas ripárias com três níveis de integridade (alta, média e baixa).

	Alta	Média	Baixa
Alta		0,057	0,0016
Média	0,057		0,0014
Baixa	0,0016	0,0014	

Tabela 10. Riqueza e abundância de helmintos parasitas associados a 21 espécies de anuros provenientes de seis fragmentos florestais da região de Londrina, Paraná. PQ1 e PQ2 (baixa integridade), MA e RV (integridade moderada) e BL e GY (integridade alta).

Parasitas	BL					GY						MA				RV		PQ1					PQ2												
	<i>Aplastodiscus nerviridis</i>	<i>Dendropsophus nanus</i>	<i>Ischnocnema henselii</i>	<i>Proceratophrys avelinoi</i>	<i>Rhinella ornata</i>	<i>Aplastodiscus perviridis</i>	<i>Boana aff. caingua</i>	<i>Crossodactylus aff. caramaschii</i>	<i>Haddadus binotatus</i>	<i>Ischnocnema henselii</i>	<i>Leptodactylus mystacinus</i>	<i>Physalaemus cuvieri</i>	<i>Proceratophrys avelinoi</i>	<i>Aplastodiscus perviridis</i>	<i>Dendropsophus nanus</i>	<i>Physalaemus cuvieri</i>	<i>Proceratophrys avelinoi</i>	<i>Rhinella ornata</i>	<i>Crossodactylus aff. caramaschii</i>	<i>Proceratophrys avelinoi</i>	<i>Boana albopunctata</i>	<i>Boana fuber</i>	<i>Dendropsophus nanus</i>	<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	<i>Physalaemus cuvieri</i>	<i>Proceratophrys avelinoi</i>	<i>Boana albopunctata</i>	<i>Boana fuber</i>	<i>Dendropsophus nanus</i>	<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	<i>Leptodactylus latrans</i>	<i>Phyllomedusa tetraploidea</i>	<i>Proceratophrys avelinoi</i>	<i>Rhinella ornata</i>	
Acanthocephala																																			
<i>Centrorhynchus</i> sp.*																								6											
Nematoda																																			
<i>Aplectana membranosa</i>				57																															
Cosmocercidae morfo 2									38																										
Cosmocercidae morfo 3	7	15	25			1	32		8	10	1	60	18	26	383	63	5	31			34	48		41		52	1	2			1		20	11	
Pharyngodonidae																						2													
Physalopterinae*		2				1	1					14	2		8		2		2	1			5							4					
<i>Raillietnema</i> sp.															41		15							5		8				298		622			
<i>Raillietnema spectans</i>															3																				

<i>Rhabdias</i> sp1	1																				3 2 6 1 2 1																								
<i>Rhabdias</i> sp2																																													
<i>Schrankiana formosula</i>																					418					78																			
<i>Schrankiana</i> sp.																					1					298																			
Digenea																																													
<i>Creptotrema</i> cf. <i>lynchi</i> *						1																																							
<i>Gorgoderina</i> aff. <i>parvicava</i> *																										3																			
<i>Gorgoderina diaster</i> *																										14																			
<i>Gorgoderina</i> sp1*																															8														
<i>Gorgoderina</i> sp2*																6																													
<i>Gorgoderina</i> sp3*																																				14									
Cestoda																																													
<i>Cylindrotaenia americana</i> *	5															25 3										6										8									
<i>Spirometra</i> sp.*						3 6					3					2					25 1					1										5 1					2				
Oligoqueta																																													
<i>Dero</i> sp.																										3																			
Riqueza por hospedeiro	1	1	2	1	2	2	2	3	1	2	1	1	3	4	1	2	6	2	1	3	3	5	1	6	2	4	1	3	1	6	2	1	2	1											
Abundância	7	5	17	25	58	4	2	39	38	11	10	1	77	33	25	29	441	64	6	47	39	56	6	489	7	62	1	7	8	1183	2	622	34	11											
Riqueza por local	5					6					8					4					12					11																			
Riqueza por nível integridade	9					8					15																																		

Tabela 11. Número de espécies de helmintos (N espécies) observado, estimadores de riqueza (Chao 1, Jackknife 1, Bootstrap) e índice de Shannon (H') para cada nível de integridade florestal: alta (GY e BL), média (MA e RV) e baixa (PQ1 e PQ2), e para todos os helmintos coletados nesse estudo (ALL).

Integridade	N espécies	Chao 1 (SE)	Jackknife 1 (SE)	Bootstrap (SE)	H' observado	H' estimado (SE)
ALL	22	37,04 (12,40)	32,94 (3,85)	26,62 (2,01)	5,44	5,91 (0,62)
alta	9	23,61 (13,18)	14,84 (2,76)	11,19 (1,33)	3,67	4,54 (1,04)
média	8	8,24 (0,72)	8,98 (0,98)	8,63 (0,68)	3,6	3,74 (0,41)
baixa	15	20,90 (6,38)	20,90 (2,78)	17,64 (1,56)	6,59	7,55 (1,01)

Tabela 12. Índice de similaridade (Jaccard) entre as composições de espécies de helmintos associados à anuros de florestas ripárias com três níveis de integridade (alta, média e baixa).

	Alta	Média	Baixa
Alta		0,3502	0,4501
Média	0,3502		0,0075
baixa	0,4501	0,0075	

Tabela 13. Índice de similaridade (Bray-curtis) entre as composições de espécies de helmintos associados à anuros de florestas ripárias com três níveis de integridade (alta, média e baixa).

	Alta	Média	Baixa
Alta		0,0551	0,548
Média	0,0551		0,0006
Baixa	0,548	0,0006	

Tabela 14. Análise de desvios a partir de Modelos Lineares Generalizados Multivariados (MLGM) para comunidades parasitárias de *Procerathoprys avelinoi* de fragmentos florestais com diferentes níveis de integridade. Em cada modelo, o local é a variável preditora para composição de espécies, abundância, riqueza e diversidade de parasitas.

modelos	variável preditora	variável resposta	desvio	valor p
Modelo 1	local	composição de espécies	53,24	0,011 *
Modelo 2	local	abundância	12,24	0,052
Modelo 3	local	riqueza	0,508	0,786
Modelo 4	local	Shannon	4,265	0,001 ***
Modelo 5	local	Brillouin	1,181	0,001 ***

Tabela 15. Análise de desvios a partir de Modelos Lineares Generalizados Multivariados (MLGM) para comunidades parasitárias de *Procerathoprys avelinoi* de fragmentos florestais com diferentes níveis de integridade. Além do local, as variáveis preditoras com interação são: área da bacia de captação, largura da faixa de floresta e pontuação da AER- Avaliação Ecológica Rápida (Modelo integridade florestal); e nitrato, fosfato, oxigênio dissolvido e temperatura (Modelo fatores abióticos). Somente resultados significativos são apresentados.

modelos	variável preditora	variável resposta	desvio	valor <i>p</i>
Modelo integridade florestal	local	composição de espécies	53.24	0.014 *
Modelo fatores abióticos	local	composição de espécies	53.24	0.009 **

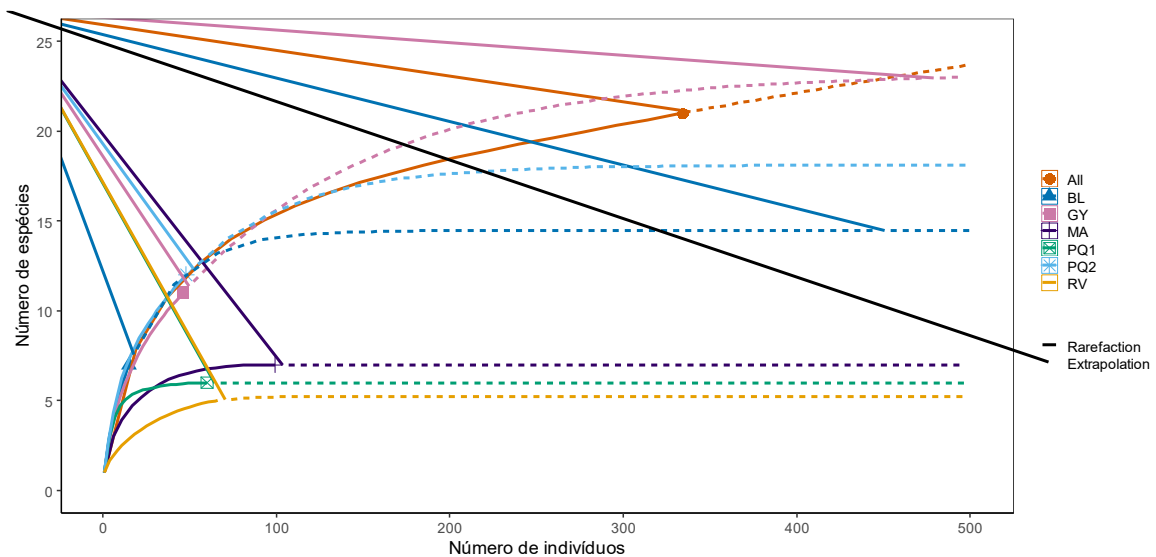


Figura 1. Curva de rarefação com número de espécies de anuros observada (linha contínua) e extrapolada (linha pontilhada) em seis fragmentos (BL, GY, MA, RV, PQ1 e PQ2) de floresta ripária do norte do estado do Paraná, Brasil. “All” (anuros de todos os fragmentos); BL e GY representam anuros de fragmentos com alta integridade florestal, MA e RV com integridade moderada, e PQ1 e PQ2 com baixa integridade.

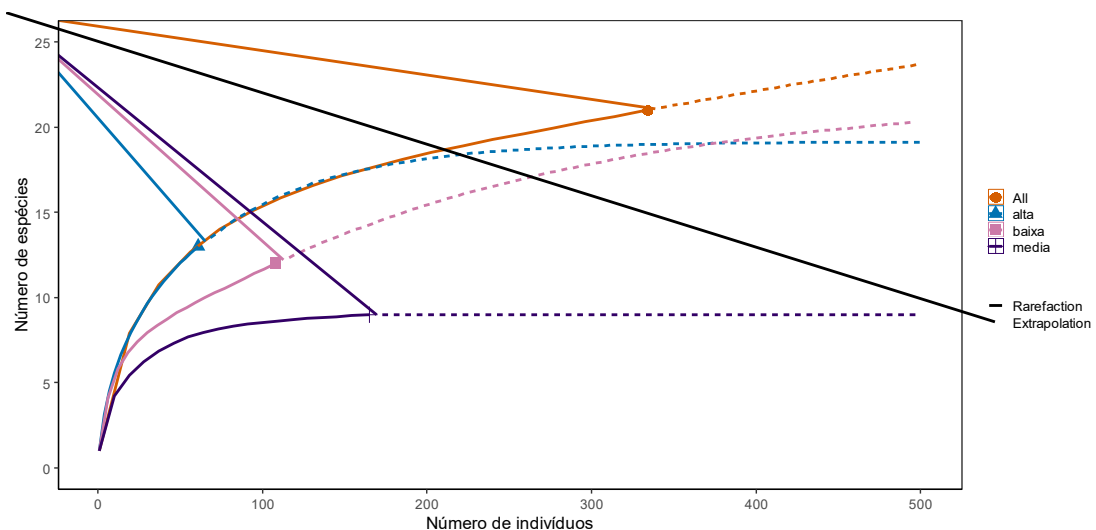


Figura 2. Curva de rarefação com número de espécies de anuros observada (linha contínua) e extrapolada (linha pontilhada) em três níveis de integridade de floresta ripária (alta, média e baixa) no norte do estado do Paraná, Brasil. “All” (todos os anuros coletados nesse estudo).

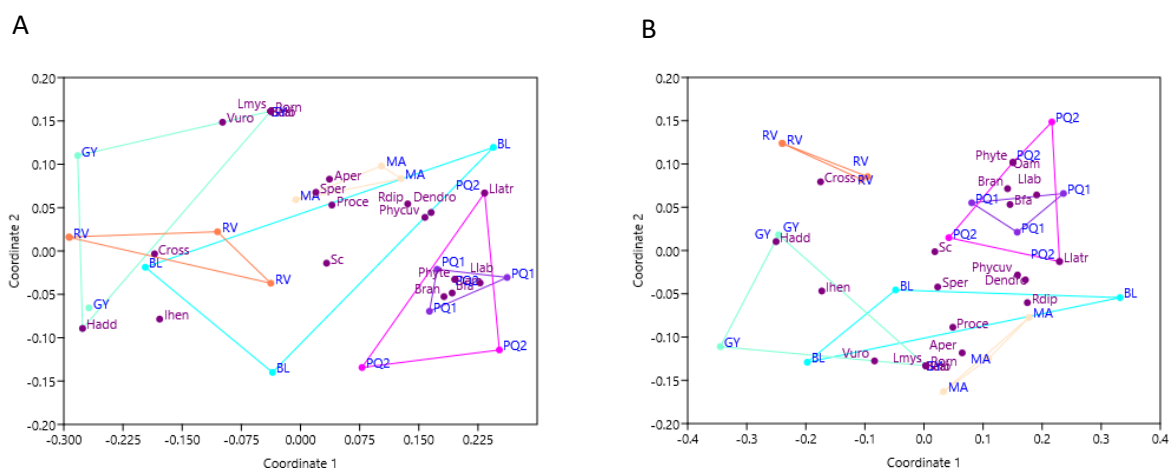


Figura 3. Scatter-plots das análises de escalonamento NMDS (Non-metric Multidimensional Scaling) para a composição de espécies de anuros registrada em seis fragmentos de floresta ripária do norte do Paraná, Brasil, utilizando o índice de Jaccard (A) e o índice de Bray-curtis (B). GY e BL são fragmentos com alta integridade, MA e RV com integridade média, e PQ1 e PQ2 com baixa integridade.

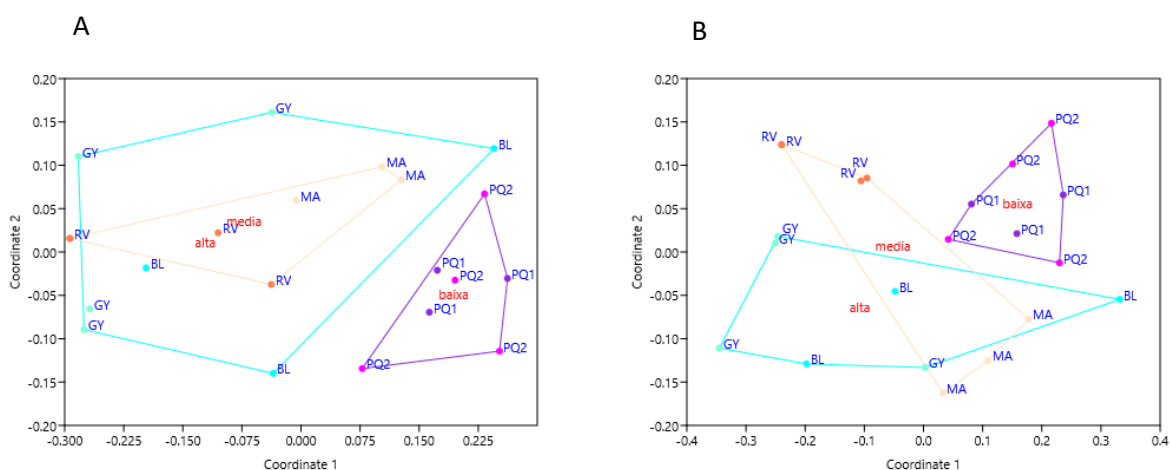


Figura 4. Scatter-plots das análises de escalonamento NMDS (Non-metric Multidimensional Scaling) para a composição de espécies de anuros registrada em três níveis de integridade de florestas ripárias do norte do Paraná, Brasil, utilizando o índice de Jaccard (A) e o índice de Bray-curtis (B). GY e BL são fragmentos com alta integridade, MA e RV com integridade média, e PQ1 e PQ2 com baixa integridade.

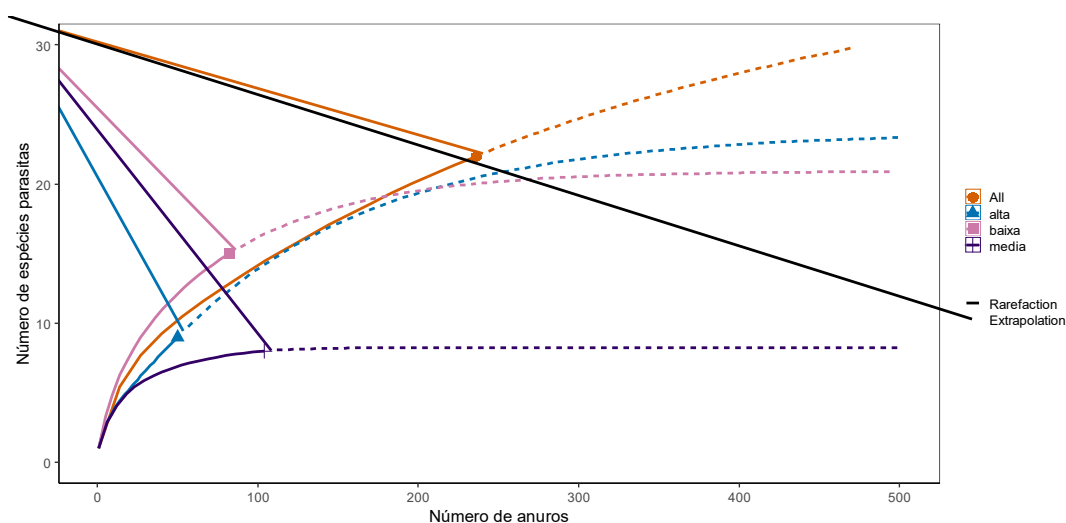


Figura 5. Curva de rarefação com número de espécies de helmintos observado (linha contínua) e extrapolado (linha pontilhada) em anuros de três níveis de integridade de floresta ripária (alta, média e baixa) no norte do estado do Paraná, Brasil. “All” (todos os anuros coletados nesse estudo).

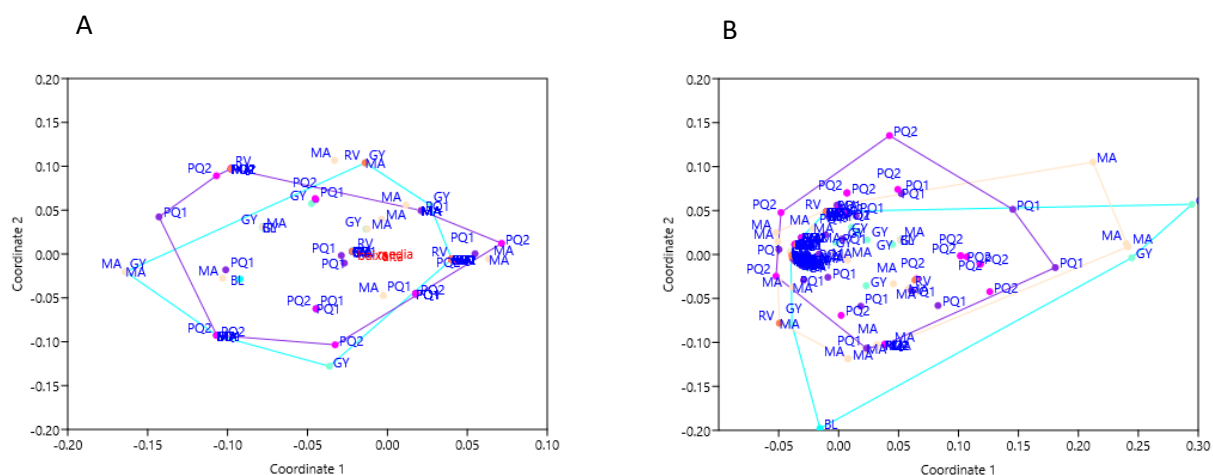


Figura 6. Scatter-plots das análises de escalonamento NMDS (Non-metric Multidimensional Scaling) para a composição de espécies de helmintos de anuros registrada em três níveis de integridade de florestas ripárias do norte do Paraná, Brasil, utilizando o índice de Jaccard (A) e o índice de Bray-curtis (B). GY e BL são fragmentos com alta integridade, MA e RV com integridade média, e PQ1 e PQ2 com baixa integridade.