



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDO SOBRE O CANTO DE ANÚNCIO DO *ADENOMERA* SP. STEINDACHNER,  
1867 (ANURA, LEPTODACTYLIDAE) DE SALVADOR, BAHIA**

Por  
THIAGO FERREIRA PERDIGÃO

Salvador, BA  
2022

**ESTUDO SOBRE O CANTO DE ANUNCIO DO ADENOMERA SP. STEINDACHNER,  
1867 (ANURA, LEPTODACTYLIDAE) DE SALVADOR, BAHIA**

Por  
THIAGO FERREIRA PERDIGÃO

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto de Biologia da  
Universidade Federal da Bahia como exigência  
para obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas

Orientador: Marcelo Felgueiras Napoli

Coorientador: Lucas Rodriguez Forti

Salvador, BA

2022

Data da defesa: 16 de dezembro de 2022

**Banca Examinadora**

---

Profº. Dr. Marcelo Felgueiras Napoli  
Universidade Federal da Bahia - UFBA

---

Msc. Cassio Rachid Meireles de Almeida Simões  
Universidade Federal da Bahia - UFBA

---

Msc. Jamile Santos Nascimento  
Universidade Federal da Bahia - UFBA

## RESUMO

Atualmente a família Leptodactylidae Werner, 1896 (1838) é considerada como sendo uma das mais especiosas da ordem, sendo formada por 233 espécies e quatro gêneros com ocorrência para o Brasil. Desses quatro gêneros é possível destacar a importância de dois deles como sendo os principais responsáveis por abrigar a maior parte da riqueza específica dentro da família, totalizando 113 espécies, sendo 84 espécies reconhecidas para o gênero *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 e 29 espécies reconhecidas para o gênero *Adenomera* Steindachner, 1867. Este fato é responsável por conferir um alto grau de importância aos estudos sobre variações inter e intraespecíficas entre as espécies congênicas no taxon, haja vista que no passado, inúmeras classificações e reclassificações ocorreram dentro do clado (Lynch 1971; Heyer 1975). Como qualificação do principal problema a ser abordado é possível destacar a existência de uma biodiversidade crípica que se encontra associada às espécies do gênero *Adenomera*, tornando esse tipo de similaridade, a exemplo da ausência de características discretas e/ou presença de características altamente diversificadas entre as espécies, um verdadeiro gargalo impeditivo atuando constantemente contra o entendimento taxonômico que se busca, tornando o grupo, um conjunto “caótico” de espécies feneticamente semelhantes e indistinguíveis ao julgamento dos herpetólogos mais experientes. Para análises e comparações mais aprofundadas dos padrões acústicos referente as espécies de *Adenomera thomei*, *Adenomera saci*, *Adenomera hylaedactyla*, *Adenomera martinezi* com a espécie *Adenomera sp.* encontrada nos fragmentos de mata atlântica de Salvador foi proposto duas abordagens distintas para as análises de agrupamento e de análises multivariada que se desenvolveram. Na abordagem que possui o objeto de estudo focado nos padrões acústicos de cada indivíduo amostrado foi possível distinguir os cinco grupos de espécies através do PC1 que apresentou variações importantes, principalmente, na frequência dominante (Hz) e na frequência 5% (Hz) do canto de anúncio. A análise discriminante linear - LDA demonstrou projeções de escores similares ao ACP/PCA sendo o EIXO 1 o de maior poder explicativo para os nossos dados possuindo uma variância total de 59.87%. Os cinco grupos de espécies foram devidamente agrupados nas análises de cluster que levaram em consideração os algoritmos UPGMA e o método WARD, ambos com altos coeficientes de correlação (>0.8). Já na abordagem que possui os cantos de anúncios como objeto de estudo foi calculado a distância euclidiana entre os grupos através do cálculo da distância dos centróides e através do método de agrupamento k-média foi

possível agrupar os dados automaticamente em um total de seis clusters menos dissimilares entre si. Cinco eixos canônicos se demonstraram representativos após correlação linear de Pearson e apresentaram alto valor de correlação sendo o ROOT 1 o de maior autovalor (35.05302) que apresentou variações importantes, principalmente, na frequência dominante (Hz) e na duração do canto (s). Por fim os resultados das análises discriminantes e/ou de dissimilaridade dos cantos de anúncio analisados apontam, através da distância de Mahalanobis, do teste F de Fisher e da variância dos níveis de significância (p-value corrigido por Bonferroni  $< 0.001$ ) que os seis grupos de centróides/clusters gerados acumulam diferenças acústicas significativas e/ou são diferentes estatisticamente entre si, distinguindo, dessa forma as espécies de Salvador das demais espécies.

**Palavras-chaves:** Bioacústica, taxonomia, litoral Norte da Bahia

**ABSTRACT**

Currently, the family Leptodactylidae Werner, 1896 (1838) is considered to be one of the most speciose of the order, comprising 233 species and four genera occurring in Brazil. Of these four genera, it is possible to highlight the importance of two of them as being the main responsible for harboring most of the specific richness within the family, totaling 113 species, with 84 species recognized for the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 and 29 species recognized for the genus *Adenomera* Steindachner, 1867. This fact is responsible for giving a high degree of importance to studies on inter and intraspecific variations between congeneric species in the taxon, given that in the past, numerous classifications and reclassifications occurred within the clade (Lynch 1971; Heyer 1975). As a qualification of the main problem to be addressed, it is possible to highlight the existence of a cryptic biodiversity that is associated with the species of the genus *Adenomera*, making this type of similarity, such as the absence of discrete characteristics and/or the presence of highly diversified characteristics among the species, a true bottleneck constantly acting against the taxonomic understanding that is sought, making the group a "chaotic" set of species that are phenetically similar and indistinguishable in the judgment of the most experienced herpetologists. For further analyzes and comparisons of the acoustic patterns referring to the species of *Adenomera thomei*, *Adenomera saci*, *Adenomera hylaedactyla*, *Adenomera martinezi* with the species *Adenomera* sp. found in fragments of the Atlantic forest of Salvador, two distinct approaches were proposed for the cluster analysis and multivariate analysis that were developed. In the approach that has the object of study focused on the acoustic patterns of each sampled individual, it was possible to distinguish the five groups of species through the PC1 that presented important variations, mainly, in the dominant frequency (Hz) and in the 5% frequency (Hz) of the song of advertisement. The linear discriminant analysis - LDA showed projections of scores similar to the ACP/PCA, with AXIS 1 having the greatest explanatory power for our data, with a total variance of 59.87%. The five species groups were properly grouped in the cluster analysis that took into account the UPGMA algorithms and the WARD method, both with high correlation coefficients (>0.8). In the approach that has the advertisement corners as the object of study, the Euclidean distance between the groups was calculated by calculating the distance of the centroids and through the k-mean grouping method it was possible to automatically group the data into a total of six clusters less dissimilar to each other. Five canonical axes proved to be representative after Pearson's linear correlation and showed a high correlation value, with ROOT 1 having the highest eigenvalue (35.05302)

which showed important variations, mainly in the dominant frequency (Hz) and duration of the song (s). Finally, the results of the discriminant and/or dissimilarity analysis of the analyzed advertisement calls indicate, through the Mahalanobis distance, Fisher's F test and the variance of the significance levels (p-value corrected by bonferroni  $< 0.001$ ) that the six groups of generated centroids/clusters accumulate significant acoustic differences and/or are statistically different from each other, thus distinguishing the species from Salvador from the other species.

**Keywords:** Bioacoustics, taxonomy, North coast of Bahia

**AGRADECIMENTOS**

Reverências a todos os mestres e amigos que tangenciaram a minha existência acadêmica. Sou grato pela minha existência junto a essas pessoas que através de interações dialéticas baseadas no respeito mutuo e humano me “hominizou” cotidianamente conforme os dizeres do nosso reconhecido mestre e patrono. Sou grato pelas instituições públicas do nosso país e em especial a UFBA, IBIO, CNPq e PIBC UFBA pelo apoio e fomento à extensão e pesquisa e ao Instituto Butantan que me permitiram o direito a saúde, a vacina e às condições para a conclusão deste trabalho em meio ao desgoverno que ultrapassamos e vencemos. Em meio a tudo isso, só posso ser grato por me manter de pé, “são, salvo e forte” mas marcado pela certeza que ainda seguimos enlutados e consternados pelas milhares de famílias e brasileiros que infelizmente não conseguiram. De 2022 só guardo o sentimento de gratidão por conhecer pessoas incríveis que passaram no LAB AMPHIBIA. Estes foram os tempos de ouro que operaram mudanças em minha vida, e vou carregar essas lembranças afetivas por todo o sempre, como se fossem belos quadros pintados nos grandes salões de minha memória. Sou grato pela saúde de meus amigos, de minha irmã Larissa, minha amada mãe Rita e amado pai Alfredo que enfrentou e venceu o inesperado bravamente. Esses são meus alicerces e nenhuma teoria posta nessas linhas seria possível sem o amor e o apoio incondicional de vocês. Deixo registrado o meu fraterno agradecimento ao amigo e orientador Marcelo Felgueiras Napoli que durante nosso convívio se tornou um exemplo imaculado de conduta e competência a ser seguido, a Eliane Napoli, sua esposa, sempre atenciosa e gentil com o humano recém escravizado e de primeira viagem pelo seu pet, ao meu mentor intelectual dentro dos parâmetros da bioacústica e querido amigo Cassio Rachid Meireles de Almeida Simões o seresteiro das noitadas carnavalescas e agora etílicas em Quixadá, ao Lucas Rodriguez Forti por permitir o surgimento de um sentimento de amizade repleto de acolhimento, conselhos, escuta, sons compartilhados e pães partilhados. Fazendo jus ao inicio e fim desse processo seria impossível não tecer agradecimentos a minha namorada Alice Mattedi Werneck Silva, pessoa que entrou em minha vida e compartilhou momentos intensos e mágicos dentro dessa amada universidade pela Bahia e por todos nós. Sou incansavelmente grato por ter vivenciado ao lado dela todos esses momentos, repletos de histórias e alegrias desde o por do sol na pedra mais alta de Mucugê. Por fim, muito obrigado a todos e todas e sintam-se fortemente amplexados por mim e por essas palavras.

## **ÍNDICE**



RESUMO	(i)
AGRADECIMENTOS	(ii)
ÍNDICE	(iii)
ÍNDICE DE FIGURAS	(iii)
ÍNDICE DE TABELAS	11
1 INTRODUÇÃO	
2 MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.1 COLETA DE DADOS DIRETOS E INDIRETOS	18
2.2 FORMAÇÃO DE HIPÓTESE E TESTES	23
2.3 BIOACÚSTICA DE ANFÍBIOS ANUROS	28
3 RESULTADOS	32
3.1 A PARTIR DE DADOS ACÚSTICOS INDIRETOS	32
3.2 A PARTIR DE DADOS ACÚSTICOS DIRETOS	40
3.3 A PARTIR DE DADOS ACÚSTICOS DIRETOS (TESTES ESTATÍSTICOS)	45
3.3.1 ABORDAGEM 02 - INDIVÍDUOS COMO OBJETO DE ESTUDO	45
3.3.2 ABORDAGEM 01 - CANTOS COMO OBJETO DE ESTUDO	52
4 DISCUSSÃO	57
5 CONCLUSÃO	66
6 REFERÊNCIAS	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Mapa com a área de estudo.	22
Figura 2	Comparação temporal da área de estudo (Imagem de satélite).	23
Figura 3	Variação altitudinal do gênero <i>Adenomera</i> .	33
Figura 4	Mapa dos registros acústicos publicados sobre as espécies nominais de <i>Adenomera</i> na América do Sul.	34
Figura 5	Comparação entre dados indiretos e diretos sobre a frequência mínima (Hz) das espécies de <i>Adenomera</i> .	35
Figura 6	Comparação entre dados indiretos e diretos sobre a frequência máxima (Hz) das espécies de <i>Adenomera</i> .	36
Figura 7	Comparação entre dados indiretos e diretos sobre a frequência dominante (Hz) das espécies de <i>Adenomera</i> .	36
Figura 8	Comparação entre dados indiretos e diretos sobre a modulação de frequência (Hz) das espécies de <i>Adenomera</i> .	37
Figura 9	Comparação entre dados indiretos e diretos sobre a duração do canto (s) das espécies de <i>Adenomera</i> .	37
Figura 10	Comparação entre dados indiretos e diretos sobre o tempo de subida do canto - CRT (ms) das espécies de <i>Adenomera</i> .	38
Figura 11	Comparação entre dados indiretos e diretos sobre o intervalo entre cantos (s) das espécies de <i>Adenomera</i> .	38
Figura 12	Comparação entre dados indiretos e diretos sobre a taxa de emissão de canto (cps) das espécies de <i>Adenomera</i> .	39
Figura 13	Comparação entre dados indiretos e diretos sobre o número de pulso (nota) das espécies de <i>Adenomera</i> .	39
Figura 14	Sonogramas do canto de anúncio referentes ao holótipo e parátipo do <i>Adenomera thomei</i> do sudeste do Brasil.	41
Figura 15	Sonogramas do canto de anúncio referente ao <i>Adenomera hylaedactya</i> da região norte do Brasil.	42
Figura 16	Sonogramas do canto de anúncio referente ao topótipo do <i>Adenomera martinezi</i> da Serra do Cachimbo.	43
Figura 17	Sonogramas do canto de anúncio referente ao <i>Adenomera saci</i> do centro oeste do Brasil.	44

Figura 18	Sonogramas do canto de anuncio referente ao <i>Adenomera sp.</i> de Salvador e litoral norte da Bahia.	45
Figura 19	Correlação de Pearson dos parâmetros acústicos mensurados do canto de anuncio do <i>Adenomera sp.</i>	46
Figura 20	Projeção 3d dos componentes principais da análise de agrupamento ACP/PCA.	47
Figura 21	Projeção broken-stick da análise de agrupamento ACP/PCA.	47
Figura 22	Projeção dos loadings PC1 do ACP/PCA.	48
Figura 23	Projeção dos loadings PC2 do ACP/PCA.	48
Figura 24	Projeção dos escores PC1 x PC2 do ACP/PCA.	49
Figura 25	Projeção dos escores PC1 x PC3 do ACP/PCA.	49
Figura 26	Projeção dos eixos canônicos Eixo1 x Eixo2 do LDA.	50
Figura 27	Projeção dos eixos canônicos Eixo1 x Eixo3 do LDA.	50
Figura 28	Projeção dos eixos canônicos Eixo1 x Eixo4 do LDA.	51
Figura 29	Análise de cluster da abordagem a partir dos indivíduos com o algoritmo UPGMA.	51
Figura 30	Análise de cluster da abordagem a partir dos indivíduos pelo método WARD.	52
Figura 31	Projeção dos eixos canônicos ROOT1 x ROOT2 do CVA.	53
Figura 32	Projeção dos eixos canônicos ROOT1 x ROOT3 do CVA.	54
Figura 33	Projeção dos eixos canônicos ROOT1xROOT4 do CVA.	54
Figura 34	Projeção dos eixos canônicos ROOT1xROOT5 do CVA.	55
Figura 35	Análise de cluster a partir do método k-média (entidades morfológicas hipotéticas).	55

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Escores dos principais eixos canônicos do CVA.	53
Tabela 2	Valores da análise de dissimilaridade baseada na distância dos centróides/cluster.	56
Tabela 3	Valores da análise de dissimilaridade baseada na variância dos centróides/cluster.	56
Tabela 4	Valores da análise de dissimilaridade baseada no nível de significância dos centróides/cluster.	56



## 1- INTRODUÇÃO

Os anfíbios anuros são considerados como um dos três grupos de vertebrados terrestres mais diversos do planeta. Suas 7.524 espécies podem ser encontradas distribuídas dentro das ordens Anura, Caudata e Gymnophiona, as quais englobam, em conjunto, todas as salamandras, tritões, cecílias, sapos, rãs, pererecas e cobras-cegas conhecidas (Frost, 2022). É sabido que boa parte da fauna mundial de anfíbios está localizada no território brasileiro, sendo registrado atualmente por 1.137 espécies no Brasil, valor esse que corresponde a aproximadamente 13% de toda fauna mundial de anfíbios (Segalla *et al.*, 2019). Não distante dessa realidade, o gênero *Adenomera* Steindachner, 1867 ainda é subestimado, sendo suspeito de abrigar um número maior de espécies que o número atual reconhecido para o gênero. Haja vista que dados sobre os remanescentes da floresta atlântica mais ao norte da Bahia ainda não foram devidamente levantados, gerando com isso uma lacuna de conhecimento importante que deve ser resolvida para o entendimento do clado *Thomei* (*sensu* Fouquet *et al.*, 2014) e da relação de parentescos entre os clados *Hylaedactyla*, *Martinezi* e *Saci*.

Para a floresta atlântica Heyer (1973) havia reportado apenas a existência de duas espécies de *Adenomera*. Devido os trabalhos de Kewt & Angulo (2002) e Kwet (2007) se sabe que essas duas espécies são na verdade um complexo de espécies para esse bioma que provavelmente surgiu a partir de diversificações recentes, inclusive já descritas para outras espécies de anuros, a exemplo do antigo grupo denominado como *Hypsiboas pulchellus*, atualmente reconhecido por membros do gênero *Boana* Gray, 1825 (Kwet, 2004, 2008). Na época Kwet *et al.*, (2007) considerou que o gênero *Adenomera* era considerado como sendo um taxon válido que possuía ao menos seis espécies distribuídas pelos domínios de mata atlântica a exemplo do *Adenomera ajurauna* (Berneck, Costa, and Garcia, 2008), *Adenomera araucaria* Kwet and Angulo, 2002, *Adenomera bokermanni* (Heyer, 1973), *Adenomera marmorata* Steindachner, 1867, *Adenomera nana* (Müller, 1922) e o *Adenomera thomei* (Almeida and Angulo, 2006).

Segundo Streicher *et al.*, (2020) as primeiras descrições de espécies de anfíbios ocorreram através da aplicação do método taxonômico previsto no *Systema Naturæ* (Linnaeus, 1758) que com o tempo protagonizou posição de destaque frente as inúmeras descrições de espécies de anfíbios anuros no globo. Sendo assim, a taxonomia moderna vem,

atualmente, dialogando diretamente com outras áreas do conhecimento, utilizando uma maior variedade de disciplinas, evidências e integrando a construção de hipóteses filogenéticas baseada em dados genéticos, citogenéticos e fenéticos. Ademais, grande parte dos estudos taxonômicos publicados nos últimos dez anos usam em suas comparações taxonômicas e delimitações de espécies, dados sobre as variações da morfologia externa dos animais. Das 732 publicações levantadas por Streicher e Loader (2020), 46% das espécies de anfíbios anuros descritas na literatura especializada ocorreram entre os anos de 2015-2019 e puderam contar com o auxílio do conjunto de dados e inferências provenientes de análises fenéticas alimentadas por bases de dados que possuíam dados acústicos (Streicher *et al.*, 2020).

O interesse demonstrado pelos estudos focados nos sinais acústicos emitidos pelos anuros não é recente dentro da comunidade científica, sendo objeto de estudo de grandes nomes naturalistas como Carolus Linnaeus (1758) e Charles Darwin (1871). Dessa forma a bioacústica é uma disciplina que consiste no estudo dos sons e atualmente vem demonstrando ser uma excelente ferramenta transdisciplinar de pesquisa aplicada em diversos estudos (Vielliard, 2010). Seu amplo espectro de aplicação acaba contemplando estudos em diferente taxa e ecossistemas, sendo capaz de contemplar grupos como os Synapsida, Arthropoda, Sauropsida, Archosauria e principalmente dos Lissamphibia (Vielliard, 2004).

Atualmente as observações acústicas somam-se com inferências e interpretações biológicas mais complexas, e os sinais acústicos emitidos pelos anuros, independentemente de sua função social e biológica, são perfeitamente utilizados no desenvolvimento de hipóteses filogenéticas sendo aproveitada aos estudos que estão fundamentados em evidências geradas a partir de abordagens mais tradicionais da taxonomia alfa. Dessa forma a bioacústica, aqui utilizada como a principal ferramenta geradora de evidência, se torna extremamente importante não só para o entendimento e classificações futuras a nível de espécies dentro do grupo Thomei mas também, para a construção de conhecimentos zoológicos mais completos e que sejam capazes de fornecer novas informações sobre lacunas no conhecimento da história natural e da ecologia reprodutiva das espécies dentro e entre os clados mais próximos.

A pretensão de conhecer e registrar todas as espécies residentes em um determinado bioma pode de imediato aparentar ser uma grande batalha perdida. Ainda mais se o bioma em questão encontra-se sob pressões antropogênicas constantes e históricas como é o caso da mata atlântica, bioma onde se encontra distribuída endemicamente as populações do *A. thomei*. Ciente das dificuldades reais de se completar a contento essa nobre tarefa amostral podemos ser levados a acreditar que apenas aumentar o esforço amostral, focando as buscas em grupos de tatrápodes como os anfíbios anuros resolveria o problema prático dos biólogos mas infelizmente o trabalho vem se demonstrando hercúleo e colossal pois muitas espécies de anuros ainda são desconhecidas e nem 10% da biodiversidade mundial é devidamente conhecida quíça sua variabilidade fenotípica.

Somando-se a isso, a grande biodiversidade da mata atlântica se encontra associada a altos graus de endemismo, fazendo desse bioma um verdadeiro *hotspot* na América do Sul que deve ser melhor estudado. Essa especificidade torna, com isso, os trabalhos de descrições e classificações uma verdadeira corrida contra o tempo, contra a perda de habitats, contra o surgimento de doenças e contra, principalmente, os processos de extinções locais que vem afligindo os anuros localmente e em escala global. Em termos gerais os anfíbios anuros são capazes de formar uma superclasse extremamente especiosa que abriga verdadeiros complexos de biodiversidade e de espécies crípticas responsáveis por tornar essa incrível odisseia pelo conhecimento taxonômico dos anuros em um verdadeiro desafio a todos os herpetólogos.

Estudar os anuros sobre uma perspectiva acústica é gratificante e trabalhoso pois essa característica fenética em questão surge logo cedo dentro do próprio grupo, fazendo dos fenômenos de vocalizações verdadeiros sinais honestos e conservados para o grupo. Essa característica se encontra intrinsecamente relacionada aos caminhos evolutivos do sistema de comunicação desses tatrápodes, legitimando, com isso, o uso de forma ampla e prática da bioacústica como ferramenta no estudo e entendimento dessa gigantesca biodiversidade associada ao grupo. Vale ressaltar que a utilização e integração de dados acústicos vem se demonstrando decisivos em situações que envolvem a necessidade de delimitações mais precisas de complexo de espécies crípticas como pudemos estudar nesse presente trabalho. E sub-estimar ou super-estimar a existência de espécies em determinados ambientes trazem consequências graves que reverberam diretamente no



estabelecimento e na eficiência de políticas de conservação das espécies além de influenciar na implementação de políticas ambientais pelos tomadores de decisões nos órgãos de fomento e ambientais. Sendo assim, um dos caminhos possíveis e utilizados para mitigar essa real limitação reside na aplicação integrada e transdisciplinar dos conhecimentos, técnicas e ferramentas disponíveis que sejam capazes de englobar dados genéticos, fenéticos, biogeográficos e de história natural que possam atuar de forma transdisciplinar sobre a resolução de problemas taxonômicos e na delimitação precisa entre as espécies.

Assim o reconhecimento da notória biodiversidade acústica e morfológica associadas a Família Leptodactylidae Werner, 1896 (1838) acaba qualificando este taxon como sendo um excelente indicador para estudos de fenômenos macroevolutivos e evolutivos que respaldam o surgimento e consolidação do sistema de comunicação acústica dentro da Ordem Anura, especificamente para o gênero *Adenomera*. O Dr. Thiago Ribeiro de Carvalho Tavares em sua tese de doutorado intitulada por “*Evolução do canto de anúncio nos gêneros Adenomera e Leptodactylus (Anura, Leptodactylidae, Leptodactylinae), com aplicação taxonômica a populações e espécies de Leptodactylinae*” aponta como tendências evolutivas importantes a serem investigadas a história evolutiva das estruturas pulsionadas dentro do sistema de comunicação e dos deslocamentos de energia relativos a frequência fundamental entre as bandas de frequência identificadas nos cantos de algumas espécies dentro do gênero (Carvalho, 2017).

Ambos os fenômenos demonstram-se esvaziados de quaisquer correlação aparente com os componentes abióticos, ambientes e/ou até mesmo com o tamanho/volume corporal desses animais. E sobre esses fenômenos cabe uma linha de raciocínio bastante plausível que traz para o foco das análises, questões relacionadas aos contexto sociais das emissões desses sinais acústicos pelos anuros, uma vez que interações sociais reprodutivas podem explicar alterações nas faixas de frequência e interações agonísticas inter-específicas são capazes de moldar e selecionar evolutivamente de forma rápida os sistemas de comunicação entre espécies diretamente competidoras. Todas essas são explicações possíveis que poderiam gerar respostas evolutivas contra a predação, aumentando, com isso o valor adaptativo da espécie, selecionando até mesmo respostas direcionadas que influenciem positivamente o fitness das espécies ou até mesmo sinais acústicos ilegítimos entre emissores e receptores, o que seria um contrassenso e/ou

exceção a teoria evolutiva da comunicação aplicada aos anfíbios anuros que se encontra fundamentada nas emissões de sinais acústicos legítimos e capazes de informar com exatidão características intrínsecas referente aos machos vocalizantes.

O sucesso evolutivo somado as ricas variações acústicas associadas ao taxon Leptodactylidae Werner, 1896 (1838) fez desta, uma das família mais especiosa da ordem. Este clado é atualmente formado por 233 espécies de anfíbios anuros os quais foram capazes de colonizar toda região neotropical nas Américas. Apesar de no passado, devido a inúmeras classificações e reclassificações esse grupo ter sido considerado como sendo parafilético (Lynch 1971; Heyer 1975), atualmente suas relações de parentescos se encontram bem estruturadas, estando o seu monofiletismo resguardado (Frost et al 2006). Dessa forma é salutar prestar atenção para a riqueza desse taxon que pode ser evidenciada nas quantidade de espécies abrigadas principalmente pelos gêneros Leptodactylus Fitzinger, 1826 com 84 espécies e pelo gênero Adenomera Steindachner, 1867 com 29 espécies (Frost, 2022). Atualmente o gênero Adenomera é composto por 29 espécies validas que se distribuem pelos territórios abertos e florestais da América do Sul, ocupando, com isso, ampla distribuição longitudinal no continente podendo chegar até regiões andinas mais ao leste (Frost, 2022). Vale ressaltar que o grupo foi agrupado dentro de Leptodactylus pela primeira vez pelo professor Adolpho Lutz (1930).

A subespécie proposta na época pelo professor Lutz nomeada por *L. (Parvulus) trivittatus* (Lutz, 1926) foi classificada atualmente como sinonímia júnior do *L. (Parvulus) nanus* e da espécie *Adenomera marmorata* Steindachner, 1867 descrita por Heyer (1973) a partir do holótipo NHMW 16453. Os desdobramentos taxonômicos foram inúmeros e um dos mais importantes diz respeito ao principio da prioridade exposto pelo código internacional da nomenclatura zoológica - ICZN de 1898 invocado pelo Parker (1932) em favor da prioridade do nome Adenomera como sendo um subgênero de Leptodactylus ao invés de Parvulus. Subsequentemente às decisão taxonômica provocadas por Parker (1932) fizeram com que o gênero Adenomera fosse então realocado dentro do grupo *Leptodactylus marmoratus* por Heyer (1969a), que também foi responsável por incluir, a posteriori, outras espécies ao grupo como o *L. andreae*; *L. bokermanni*; *L. hylaedactylus* e *L. martinezi*. O mesmo autor foi o responsável por elevar o já conhecido subgênero Adenomera ao ranking de gênero em 1974, tornando-o grupo irmão das demais especies de Leptodactylus reconhecidas até os dias atuais.

Essas espécies possuem sinapomorfias importantes em seus sistemas reprodutivos e podem ser reconhecidas por apresentar postura de ovos em ninhos de espuma que no caso dos *Adenomera* são alocados em câmaras subterrâneas esféricas construídas por indivíduos machos. E no caso do *A. thomei* o modo reprodutivo (*sensu* Haddad *et al.*, 2013) é considerado como sendo o MR número 32, em que os seus girinos endotróficos acabam completando o desenvolvimento larval exatamente dentro do próprio ninho de espuma secretado no interior da toca que se encontra sob o solo e a serapilheira. Na literatura esse tipo de informação é conflitante, necessitando de estudos mais aprofundados sobre a história natural da espécie uma vez que trabalhos mais atuais passaram a relatar um modo reprodutivo diferente para a espécie, assumindo, com isso que o desenvolvimento larval dos girinos exotróficos se completariam em ambientes aquáticos como está previsto no MR de número 31.

Mesmo com todo conhecimento fenético e de história natural gerados sobre o grupo é possível identificar lacunas no conhecimento que acabam tornando impeditivo as análises mais precisas pois um dos grandes gargalos identificados e que responde por obscurecer o entendimento taxonômico dentro do gênero, reside na existência de uma alta similaridade inter e intra-específica. Essa similaridade se torna flagrante quando se observa o cariótipo das espécies dentro do clado Thomei e entre as espécies cogênicas (Dominato *et al.*, 2022). A ausência de dados moleculares, morfológicos e acústicos concatenados dentro do grupo e de grupos próximos, acabam contribuindo na geração de hipóteses filogenéticas com pouco poder de resolução, principalmente quando se trata de complexos de espécies crípticas que podem ocorrer simpatricamente e até mesmo sintopicamente.

Dessa forma ao analisarmos as filogenias disponíveis é possível perceber que o clado Thomei, é de fato um desses complexos de espécies que necessitam ser estudados com maior profundidade e com maior número de informações possíveis que incluam nessas análises dados diretos e de origem acústica. É sabido que o grupo foco desse trabalho é formado pela espécie nominal *Adenomera thomei* (Almeida e Angulo, 2006), descrita a partir de indivíduos coletados em plantação de Cacaú localizada próximo ao município de Linhares, estado do Espírito Santo além de existir mais duas linhagens candidatas a espécies dentro do clado denominadas por *Adenomera sp. L* e *Adenomera sp. M*, (*sensu* Fouquet *et al.*, 2014), ambas com ocorrência para o sul da Bahia.

Sendo assim é importante evidenciar que o trabalho de Fouquet *et al.*, (2013) apesar de recuperar inicialmente as espécies com ocorrência para a mata atlântica como sendo espécies monofiléticas não conseguiu replicar esses resultados em análises mais completas que levaram em consideração outras bases de dados incluindo dados genéticas e dados acústicos indiretos. Em seu trabalho, subsequente ao ano de 2013, a sustentabilidade do monofiletismo apresentado para as espécies de mata atlântica não se sustenta, demonstrando, com isso, sobreposições entre os Clados Martinezi e *Hylaedactyla* muito por conta de populações de *Adenomera hylaedactyla* que possuem ocorrência nas regiões mais setentrionais da região nordeste. A ausência de estudos de base assim como, a inexistência de dados acústicos diretos e associados aos padrões morfológicos do clado Thomei é notoriamente contrastante com a sua aparente biomassa demonstrada nos ambientes antropizados uma vez que essa espécie possui uma grande abundância e ocorrência nas áreas de bordas de fragmentos florestais e de mata atlântica dentro de perímetros urbanos, tornando, com isso, o entendimento taxonômico realmente menos preciso e bastante confuso sem necessidade.

Estimar parentescos em complexos de espécies crípticas é uma realidade dentro do gênero *Adenomera* e essas distâncias são de fato bastante tênues mas, ainda assim, detectável a métodos genéticos que levam em consideração caracteres mais gerais. Em trabalhos citogenéticos recentes foi possível demonstrar os padrões morfológicos dos pares de cromossomos do clado Thomei e suas relações de similaridade dentro e entre os grupos com base na cariotipagem de células somáticas do sistema digestivo da espécie. O estudo do cariótipo do clado Thomei mostrou uma forte contribuição no agrupamento entre as populações ao sul da Bahia mas, ainda assim, incapaz de agrupar a contento os espécimes dentro da espécie nominal (Dominato *et al.*, 2022). Vale ressaltar que em estudos citogenéticos anteriores feitos por Campos *et al.*, (2009) as diferenças entre os cromossomos das espécies de *Adenomera thomei* e *Adenomera hylaedactyla* já haviam sido demonstradas e as diferenças no tamanho do telômero cromossômico possivelmente podem estar associadas a características homólogas entre essas espécies. Nesse cenário, é salutar destacar que além das análises acústicas feitas nesse presente trabalho se faz necessário o estudo da cariotipagem das espécies encontradas na mata atlântica do litoral norte da Bahia que se encontram distribuídas acima da bacia do Paraguaçu para efeito de

padronização das comparações com os padrões cromossômicos já levantados pelos demais autores.

Certamente a falta de resolução que aqui está sendo exposta pode ser resolvida com a integração de dados de diferentes fontes e disciplinas incluindo dados acústicos diretos devido a sua forte correlação com a identificação de espécie e seu desempenho no reconhecimento espécie-específico na natureza, respondendo como importante mecanismo dentro do sistema de comunicação e de seleção sexual dos anfíbios anuros que é amplamente reconhecido pela comunidade científica. É na tentativa de contribuir propositivamente com todo esse cenário confuso que carece de maior entendimento taxonômico e de hipóteses filogenéticas mais precisas para o grupo que este presente trabalho se propôs a analisar padrões acústicos gerais associados ao canto de anúncio das espécies dos clados Thomei, Martinezi, Saci e *Hylaedactyla* a partir de dados originados das localidades-tipo e localidades próximas que são exclusivamente relacionados às espécies nominais que foram formalmente descritas, descartando, com isso, dados oriundos de linhagens para efeito de comparação com as população amostradas para os fragmento de mata atlântica do litoral norte baiano. Aqui foi possível atentar para a importância da coleta e análise de dados acústicos diretos e associados a indivíduos vouchers e/ou testemunhos que foram devidamente depositados na coleção húmida do Museu de História Natural da Bahia - MHNBA assim como na curadoria de seus respectivos cantos que foram devidamente depositados na fonoteca do laboratório AMPHIBIA.

## **2- MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta de dados diretos e indiretos.**

Para a construção do embasamento teórico essencial às comparações acústicas foram feitas buscas em bibliografias especializadas no ano de 2021. Esses levantamentos de dados indiretos aconteceram através dos indexadores e sistemas de busca do *google scholar*, plataforma *scopus* via portal de periódicos da Capes além de buscas diretas sobre a base de dados disponibilizada no site <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/> do *American Museum of Natural History* que reúne informações acuradas sobre as espécies e os históricos das decisões taxonômicas mais atualizados, o que incluem informações

sobre os status das espécies assim como a disponibilidade da lista de sinonimias júnior relacionadas às espécies nominais.

Para as buscas dos artigos de descrição dos cantos de anúncio e/ou que possuíam dados acústicos em suas análises foram aplicados o mesmo modelo de booleana [“nomenclatura binominal” AND “gênero” AND “call description” AND (“advertising call” OR call)] onde apenas o nome do gênero e da espécie foram trocados para cada rotina de buscas sobre as 29 espécies contidas dentro do gênero *Adenomera*. Os resultados foram obtidos e sistematizados manualmente dentro do programa *EndNote*, sendo excluídos da pesquisa os trabalhos não publicados, *preprints* e literatura cinza. Já para as buscas destinadas para a obtenção de informações acústicas mais detalhadas sobre as espécies foco foi empregada a técnica do “*snowball sampling*” nos artigos que já haviam sido levantados e para essas espécies foram considerados os trabalhos não publicados.

O acesso aos dados diretos das espécies de *Adenomera* que foram incorporados às análises acústicas e testes estatísticos obtidos nesse trabalho aconteceram mediante solicitação direta das vocalizações e envio por *e-mails* para os próprios autores responsáveis pelos trabalhos de descrições e redescrições dos cantos de anúncio e espécies nominais. Também foi possível gerar dados acústicos diretos a partir de gravações acústicas *in loco* feitas exatamente nos sítios de vocalizações das populações estudadas em Salvador nos anos de 2019, 2021 e 2022. As quais ocorreram dentro do período reprodutivo da espécie, momento esse em que os indivíduos se encontravam vocalmente ativos nos ambientes. O período de coleta ocorreu principalmente nas estações chuvosas onde os picos de atividades acústicas e atividade de coro ocorriam com maior frequência a partir do mês de junho, diminuindo com o fim do período chuvoso em Salvador.

As gravações dos espécimes levantados para Salvador sempre ocorriam no final da tarde e início da noite e se estendiam aproximadamente até as 21:00 horas pois a atividade acústica demonstrada geralmente não ultrapassavam às 0:00 horas com exceção dos dias chuvosos e frios. Como os indivíduos apresentam um comportamento crepuscular e criptozóico a identificação dos sítios de vocalizações em campo aconteciam após o estabelecimento de pontos de escutas e triangulação do sinal acústico os quais eram emitidos pelos próprios machos vocalizantes no local de coleta. A partir desse ponto as gravações ocorriam respeitando o protocolo que padronizava as gravações em 1.5 m de

distância da fonte de origem e/ou emissora de sinal acústico. As gravações feitas variaram entre 3:00-5:00 minutos de duração e todas ocorreram em uma mesma variação de humidade e de temperatura mensuradas no momento das gravações a partir de um termo-higrômetro (Schneider & Sinsch, 2007).

Para alcançar níveis ótimos e estáveis na qualidade sonora capturada *in loco* foram respeitadas normas técnicas que prezam pela utilização de sistemas de captura de som com certo nível de qualidade e/ou que não distorçam os sinais acústicos que estão sendo capturados. Para isso as gravações foram feitas a partir do gravador digital da *Marantz*, modelo PMD 601 acoplado a um microfone unidirecional *Sennheiser (shotgun)*, modelo ME66/k6 de ampla resposta entre as faixas de frequência do espectro audível do som e do próprio sistema de comunicação dos anfíbios anuros que evolutivamente foi estabelecido no espectro de frequência dos 40Hz à 20.000Hz. Todas as gravações foram feitas no gravador digital que produziu arquivos de som no formato WAV não comprimido e/ou não compactados com resolução de 24 bits em uma taxa de amostragem de 44.100Hz. Após as etapas de gravações os arquivos digitais passaram pelo processos de equalização e normalização do som dentro do programa Audacity (Audacity Team, 2022). E para o uso e interpretação dos espectogramas gerados a partir do programa Raven Pro 1.5.0.

#### *Tomada de dados diretos e área de estudo*

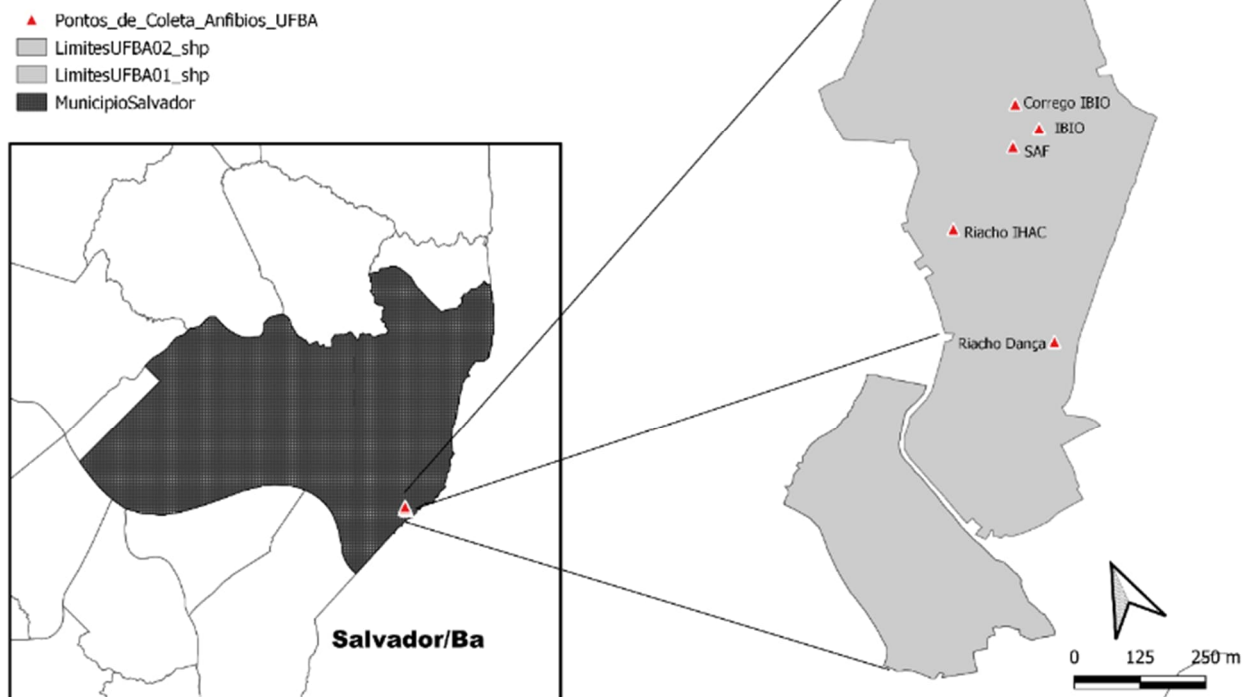
Os espécimes analisados acusticamente podem ser diagnosticados através de caracteres fenotípicos tradicionalmente utilizados nas diagnoses entre as diferentes espécies conhecidas de *Adenomera sensu* Heyer (1973). Características relacionadas ao tamanho corporal, padrões de coloração e textura assim como estruturas específicas foram prontamente reconhecidas nas sub-populações levantadas em Salvador e foram: **i.** dorso com padrão de coloração marmoreado contendo manchas escuras; **ii.** presença de faixa longitudinal e linha medial dorsal se estendendo até a região da cloaca; **iii.** dorso e flancos apresentando tubérculos; **iv.** região externa dos membros anteriores e posteriores contendo manchas escuras; **v.** região interna dos braços imaculada e face interna da coxas contendo fracos padrões creme reticulado; **vi.** focinho elíptico em vista dorsal; **vii.** ventre e gula imaculados; **viii.** glândulas ectopeitoral próximas a região axilar não entumecidas ainda necessitando de corte histológico para confirmação; **ix.** extremidades dos artelhos não expandida. E como diagnose morfológica específica direcionada a identificação de

espécies do clado Thomei (*sensu* Fouquet *et al.*, 2014) as características **x.** mancha interorbital e triangular formando padrão de máscara que se estende a partir da região cefálica a região mediodorsal formando figura similar a uma ampulheta devido o encontro com as demais manchas espalhadas no corpo do animal; **xi.** mancha clara sobre a máscara orbital simulando o formato semelhante a um coração (característica apresenta variação de formas podem ser cordiformes à circulares); **xii.** estrutura do canto pulsionado sendo esta a única espécie do clado mata atlântica a apresentar esse tipo de estruturação em seu sinal acústico de comunicação.

Os espécimes analisados se encontravam distribuídos em áreas historicamente antropizadas que já haviam sido visitadas pelas equipes do laboratório AMPHIBIA e que se encontram sob pressões antropogênica constantes oriundas das comunidades humanas em seu entorno (Mapa 01 e 02). As áreas de estudo ocorreram nos fragmentos de mata atlântica supracitados, localizados no Estado da Bahia, município do Salvador, e tiveram pontos amostrais formados por uma serie histórica de 3 anos de registros que foram não consecutivos ao longo de quatro anos de amostragem. Com isso a primeira serie de registros acústicos foram feitos no ano de 2019 próximo a uma nascente de água em uma área de mata antropizada localizada ao lado do Instituto de Biologia da UFBA - IBIO (Lat -13.000846000504 Long -38.508405); o segunda serie de registros acústico ocorreram no ano de 2021 em uma área de encosta localizada às margens da Avenida Anita Garibaldi (Lat -12.992280000504 Long -38.507692) a terceira e quarta serie de registros acústicos ocorreram no ano de 2022 em acumulo de serapilheira que se depositavam na frente do Instituto de Biologia - IBIO (Lat -13.00144928061329 Long -38.50839178599707) assim como às margens do fragmento de mata atlântica antropizada localizada próximo a Escola de Dança da UFBA (Lat -13.004500000504 Long -38.5097777777778). por onde passa um córrego de água que faz conexões entre as áreas visitadas e coletadas conforme pode ser visto na Figura 1.



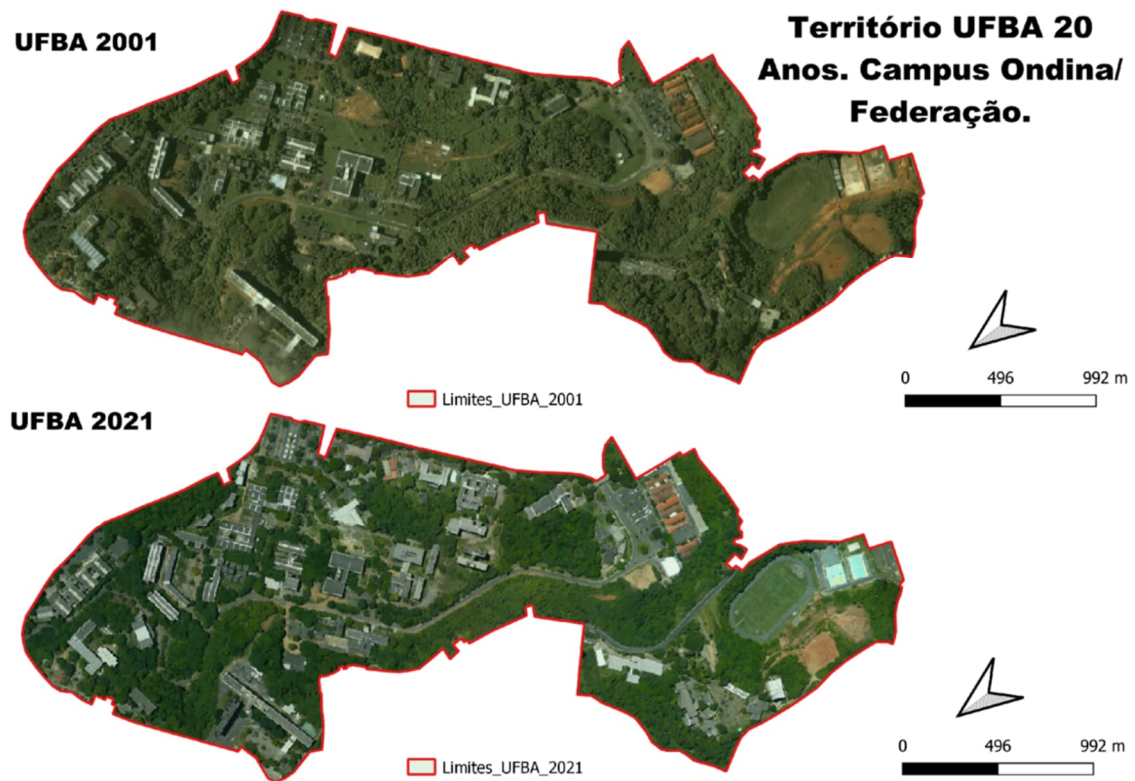
## PONTOS HISTORICAMENTE LEVANTADOS PARA OS ANFIBIOS ANUROS DA UFBA.



**Figura 1** – Registros dos pontos amostrados no campus Ondina/Federação - UFBA.

Todos os pontos da serie histórica ocorreram dentro do perímetro urbano do município do Salvador os quais foram amostrados nos bairros do Garcia e da Ondina. Ambas as localidades apresentaram ambientes naturais com desníveis topográficos acentuados e estão sob a mesma influência climática, apresentando verões chuvosos e invernos secos segundo a classificação tipológica de Köppen (AW). Nessa classificação os meses que apresentam maiores precipitações e menores temperaturas estão exatamente entre os meses de março à agosto o que pode ser comprovado no ano de 2022 pois esses foram os meses que apresentaram as menores variações de temperatura (23-26 °C) e as maiores variações de precipitação anual da chuva (101-180 mm). A predominância da cobertura vegetal encontrada em todos os pontos amostrados é a de Floresta Atlântica Ombrófila Densa *sensu* AB'Sáber (1977). Em que a maioria das áreas estudadas apresentam formações florestais com o aparecimento de dósseis mas que, infelizmente, se encontram fragmentados na escala de paisagem devido as ações antropogênicas históricas associadas a esses territórios que passaram por fortes processos de urbanização que converteram os acentuados aclives e declives naturais do interior das matas em verdadeiras pirambeiras expostas pela cidade. Atualmente a matriz de paisagem é formada

basicamente por remanescentes de mata atlântica que se encontram sob os efeitos de borda, estando essas áreas em diferentes estágios de degradação e regeneração.



**Figura 2** – Evolução de áreas matriciais e de manchas florestais encontradas no campus da UFBA Ondina/Federação.

## 2.2 Formação de hipóteses e testes

*Hipótese de pesquisa.* Neste trabalho pretende-se testar se as espécies nominais *Adenomera hylaedactyla* (Cope, 1868), *Adenomera martinezi* (Bokermann, 1956), *Adenomera saci* Carvalho and Giaretta, 2013, *Adenomera thomei* (Almeida and Angulo) e *Adenomera sp.* são acústicamente diagnosticáveis e, portanto, se a bioacústica seria uma linha de evidência capaz de diferenciar a população do Salvador das demais espécies.

*Síntese do problema.* O gênero *Adenomera* Steindachner, 1867 atualmente é formado por 29 espécies válidas e apesar da existência de amplos trabalhos de revisões taxonômicas feitos dentro do gênero é possível notar que ainda assim existem grandes lacunas referente ao comportamento acústico dessas espécies que infelizmente não vem acompanhando os avanços filogenéticos que se sucederam ao longo dos tempos. É

possível notar que a grande maioria dos cantos de anúncio, referente as espécies nominais, para o gênero já são conhecidos pela comunidade científica e, portanto, se encontram sumariamente descritos nos artigos de descrições dos cantos de anúncio para essas espécies. Todavia, a disponibilidade de dados acústicos diretos e associados a vouchers dentro das coleções zoológicas ainda são muito pequenas e pouco confiáveis o que acaba gerando associações equivocadas dentro das análises mais robustas de taxonomia integrativa, diminuindo, com isso o poder de explicação de hipóteses filogenéticas que incorporam dados dessa natureza em suas matrizes e análises. No caso do *Adenomera* esse cenário se torna ainda pior e bastante caótico pois é notório e flagrante a imensa variabilidade intra e interespecífica apresentada pelo gênero, impedindo dessa forma que seja possível detectar características morfológicas e acústicas que possam ser classificadas como discriminantes e/ou discretas. Partindo da premissa de que verdadeiros complexos crípticos de espécies são formados e que essas populações de anuros podem perfeitamente apresentar distribuições simpátricas ou até mesmo coexistirem sintópicamente que o protocolo de exploração de dados proposto por Seifert *et al.*, (2013) foi de pronto executado neste trabalho. Dessa forma foi possível evitar a criação de grupos enviesados (viés do pesquisador) e com isso obter hipóteses não-arbitrárias para a formação dos grupos de espécimes, habilitando com isso, o presente trabalho a futuras comparações com outras linhas de evidências.

#### *Hipótese de formação de morfoespécies com base em dados acústicos.*

Para as análises foram assumidas duas abordagens específicas e distintas que levaram em consideração objetos distintos como os cantos dos indivíduos (abordagem 01) e os próprios indivíduos (abordagem 02). Para a abordagem com o objeto de estudo focado nos indivíduos foram seguidas as seguintes etapas:

**1-** Criação de matriz de medidas acústicas dos machos vocalizantes (Matriz A01), com  $n$  linhas (espécimes) e  $p$  colunas ( $p$  colunas para variáveis de mensuração e uma coluna com códigos de identificação para cada indivíduo gravado). Cada unidade amostral local que foi gerada é composta por no mínimo dois espécimes gravado que foram inseridos nas análises. Aqui não foi possível padronizar o número de espécimes gravados em um mesmo ponto de amostragem dentro da escala local assim como não foi possível dividir a amostra em subamostras levando em consideração os diferentes períodos de coleta que

existiram. Dessa forma nenhuma UTO foi proposta baseando-se na presença exclusiva de um único indivíduo e/ou singletons. E as estruturas do canto que difiram dentro de uma mesma UTO serão considerado como *outliers* em potencial.

**2-** Determinação dos parâmetros acústicos de entrada para a Análise de Componentes Principais - ACP/PCA mais Análise Discriminante Linear - LDA. Para isso foi feito uma Correlação de Pearson par-a-par com a matriz de dados bruto dos cantos mensurados. Esse procedimento englobou um total de 16 parâmetros acústicos que se encontravam associados ao total de 2589 canto de anúncios mensurados das espécies. Essa etapa foi destinada a garantir a correlação entre os dados, eliminando, com isso a presença de dados redundantes a posteriori nas análises de agrupamento. Para esse procedimento foi adotado a correlação Linear  $r$  de Pearson sendo o limiar de corte da matriz os valores em módulo que se apresentaram iguais e/ou superiores a 0.8 (80%). Foi entendido que esses valores apresentam similaridade indesejada que acabam atuando como fator de confusão nas análises e por esse motivo os parâmetros identificados como redundantes foram descartados.

**3-** A análise de componentes principais - ACP/PCA. Teve como objetivo investigar o nível das variações acústicas entre as unidades taxonômicas operacionais - UTOs e para isso foi calculado a matriz de correlação com os parâmetros acústicos selecionados no passo 2. Desta matriz, foram obtidos os autovalores e autovetores que de forma combinada às variáveis originais são capazes de produzir combinações lineares responsáveis por estruturar os componentes principais (PCs). Com isso os escores dos componentes principais produzidos a partir do PCA foram utilizados nas análises discriminantes e análises de agrupamento (passo 4) além de serem projetadas no espaço reduzido dos componentes principais de maiores contribuições (Cavalcanti & Lopes, 1993).

**4-** A análise discriminante linear - LDA. Aqui foram utilizados os escores dos componentes principais (passo 3) capazes de trazer para a análise a influência e a contribuição de cada parâmetro acústico mensurado aumentando com isso a resolução do método. A análise foge do modelo de cálculo da distância euclidiana empregada pelo método de agrupamento do PCA pois este, baseia-se na soma dos argumentos sob a raiz quadrada, responsável com isso, por gerar ângulos retos entre os grupos. Dessa forma a álgebra de matrizes associada a análise discriminante linear - LDA, seria capaz de levar em consideração essa

limitação, contornando matematicamente a falta de precisão do método de agrupamento do passo 3 pois esta não leva em consideração a correlação e covariância entre os dados e os grupos. Nesse sentido a LDA aqui aplicada se torna muito mais explicativa às correlações existentes entre as características biológicas que se pretende estudar. Posteriormente os eixos de ordenação produzidos a partir do LDA foram submetidos aos mesmos métodos de agrupamento aglomerativo do passo 5 a título de comparação por inspeção visual entre as superestruturações e subestruturações criadas entre os dois métodos.

**5-** Formação de hipóteses de morfoespécies por análise não supervisionada (exploratórias). Foi utilizado a clusterização como método aglomerativo de agrupamento a partir da matriz de escores gerada no passo 3 e confirmada no passo 4 após inspeção visual dos grupos formados com base nos dois métodos de análise. Para a rotina de classificação foram utilizado dois métodos hierárquicos na busca por estruturação entre as espécies e para visualizá-los através de dendrogramas hierárquicos de árvores. Para tal foi aplicado indexadores euclidianos ao algoritmo UPGMA e como segundo método aglomerativo voltado para estimar com maior exatidão o número de agrupamentos foi utilizado o método Ward *sensu* Seifert *et al.* (2013), ambos com o número de boot igual a 1000 repetições.

Para a abordagem com o objeto de estudo focado nos cantos foram seguidas as seguintes etapas para a obtenção de entidades morfológicas hipotéticas:

**6-** Criação de matriz de medidas acústicas dos cantos dos machos vocalizantes (Matriz A02), com  $n$  linhas (cantos) e  $p$  colunas ( $p$  colunas para variáveis de mensuração e uma coluna com códigos para 17 unidades taxonômicas operacionais - UTOs). Cada unidade amostral local que foi gerada é composta por no mínimo dois cantos que foram inseridos nas análises das UTOs. Não foi possível padronizar o número de cantos gravados em um mesmo ponto de amostragem dentro da escala local assim como não foi possível dividir a amostra em subamostras levando em consideração os diferentes períodos de coleta. Dessa forma nenhuma UTOs foi proposta baseando-se na presença exclusiva de um único canto e/ou singletons. Por esse motivo caso seja identificado estruturas do canto que difiram dentro de uma mesma UTO este será considerado como um *outlier* em potencial.

**7-** Determinação de uma posição para o centróide de cada UTO. A Matriz A02 (Passo 6) será utilizada em um primeiro momento para rodar a análise discriminante linear - LDA em uma perspectiva exploratória dos dados onde se objetiva extrair os valores dos escores dos centróides que foram gerados aleatoriamente dentro do espaço Euclidiano da nuvem de pontos por esse método para cada UTO. O uso dos escores do centróide gerados a partir da LDA é justificado pois esse método atua reduzindo os erros inerentes aos cálculos dos nós aglomerativos e do agrupamento uma vez que os algoritmos do K-média a ser aplicado atuam calculando as médias das distâncias de cada ponto em relação a cada centróide, gerando a partir dessas médias euclidianas novos centróides ainda mais confiáveis para a nuvem de pontos (Seifert. *et al.*, 2013). A análise discriminante linear - LDA é capaz de ordenar grupos a priori (UTOs) de modo a maximizar as variações entre os grupos em relação as variações dentro dos grupo (intragrupo), produzindo, a partir dessa característica, grupos mais homogêneos e distintos entre si através da separação máxima entre os grupos (Malhotra & Thorpe 1997). Por esses motivos os autovalores e autovetores associados serão obtidos a partir da matriz de variância e covariância. A partir do LDA será gerada uma matriz de centróides (variáveis canônicas médias) (Matriz B02), contendo 2589 linhas (cantos = UTOs) e 5 colunas (eixo sintéticos ou raízes canônicas), mas apenas raízes canônicas significativas serão retidas para as próxima etapa mediante análise em conjunto dos autovalores, valores de lambda de Wilks' e valor p ajustado (bonferroni 0.05/50 gerando alfa e/ou valor de  $p < 0.001$ ). As análises serão realizadas no software Statistica.

**8-** Formação de hipóteses de morfoespécies por análise não supervisionada (exploratórias). Para testar uma possível “superestruturação” pelo método Ward *sensu* Seifert et al. (2013) além de obter o número de grupos potenciais da clusterização de forma automatizada e livre das decisões do pesquisador a priori, foi realizado o método analítico de K-médias generalizada no próprio programa Statistica por onde foram obtido os valores de agrupamento na Matriz B02 (Passo 7) de forma automatizada que também foram usados na retestagem dentro do programa PAST ver. 4.10 ao assumir o numero de grupos gerados pelo K-médias generalizada do Statistica, o que possibilitou a visualização da estruturação dos grupos através de dendrogramas hierarquicos de árvores (Hartigan 1975, Hartigan & Wong 1979). No caso de estimação distinta do número de agrupamentos, e com congruência composicional completa entre grupos estimados, será escolhida a

estruturação com o maior número de grupos criados para representar a hipótese da morfoespécie.

**9-** Hipótese final de morfoespécie. Os objetivos desta etapa são: (i) testar se morfoespécies obtidas através das etapas 6-8 são acusticamente distintas ( $H_0$ , nenhuma diferença entre cluster/centróides populacionais), (ii) testar se são diagnosticáveis (diferenças nos parâmetros temporais e espectrais do canto) e (iii) verificar a robustez do modelo de classificação para observações individuais e para dados gerais. A Matriz A02 (Passo 6) será utilizada como matriz de entrada para todas as análises. Será testada a nulidade da hipótese que refere-se a ausência de diferenças entre os centróides populacionais através da MANOVA. Comparações a posteriori entre todos os pares de grupos serão corrigidas pelo método de Bonferroni sequencial. As análises supra serão realizadas no *software* Statistica ver. 13 (TIBCO 2017) e Past ver. 4.10 (Hammer *et al.*, 2001). Para a classificação de cada espécime da Matriz A02 dentro de cada hipótese de morfoespécie (grupos), será utilizado a distância linear euclidiana fornecida pela própria análise linear discriminante - LDA que considera variância igual entre os grupos.

### **2.3** Bioacústica de anfíbios anuros

#### *Parâmetros e pressupostos acústicos.*

Foram reunidos dados primários oriundos de empréstimos das espécies *A. thomei*; *A. hylaedactyla*; *A. martinezi* e *A. saci* além de gravações *in loco* das vocalizações (cantos, chamados) feitas por mim dos indivíduos que foram atribuídos às populações de *A. sp.* em estudo, para a localidade do Salvador. Buscando mensurar os sinais acústico com maior precisão foi possível ter acesso aos cantos de anúncio das espécies que foram utilizados nos próprios artigos de descrição das espécies, sendo, dessa forma, incluindo em nossas análises dados acústicos de indivíduos holótipos, parátipos, topótipos e inclusive de outras localidades disponíveis. Vale ressaltar que esta amostragem não levou em consideração os dados acústicos oriundos de linhagens ou de espécies não validadas, sendo utilizado nas análises apenas dados acústicos relacionados às espécies nominalmente descritas e publicadas.

Os parâmetros temporais e estruturais dos cantos de anúncio foram mensurados e contabilizados a partir das marcações nos oscilograma (amplitude do som em função do tempo), enquanto que os parâmetros espectrais foram interpretados a partir das marcações nos espectograma (frequência em função do tempo) e audioespectograma de potência (frequências do som e seus respectivos picos de frequências). Os gráficos essenciais às análises bioacústicas foram gerados através da Transformada Rápida de Fourier - FFT no programa Raven Pro 1.5.0 e estes foram avaliados através de inspeção visual e serviram para a construção de tabelas mensurativas das estrutura do canto que levaram em consideração a quantidade de harmônicos, distribuição de energia entre as faixas de frequência, modulação de frequência no início e fim do canto, amplitude do canto assim como a estruturação do canto seja ela pulsionada ou harmônica. Todas as mensurações foram realizadas no programa Raven Pro, versão 1.5.0 (Bioacoustics Research Program, 2017). Dessa forma a geração dos audioespectogramas dentro do programa, tiveram que ser padronizadas e as configurações adotadas nas rotinas de análise foram: FFT 256, sobreposição de janelas 80%, janela Hanning, filtro de 3dB de 124 Hz e tamanho da janela de 128. A padronização e a construção do protocolo de rotina nas análise foram criados para assegurar a qualidade das medições feitas sobre as imagens com a melhor resolução espectral possível. Para a produção final dos audioespectograma, espectro de potência e oscilograma foram utilizado o pacote Seewave, versão 1.6.4 para plataforma R, versão 2.15.1 (R Core Team 2017).

Primeiramente os canto foram examinado conforme a sua sintaxe. E trechos de chamados e/ou até mesmo chamados inteiros que não estivessem de acordo com a classificação da função biológica requerida para nossas análises foram eliminados das análises. Todas os chamados disponibilizados passaram por esse processo e os cantos de anuncio foram, com isso, classificados antes de iniciar as análises dentro do programa de pesquisa em bioacústica. Uma vez dentro do Raven, foi possível gerar duas tabelas de referência onde cada uma delas foi destinada a conter distintos valores de mensurações sendo a "TabA" destinada a apresentar os valores de mensurações no campo dos parâmetros temporais do sinal acústico e a "TabB" destinada a apresentar os valores de mensurações no campo dos parâmetros espectrais do sinal acústico que no final do processo de mensuração do áudio WAV foram exportadas e fundidas no programa Excel. Dessa forma cada audio analisado que foi incorporado nas análises apresentam-se



associados diretamente a duas tabelas de medições .txt que foram geradas a partir da rotina de mensurações estabelecida por mim dentro do próprio Raven (TabA e TabB).

Então todos os chamados disponíveis foram analisados. E quinze parâmetros quantitativos relacionados ao sinal acústico foram mensurados e contabilizados, incluindo as medidas tradicionais consideradas relevantes na codificação do canto de anúncio dos anfíbios anuros (Cocroft & Ryan 1995, Padial et al. 2008, Köhler *et al.*, 2017). Os parâmetros analisados foram: frequência mínima (Hz), frequência máxima (Hz), tamanho do canto (s) e (m), banda de frequência (Hz), frequência dominante (Hz), frequência 5% (Hz), frequência 95% (Hz), número de harmônicos (/canto), número de pulso (/nota), número de notas (/canto), call rising time - CRT (ms) baseado no pico de amplitude do canto (U), taxa de emissão do canto (s) e (m), taxa de emissão do pulso (s) através do método capaz de estimar os valores médios deste parâmetro no canto através da fórmula  $[(\text{número de pulso} - 1)/\text{intervalo de tempo (s)}]$  entre o início do primeiro pulso até o início do último pulso], intervalo entre cantos (s), modulação do canto *sensu* (Márquez. 1995) que propõe a subtração da frequência final do canto (Hz) pela frequência inicial do canto (Hz) calculado para título de comparação com a bibliografia levantada para o gênero *Adenomera* e modulação do canto *sensu* (Emmrich. 2020) que propõe a subtração da frequência final do canto (Hz) pela frequência inicial do canto (Hz) dividida pelo tamanho do canto (ms) a título de análise direta no banco de dados. Esses parâmetros foram utilizados para compor as descrições formais e sumárias dos cantos de anúncio incluindo comparações da população de *Adenomera sp.* com ocorrência em Salvador entre as espécies cogenéricas.

Assim como Carvalho (2017) foi possível identificar nos cantos de anúncio relacionados as populações de *Adenomera martinezi*, variações nos picos de energia relacionados a alterações da frequência dominante absoluta (FD) nos cantos dessa espécie, essas alterações coincidem entre as faixa de frequência do 1º e 2º harmônico respectivamente (H1 e H2). Esse tipo de variação ocorreu entre áudios e/ou indivíduos distintos assim como dentro de um mesmo áudio e/ou de um mesmo indivíduo como já havia sido relatado pelo próprio autor em 2017 e assim como o mesmo, convencionamos o pico de frequência no harmônico de maior moda para que, com isso, fosse possível as medições neste e nos demais parâmetros que por ventura fossem influenciados por essa rotina. A partir dessa medida foi estabelecido os valores do primeiro harmônico (H1) como padrão de medição, compondo dessa forma as medições de frequência dominante,

frequência 5%, frequência 95% e cálculos de modulação de frequência feitos para as populações de *Adenomera martinezi* da Serra do Cachimbo em nossas análises.

O canto de anúncio é composto por múltiplas unidades que são emitidas em sequência e apresentam propriedades temporais, espectrais e estruturais que garantem a especificidade do sinal dentro do sistema de comunicação dos anfíbios anuros. Por conseguinte, a primeira etapa para estabelecer homologia em estudos comparativos de vocalizações como o que esta sendo feito é propor uma definição padrão para as unidades básicas do chamado baseada no conceito que engloba todos os táxons comparados no estudo. Esse reconhecimento da estrutura do chamado possibilitará a extração de dados equivalentes dentro de vocalizações diferentes em diferentes espécies (Desutter-Grandcolas & Robilliard 2001). Adicionalmente, Wenzel (1992) destacou a importância da inclusão de vários níveis de unidades comportamentais (e.g. parâmetros de chamados, notas e pulsos) em estudos comparativos. Por isso, neste estudo, foi utilizado os parâmetros do canto de anúncio que refletem os três níveis de unidades estruturais do canto que são: chamado, nota e o pulso. E no presente trabalho foi utilizado a hierarquia de unidades básicas de vocalização para determinar o que se entende por chamados, notas e pulsos. Em trabalhos recentes esses conceitos foram perfeitamente utilizáveis para a construção e proposição de guildas acústicas bastante úteis nos estudos em bioacústica que não só podem envolver os sinais acústicos dos anfíbios anuros como de outros grupos (Emmrich *et al.*, 2020). Dessa forma a definição adotada para o conceito de notas estará de acordo com o conceito de McLister (1995), que são estruturas produzidas pelo ciclo e fluxo de ar que corresponde a uma contração dos músculos do pulmão do animal. A nota pode ser composta de uma ou mais subunidades curtas que são chamadas de pulsos. E o número de notas por chamado pode ser definido pela observação dos números de contrações durante a atividade vocal. Portanto, os chamados podem ser compostos de uma ou mais notas emitidas regularmente em curtos intervalos de tempo, nos quais a sequência de notas é temporalmente definida como uma unidade (chamado). O chamado é separado de outros chamados pelo intervalo de tempo que deve ser mais longo do que a duração do próprio chamado e pode ser agrupado em uma sequência regular formando grupos de chamados. As definições de nota e pulso também podem seguir essa lógica comparativa baseada no tempo de silêncio entre as estruturas uma vez que a distância entre as notas sempre serão maiores que as distâncias entre os pulsos.

Após a identificação das unidades básicas que formam as vocalizações, a próxima etapa estabeleceu o critério de homologia para os sinais acústicos observados. Aqui, foram definidos unidades de vocalizações homólogas entre amostras geográficas levando em consideração os critérios proposto por Mundinger (1979): (i) posição e qualidade especial, (ii) estágio ontogenético e (iii) motivação. O critério de Mundinger são apropriados para definir homologias em vocalizações de anuros desde que somente machos adultos vocalizam canto de anúncio (ii) para atrair fêmeas (iii) e as unidades dos chamados podem ser definidas objetivamente baseado na hierarquia e mecanismo de produção do som. Para identificar cantos de anúncio, foi seguido a classificação de canto de Toledo et al. (2015). Os cantos de anúncio serão categorizados dentro de canto simples (somente uma nota) e canto composto (série de notas) de acordo com Littlejohn (2001). Os cantos compostos ainda poderão ser categorizados como monofásico (série de notas idênticas) e difásico (série de duas ou mais tipos de notas). Seguindo esse critério, será possível assumir que o canto de anúncio de diferentes amostras e/ou linhagens evolutivas em anuros são homólogos e podem ser usados em estudos comparativos.

### 3 - RESULTADOS

#### 3.1 A partir de dados acústicos indiretos (levantamentos e comparações).

Das 29 espécies de *Adenomera* que tiveram sua bibliografia pesquisada no ano de 2021 foram possíveis levantar 33 artigos, dentre eles, artigos de descrição de cantos e artigos que levavam em consideração em suas bases de dados as variações e parâmetros acústicos associados aos cantos de anuncio como parte ou principal linha de evidência nos testes de hipóteses taxonômica e de pesquisa. Desta base de dados bibliográfica apenas a espécie *Adenomera diptyx* (Boettger, 1885) não apresentou referências acústicas ainda publicadas, não sendo possível encontrar o artigo de descrição formal de seu canto de anuncio. Conforme os dados bibliográficos é possível notar que os cantos de anuncio do gênero *Adenomera* apresenta ampla variação altitudinal chegando até 1050 metros de altitude. Os valores médios de altitude extraídos da literatura especializada chegam a aproximadamente 400 metros de altitude, e apontam para uma maior tendência de ocorrência das vocaizações para faixas altitudinais mais baixas que vão do nível do mar até 300 metros de altitude para o gênero (Figura 3).



**Figura 3** – Variação altitudinal extraída dos artigos levantados que levavam em consideração a bioacustica do gênero *Adenomera*.

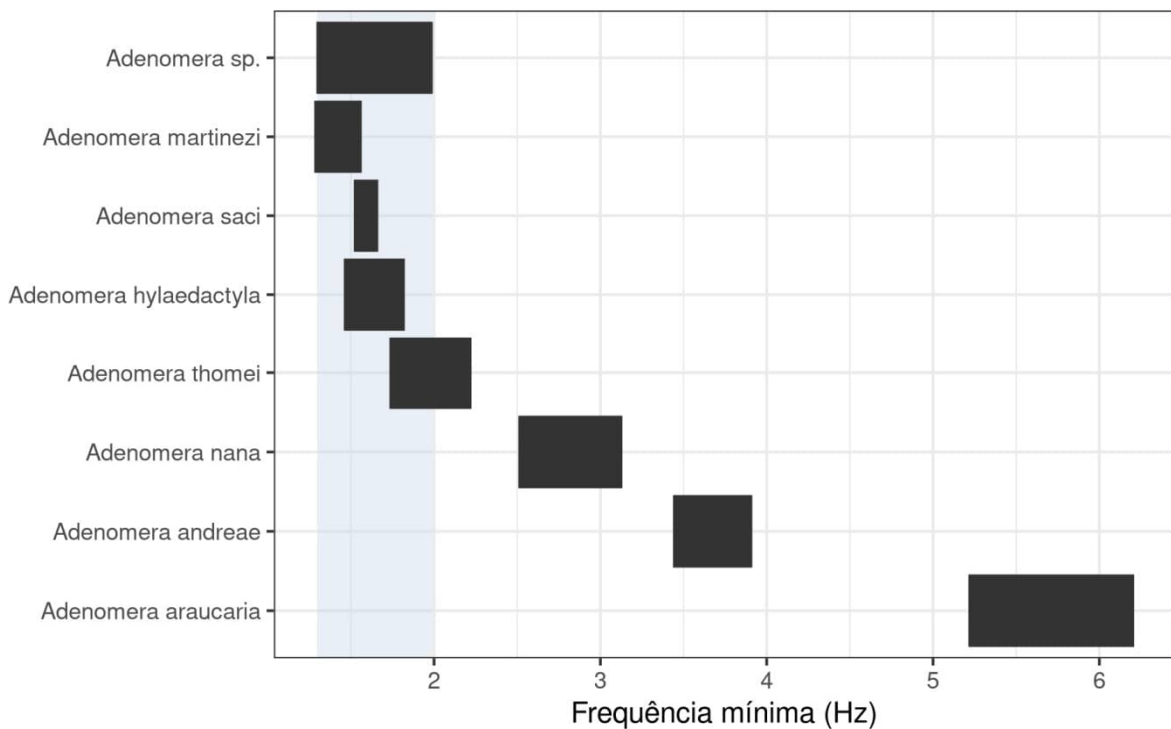
Para o clado Mata Atlântica foi possível levantar os dados acusticos indiretos das espécie *Adenomera araucaria* Kwet and Angulo, 2002 com 14 artigos levantados (11.5%), *Adenomera marmorata* Steindachner, 1867 com 11 artigos levantados (9.0%), *Adenomera nana* (Müller, 1922) com 10 artigos levantados (8.2%), *Adenomera thomei* (Almeida and Angulo, 2006) com 08 artigos levantados (6.6%), *Adenomera engelsi* Kwet, Steiner, and Zillikens, 2009 com 06 artigos levantados (4.9%), *Adenomera ajurauna* (Berneck, Costa, and Garcia, 2008) com 4 artigos levantados (3.3%) e *Adenomera bokermanni* (Heyer, 1973) com 1 artigo levantado (0.8%). Para além do clado mata atlântica foi possível destacar o *Adenomera hylaedactyla* (Cope, 1868) com 20 artigos levantados (16.5%), *Adenomera martinezi* (Bokermann, 1956) com 01 artigo levantado (0.8%), *Adenomera saci* Carvalho and Giaretta, 2013 com 02 artigos levantados (1.6%). Todas as regiões e localidades associadas aos dados acústicos foram plotadas no mapa através de dados GPS retirados dos próprios trabalhos levantados para as espécies do gênero e podem ser conferidos na Figura 4 que refere-se a distribuição geográfica exclusivamente dos dados acústicos mensurados pelos autores. É possível notar que o gênero *Adenomera* apesar de sua ampla distribuição no território Brasileiro e no continente Sul Americano se encontra subamostrado para o a região nordeste e para as regiões de mata atlântica do litoral norte.



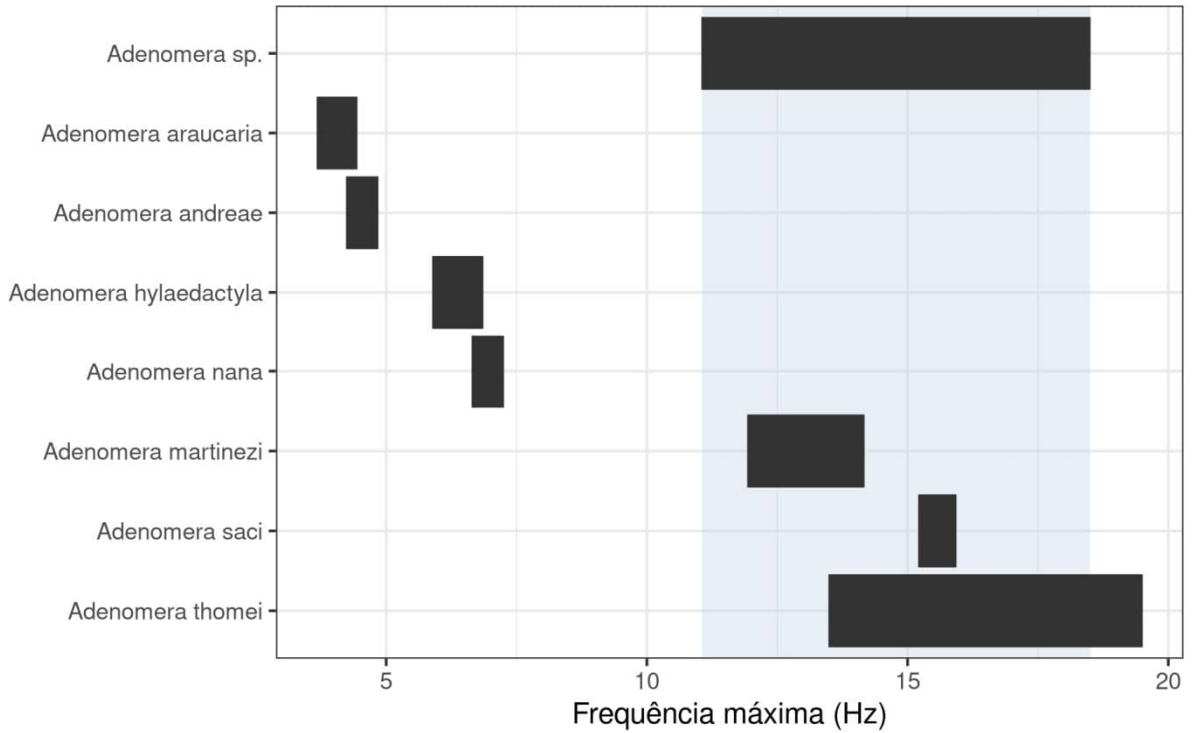
**Figura 4** – Regiões e pontos identificados a partir de dados acústicos indiretos publicados.

Devido a falta de padronização e consenso entre os autores referente a quais parâmetros acústicos de fato são mais informativos para a bioacústica do gênero *Adenomera* que só foi possível efetuar comparações entre nove (09) parâmetros acústicos através de dados acústicos indiretos e diretos. Com isso foi convencionado para construção dos gráficos que a primeira espécie demonstrada se trata das populações de *Adenomera*

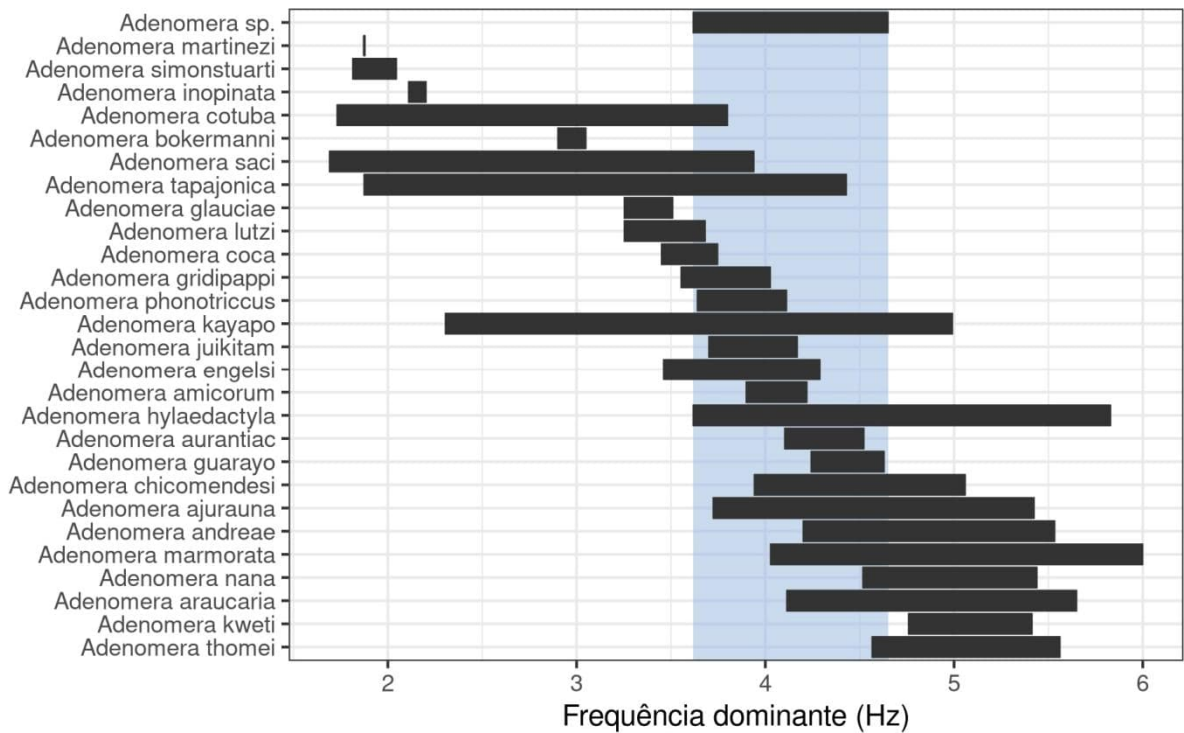
*sp.* amostradas para Salvador e calculada através de dados diretos. Já as variações apresentadas para as espécies *A.hylaedactyla*, *A.martinezi*, *A.saci* foram geradas a partir de dados diretos calculados e dos dados indiretos disponibilizados nos artigos de descrição dos cantos de anúncio. As demais espécies foram projetadas usando apenas dados indiretos retirados da literatura levantada. Esses parâmetros, levaram em consideração os valores de média, desvio padrão, máximas, mínimas e foram convertidos para a escala de maior consenso. Os parâmetros em comum a todas as espécies do gênero *Adenomera* foram: **i.**Frequência mínima (Hz); **ii.**Frequência máxima (Hz); **iii.**Frequência dominante (Hz); **iv.**Modulação (Hz); **v.**Duração do canto (s); **vi.**Call Rising Time (ms); **vii.**Intervalo entre cantos (s); **viii.**Taxa de emissão de canto (cantos/s) e **ix.**Número de pulso (nota) e podem ser conferidos nas Figuras 5-13.



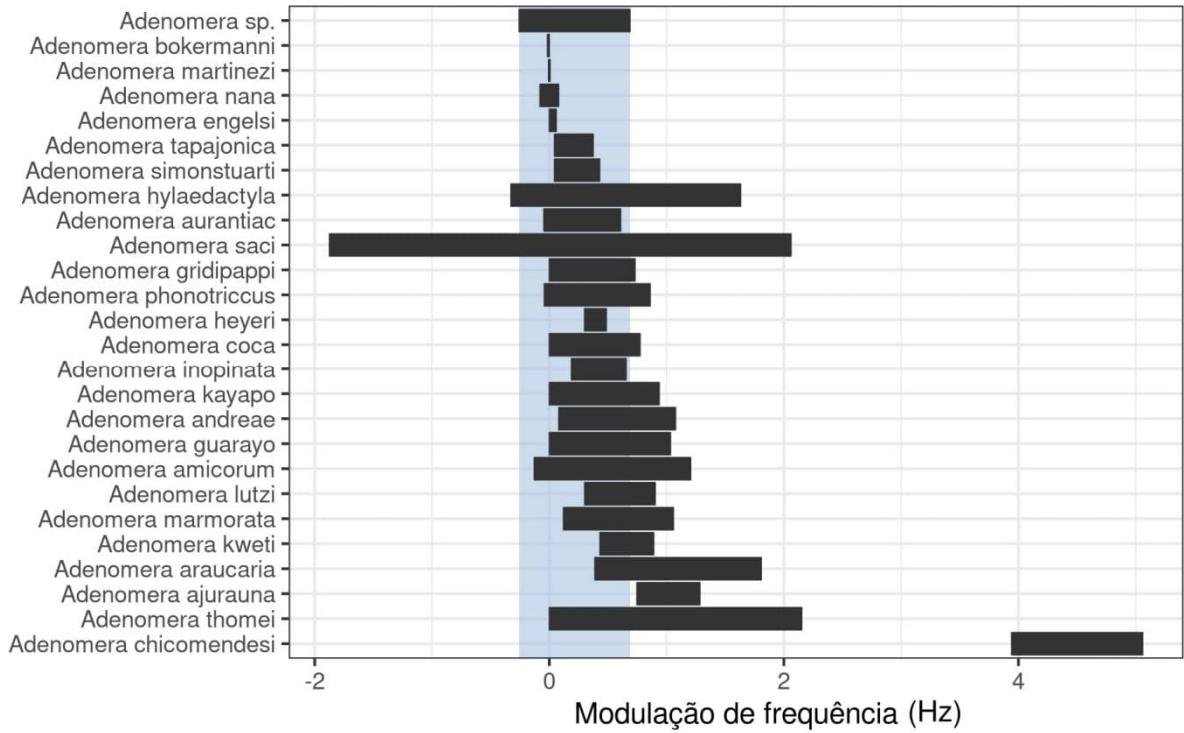
**Figura 5** – Dados acústicos diretos e indiretos para efeito de comparação entre as espécies de *Adenomera*.



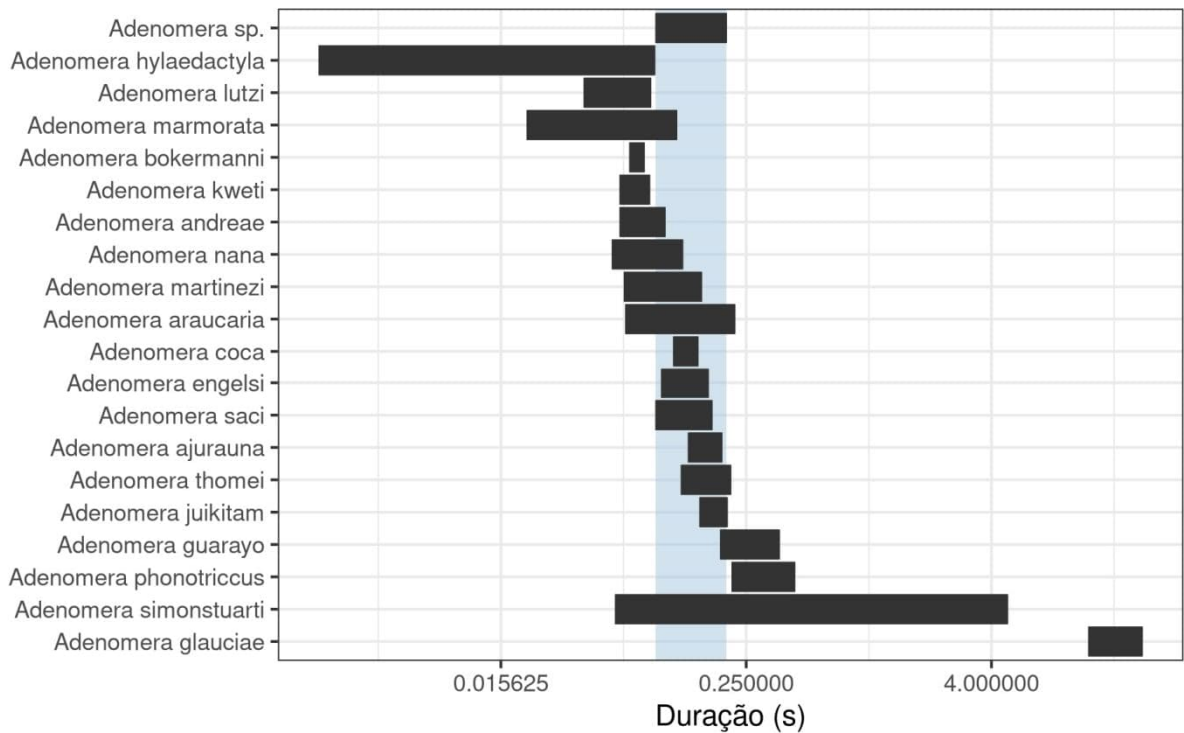
**Figura 6** – Dados acústicos diretos e indiretos para efeito de comparação entre as espécies de Adenomera.



**Figura 7** – Dados acústicos diretos e indiretos para efeito de comparação entre as espécies de Adenomera.

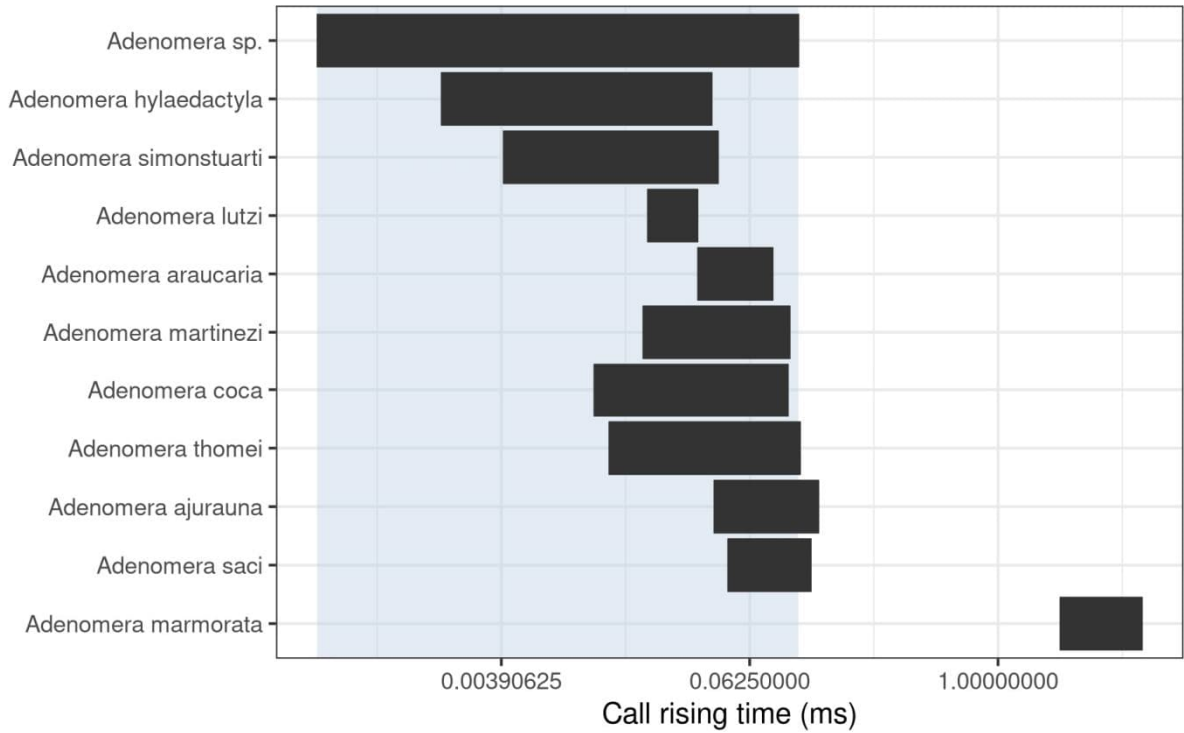


**Figura 8** – Dados acústicos diretos e indiretos para efeito de comparação entre as espécies de *Adenomera*.

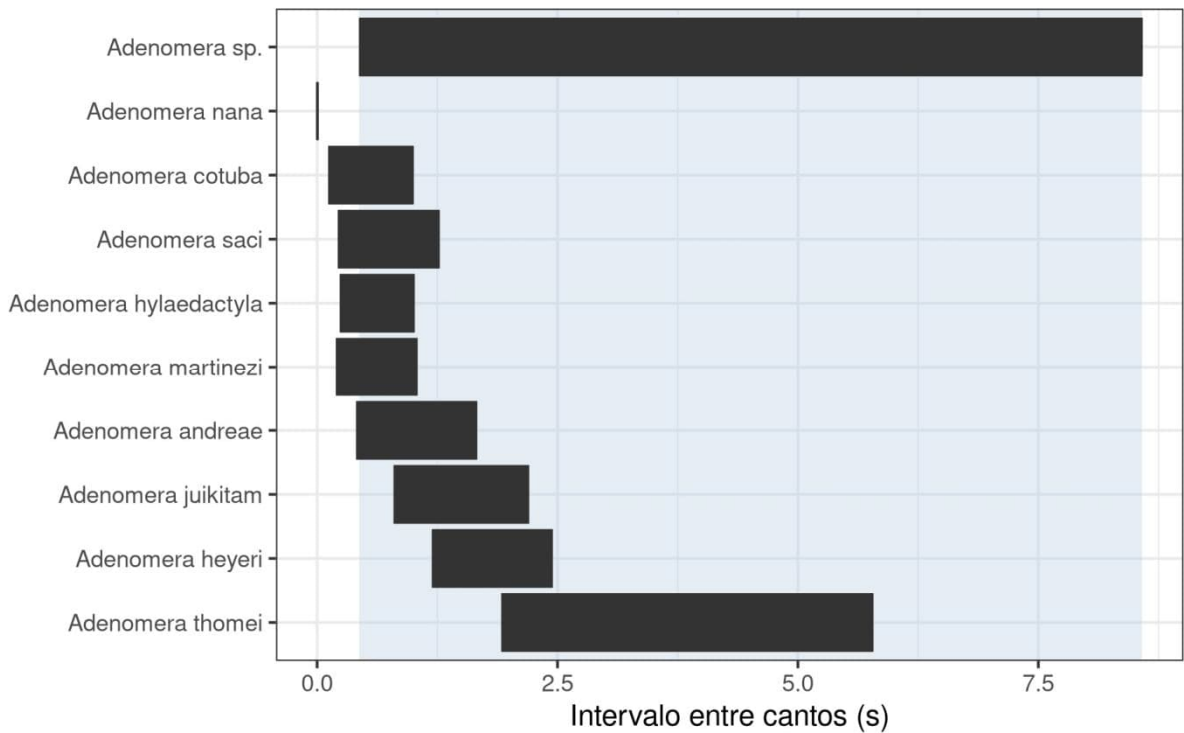


**Figura 9** – Dados acústicos diretos e indiretos para efeito de comparação entre as espécies de *Adenomera*.

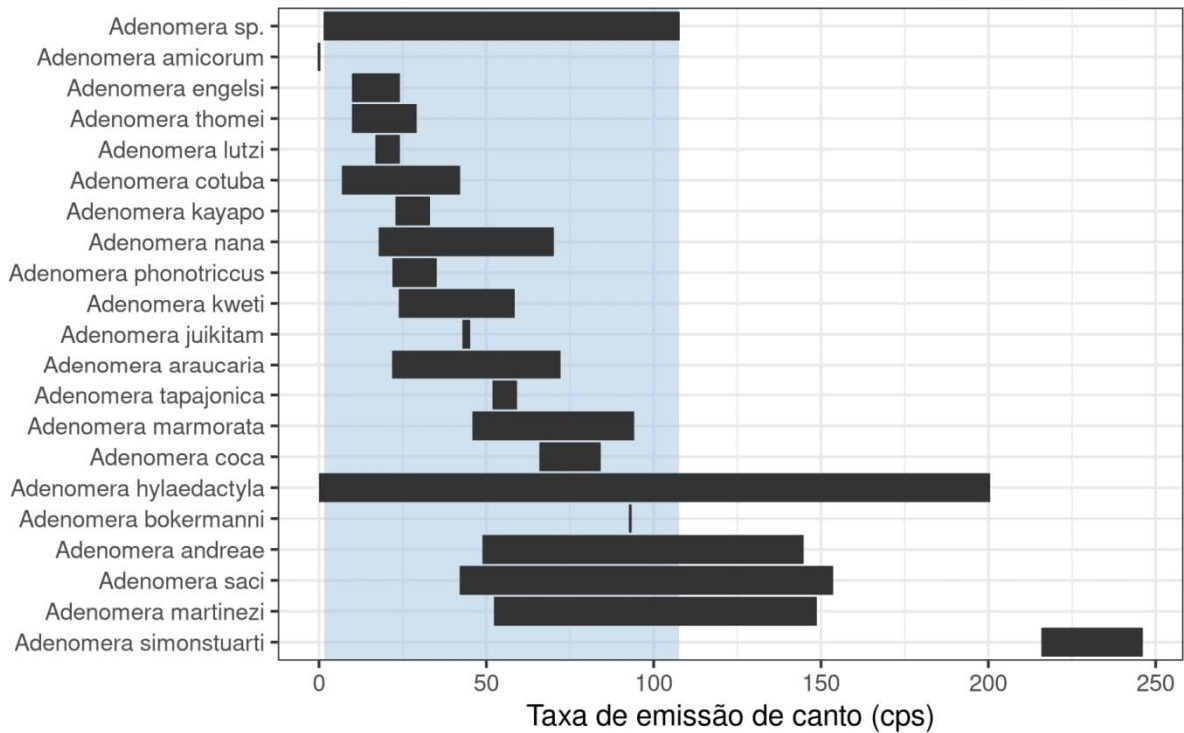




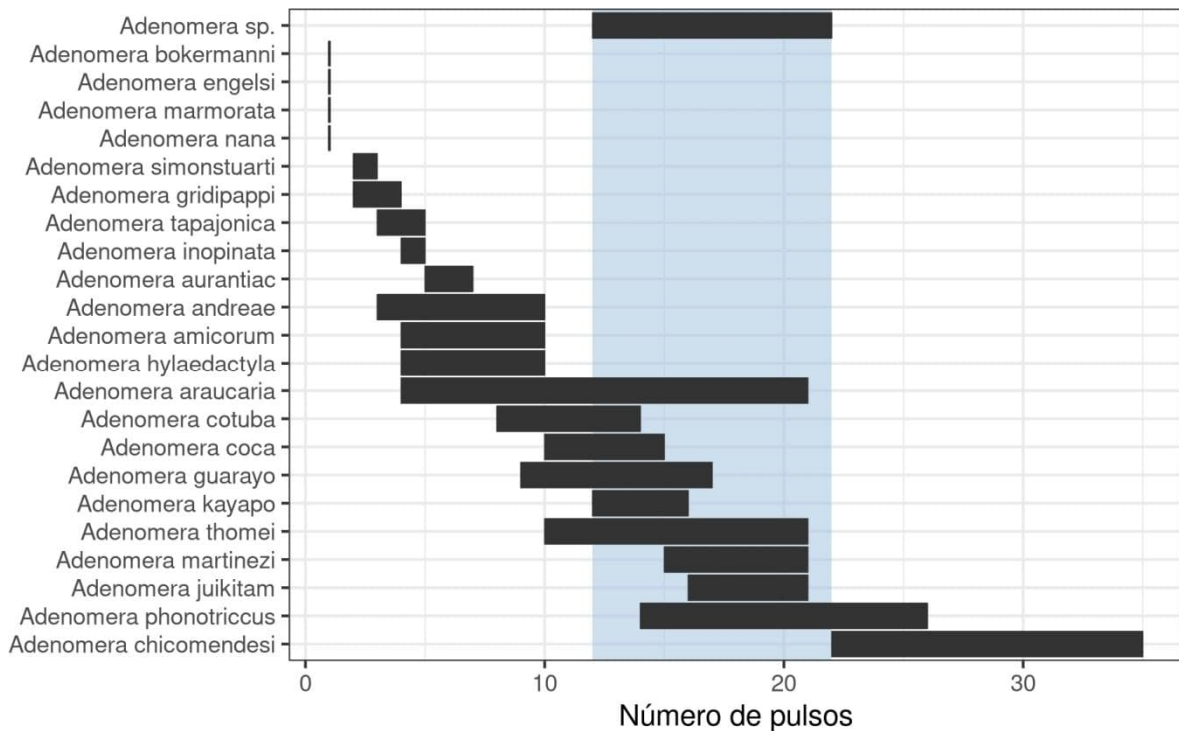
**Figura 10** – Dados acústicos diretos e indiretos para efeito de comparação entre as espécies de Adenomera.



**Figura 11** – Dados acústicos diretos e indiretos para efeito de comparação entre as espécies de Adenomera.



**Figura 12** – Dados acústicos diretos e indiretos para efeito de comparação entre as espécies de Adenomera.



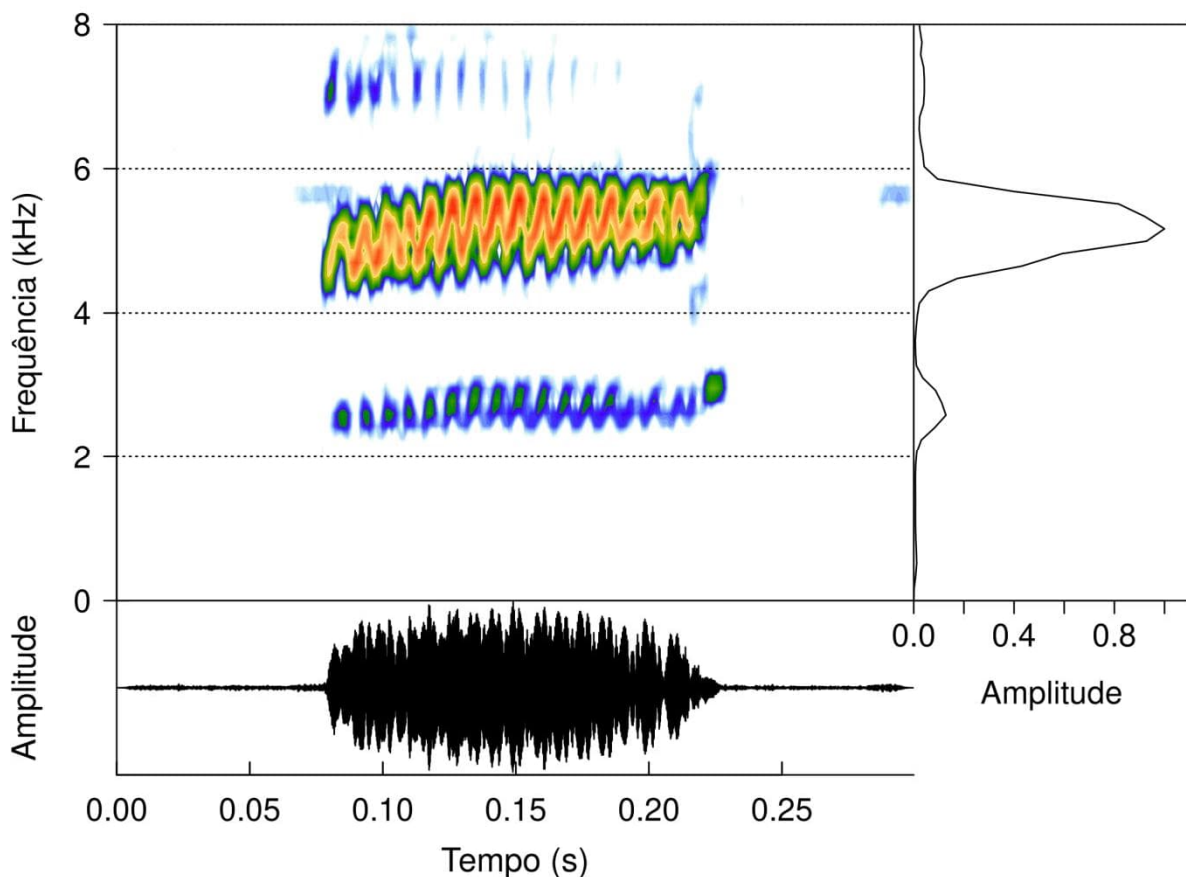
**Figura 13** – Dados acústicos diretos e indiretos para efeito de comparação entre as espécies de Adenomera.

### 3.2 A partir de dados acústicos diretos (levantamentos e comparações).

Quanto a entrada de dados acústicos diretos foi possível ter acesso a três (03) cantos de anúncio das espécies nominais *Adenomera hylaedactyla* (Cope, 1868) gravado a partir de populações mais ao norte do país [(**Canto01** n: 118 cantos aferidos; ID: Unvouchered; Estado: Acre; Município: Cruzeiro do Sul; Lat. -7.614977000302 Long. -72.701396); **Canto02** n: 57 cantos aferidos; ID: Unvouchered; Estado: Acre; Município: Cruzeiro do Sul; Lat. -7.614977000302 Long. -72.701396) e (**Canto03** n: 161 cantos aferidos; ID: Unvouchered; Estado: Amazonas; Município: Manaus; Lat. -3.0919640001238 Long. -59.971234)]; a três (03) cantos de anúncio do *Adenomera martinezi* (Bokermann, 1956) gravado a partir de populações do centro oeste [(**Canto01** n: 189 cantos aferidos; ID: AAG-UFU 1517 (TOPOTIPO); Estado: Pará; Município: Novo Progresso; Lat. -9.3666666670359 Long. -54.9); (**Canto02** n: 218 cantos aferidos; ID: Unvouchered; Estado: Pará; Município: Novo Progresso; Lat. -9.3666666670359 Long. -54.9) e (**Canto03** n: 136 cantos aferidos; ID: Unvouchered; Estado: Pará; Município: Novo Progresso; Lat. -9.3666666670359 Long. -54.9)]; a três (03) cantos de anuncio do *Adenomera saci* Carvalho and Giaretta, 2013 gravado a partir de populações mais a leste do centro oeste brasileiro [(**Canto01** n: 131 cantos aferidos; ID: Unvouchered; Estado: Tocantins; Município: Mateiros; Lat. -10.547169 Long. -46.415291); (**Canto02** n: 71 cantos aferidos; ID: Unvouchered; Estado: Tocantins; Município: Mateiros; Lat. -10.547169 Long. -46.415291) e (**Canto03** n: 48 cantos aferidos; ID: Unvouchered; Estado: Tocantins; Município: Mateiros; Lat. -10.547169 Long. -46.415291)]; a dois (02) cantos de anuncio do *Adenomera thomei* (Almeida and Angulo) gravados a partir de populações do sudeste [(**Canto01** n: 10 cantos aferidos; ID: MBML2516 (PARATIPO); Estado: Espírito Santo; Município: Linhares Lat. -19.550000000725 Long. -39.766666666667) e (**Canto02** n: 06 cantos aferidos; ID: MBML2521 (HOLOTIPO); Estado: Espírito Santo; Município: Linhares Lat. -19.550000000725 Long. -39.766666666667)] além de 1749 cantos oriundos de vinte e três (23) indivíduos de *Adenomera sp.* Ao todo foram analisados 34 arquivos sonoros WAV que correspondem a mesmo valor em indivíduos; 2894 cantos de anúncio analisados e 06 indivíduos foram gravados e coletados a partir de populações do nordeste brasileiro localizadas acima do Rio Paraguaçu que são o objeto central das comparação e análise deste trabalho.

A partir desses dados foi possível descrever sumariamente os cantos de anuncio das cinco espécies foco para este trabalho. Dessa forma o canto de anuncio do *Adenomera*

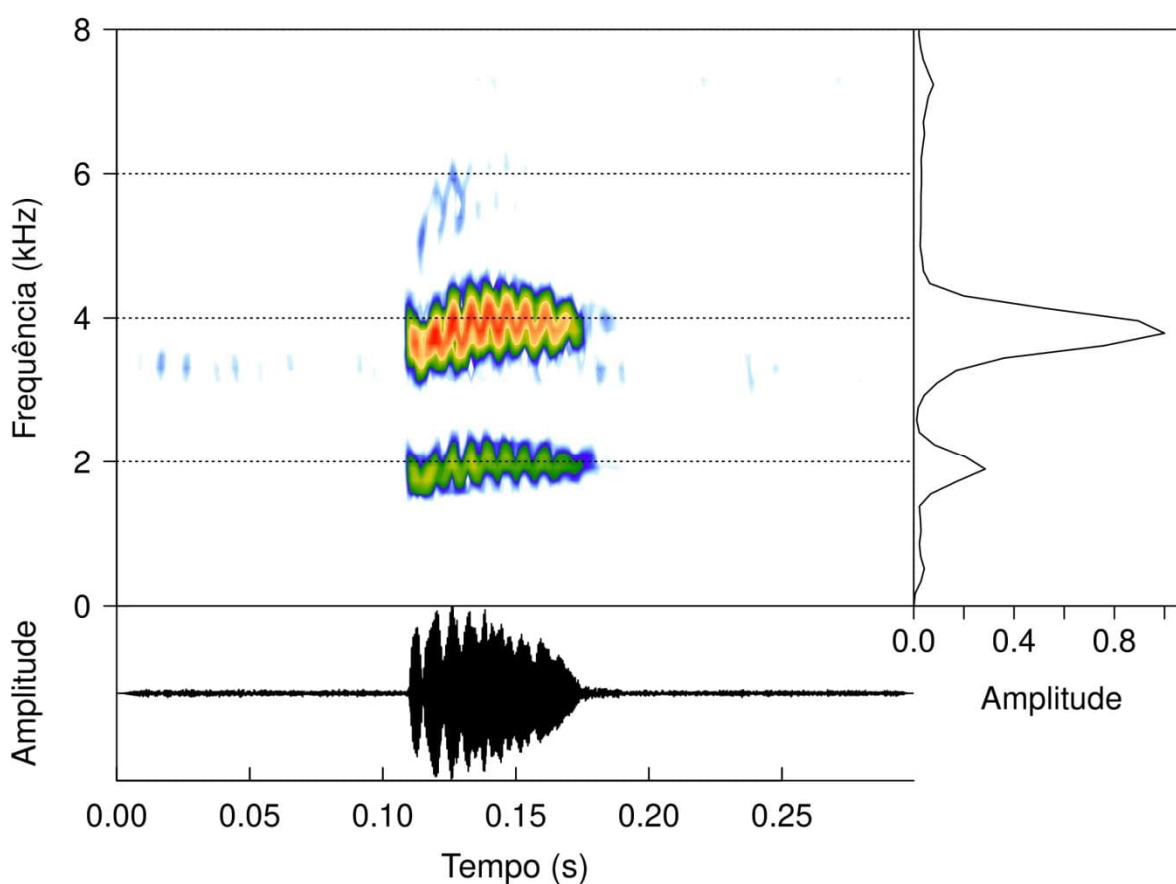
*thomei* gravado a partir de dados da localidade tipo do estado do Espírito Santo possui uma nota pulsionada de 15.00-21.00 pulsos/canto ( $X=18.31\pm 1.85$ ;  $n=16$ ); canto/nota formado por 3.00-5.00 harmônicos/canto ( $X=4.25\pm 1.00$ ;  $n=16$ ); frequência fundamental de 1.735,78-2.222,17 Hz ( $X= 1.853,66\pm 114.81$ ;  $n=16$ ); frequência dominante de 5.167,97-5.512,50 Hz ( $X= 5.383,30\pm 147.52$ ;  $n=16$ ); duração do canto de 0.12-0.21 s ( $X=0.16\pm 0.03$ ;  $n=16$ ); modulação de frequência positiva de 0.00-1.38 Hz/s ( $X= 0.42\pm 0.57$ ;  $n=16$ ) apresentando modulação de frequência na porção inicial do canto de 5.167,96-5.512,50 Hz ( $X= 5.361,76\pm 138.88$ ;  $n=16$ ) e final do canto de 5.340,23-5.512,50 Hz ( $X= 5.426,36\pm 88.96$ ;  $n=16$ ). O Call Rising Time (CRT) do canto é de 40.57-90.94 ms ( $X= 72.00\pm 15.79$ ;  $n=16$ ), taxa de emissão de pulso de 99.67-135.00 pulsos ( $X= 118.53 \pm 8.49$ ;  $n=16$ ), taxa de emissão de canto de 0.17-0.48 cantos/s ( $X= 0.32 \pm 0.10$ ;  $n=16$ ) e um intervalo entre cantos de 1.92-5.78 s ( $X= 3.38\pm 1.28$ ;  $n=16$ ). Sua representação gráfica pode ser conferida a partir dos sonogramas na Figura 14.



**Figura 14** – Sonogramas referente aos cantos de anúncio do *A. thomei* (holótipo e parátipo).

O canto de anúncio do *Adenomera hyladactyla* gravado na região norte do país a partir das populações gravadas nos estados de Manaus e Acre possuem uma nota pulsada

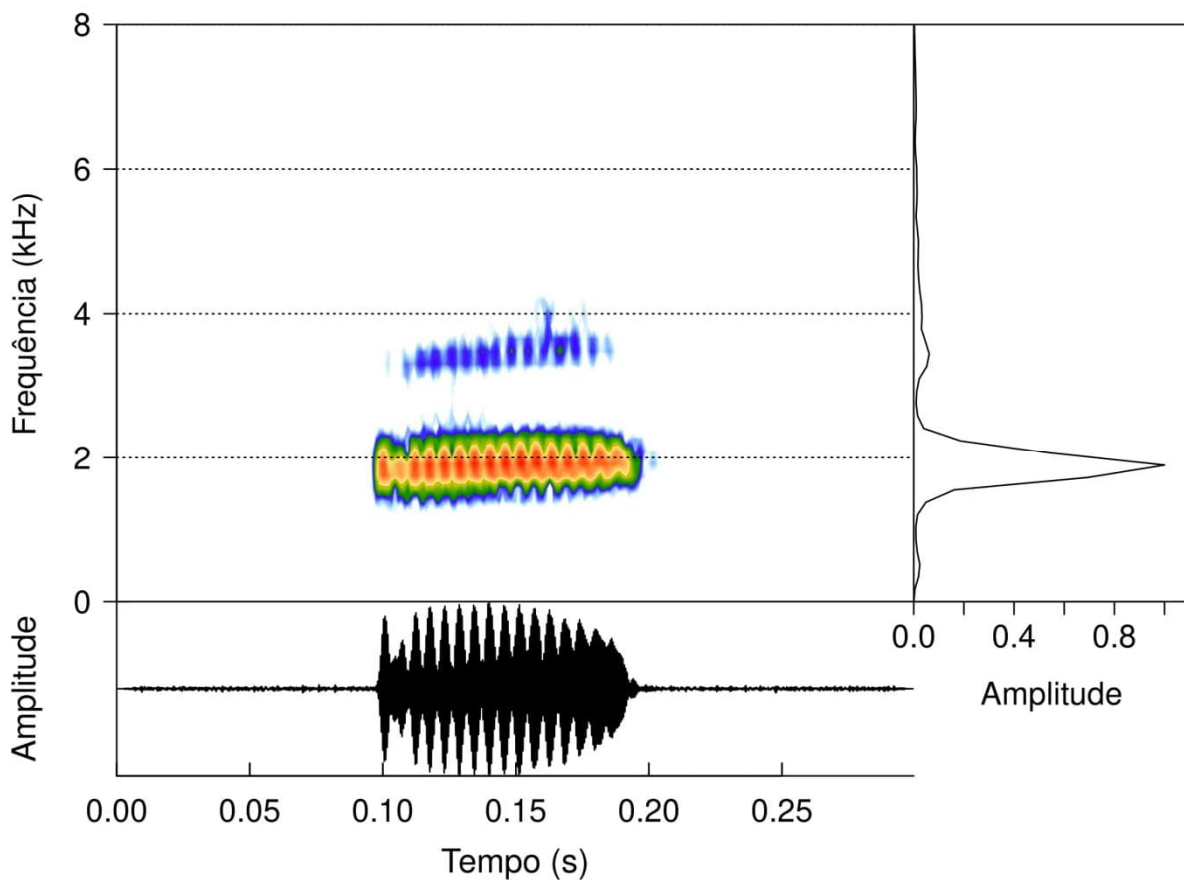
de 8.00-10.00 pulsos/canto ( $X=9.30\pm0.60$ ;  $n=336$ ), frequência fundamental de 1.461,70-1.821,70 Hz ( $X= 1.657,75\pm109.06$ ;  $n=336$ ); frequência dominante de 3.617,60-4.306,60 Hz ( $X= 3.954,41\pm120.03$ ;  $n=336$ ); duração do canto de 0.05-0.08 s ( $X=0.06\pm0.01$ ;  $n=336$ ); modulação de frequência de -2.69-6.26 Hz/s ( $X= 1.56\pm2.29$ ;  $n=336$ ) apresentando modulação de frequência na porção final do canto de 3.750,00-4.306,64 Hz ( $X= 4.048,70\pm187.03$ ;  $n=336$ ). O Call Rising Time (CRT) do canto é de 2.48-41.37 ms ( $X= 19.41\pm10.11$ ;  $n=336$ ), taxa de emissão de pulso de 60.78-160.88 pulsos/s ( $X= 143.19\pm9.55$ ;  $n=336$ ), taxa de emissão de canto de 0.93-3.34 cantos/s ( $X= 2.36\pm0.49$ ;  $n=336$ ) e um intervalo entre cantos de 0.24-1.01 s ( $X= 0.39\pm0.14$ ;  $n=336$ ). Sua representação gráfica pode ser conferida a partir dos sonogramas na Figura 15.



**Figura 15** – Sonogramas dos cantos de anúncio do *A. hylaedactyla*. Populações amazônicas.

O canto de anúncio do *Adenomera martinezi* a partir das populações gravadas do norte do país, região da Serra do Cachimbo localizado no Estado do Pará possui uma nota pulsada de 15.00-21.00 pulsos/canto ( $X=17.92\pm1.03$ ;  $n=543$ ) formada por 4.00-6.00 harmônicos ( $X=5.50\pm0.87$ ;  $n=543$ ). O canto do *Adenomera martinezi* possui frequência fundamental de 1.283,80-1.562,40 Hz ( $X= 1.385,53\pm75.92$ ;  $n=543$ ); frequência dominante

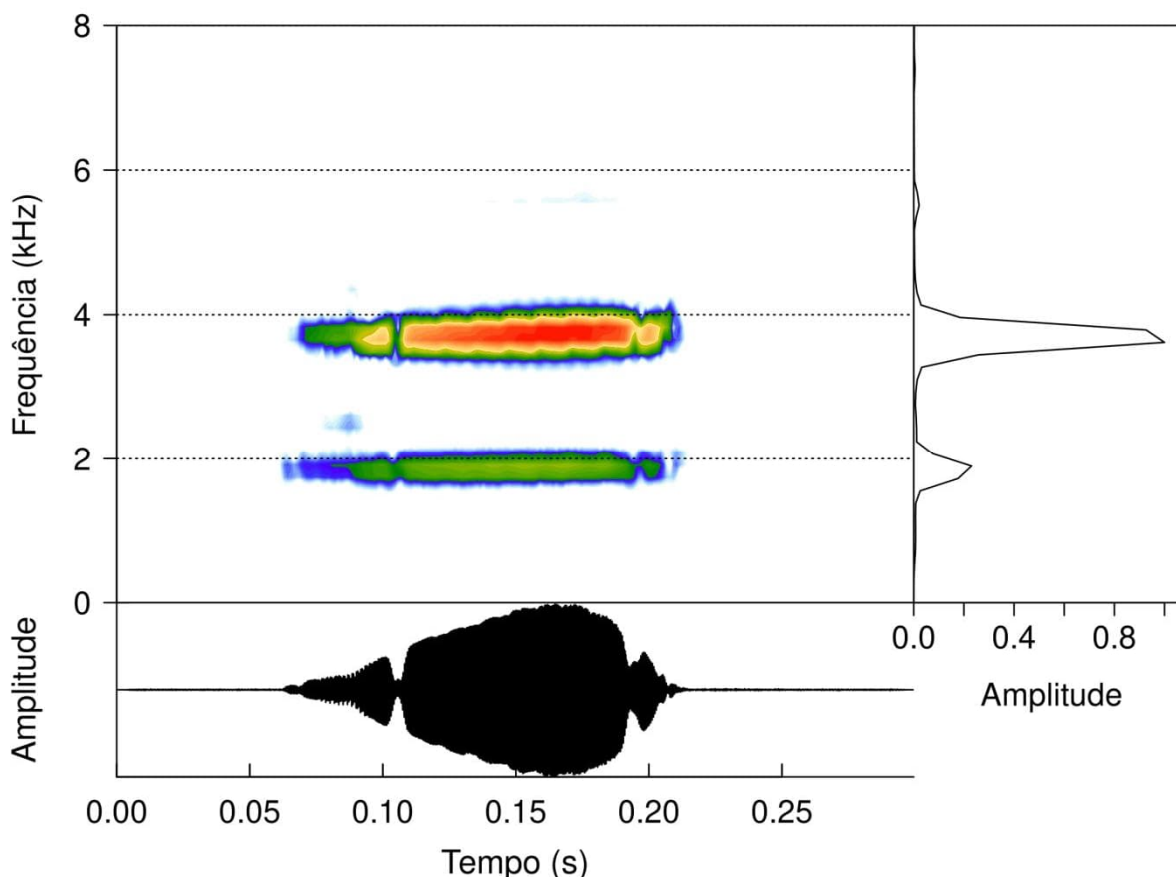
de 1.875,00-3.937,50 Hz ( $X= 2.333,91\pm 806.60$ ;  $n=543$ ); duração do canto de 0.08-0.13 s ( $X=0.11\pm 0.01$ ;  $n=543$ ) e não apresenta modulação de frequência no canto. O Call Rising Time (CRT) do canto é de 19.49-98.66 ms ( $X= 53.58\pm 15.41$ ;  $n=543$ ), taxa de emissão de pulso de 14.62-198.04 pulsos/s ( $X= 169.53\pm 11.45$ ;  $n=543$ ), taxa de emissão de canto de 0.87-2.48 cantos/s ( $X= 2.08\pm 0.29$ ;  $n=543$ ) e um intervalo entre cantos de 0.28-1.04 s ( $X= 0.39\pm 0.10$ ;  $n=543$ ). Sua representação gráfica pode ser conferida a partir dos sonogramas na Figura 16.



**Figura 16** – Sonogramas dos cantos de anúncio do *A. martinezi* (topotipo). Populações da Serra do Cachimbo.

O canto de anúncio do *Adenomera saci* a partir das populações gravadas no norte do país, município de Mateiros, estado do Tocantins possui uma nota harmônica formada por 6.00 harmônicos ( $n=250$ ). O canto do *Adenomera saci* possui frequência fundamental de 1.521,40-1.661,60 Hz ( $X= 1.622,00\pm 23.28$ ;  $n=250$ ); frequência dominante de 1.875,00-3.937,50 Hz ( $X= 3.607,88\pm 573.20$ ;  $n=250$ ); duração do canto de 0.10-0.17 s ( $X=0.15\pm 0.01$ ;  $n=250$ ); modulação de frequência de -13.81-13.48 Hz/s ( $X= 0.62\pm 4.02$ ;  $n=250$ )

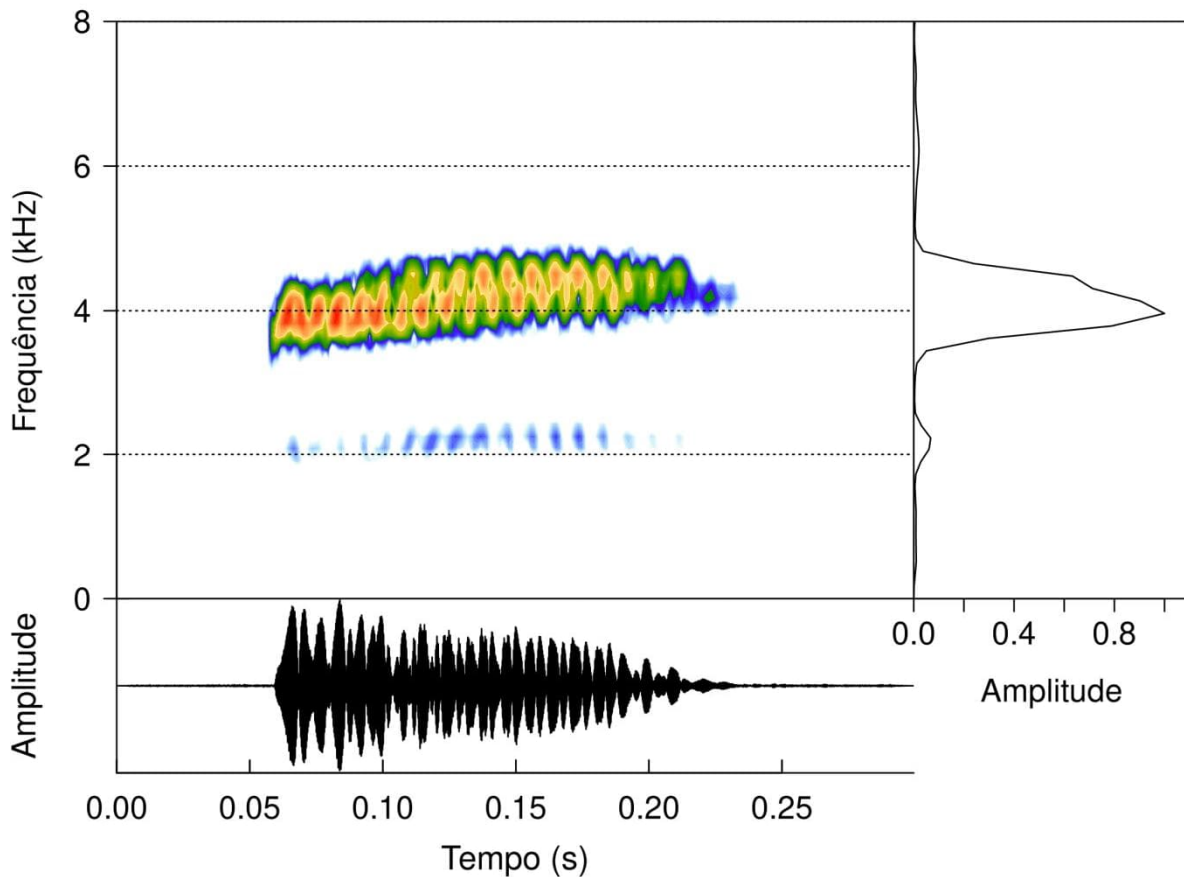
apresentando modulação de frequência na porção inicial do canto de 1.875,00-3.937,50 Hz ( $X= 3.517,69\pm680.85$ ;  $n=250$ ) e final do canto de 1.875,00-3.937,50 Hz ( $X= 3.617,46\pm575.89$ ;  $n=250$ ). O Call Rising Time (CRT) do canto é de 49.44-124.60 ms ( $X= 95.96\pm10.47$ ;  $n=250$ ), taxa de emissão de canto de 0.70-2.56 cantos/s ( $X= 1.66\pm0.25$ ;  $n=250$ ) e um intervalo entre cantos de 0.29-1.27 s ( $X= 0.47\pm0.13$ ;  $n=250$ ). Sua representação gráfica pode ser conferida a partir dos sonogramas na Figura 17.



**Figura 17** – Sonogramas dos cantos de anúncio do *A. saci*. Populações do centro oeste brasileiro.

O canto de anúncio do *Adenomera sp. nov.* (presente trabalho) a partir das populações gravadas no município do Salvador, estado da Bahia possui uma nota pulsada de 12.00-22.00 pulsos/canto ( $X=17.10\pm1.73$ ;  $n=1749$ ) formada por 3.00-7.00 harmônicos ( $X=4.51\pm0.83$ ;  $n=1749$ ). O canto do *Adenomera sp.* possui frequência fundamental de 1.296,70-1.989,10 Hz ( $X= 1.692,43\pm117.53$ ;  $n=1749$ ); frequência dominante de 3.617,60-4.651,20 Hz ( $X= 4.086,19\pm170.97$ ;  $n=1749$ ); duração do canto de 0.09-0.20 s ( $X=0.13\pm0.02$ ;  $n=1749$ ); modulação de frequência de -1.99-6.89 Hz/s ( $X= 0.99\pm1.27$ ;  $n=1749$ ) apresentando modulação de frequência na porção inicial do canto de 3.617,57-

4.651,20 Hz ( $X= 4.081,38\pm168.73$ ;  $n=1749$ ) e final do canto de 3.789,80-4.651,20 Hz ( $X= 4.211,83\pm175.38$ ;  $n=1749$ ). O Call Rising Time (CRT) do canto é de 0.05-924.39 ms ( $X= 26.63\pm28.81$ ;  $n=1749$ ), taxa de emissão de pulso de 1.78-187.49 pulsos/s ( $X= 131.84\pm14.11$ ;  $n=1749$ ), taxa de emissão de canto de 0.03-1.79 cantos/s ( $X= 0.77\pm0.25$ ;  $n=1749$ ) e um intervalo entre cantos de 0.44-11.24 s ( $X= 1.33\pm0.68$ ;  $n=1749$ ). Sua representação gráfica pode ser conferida a partir dos sonogramas na Figura 18.



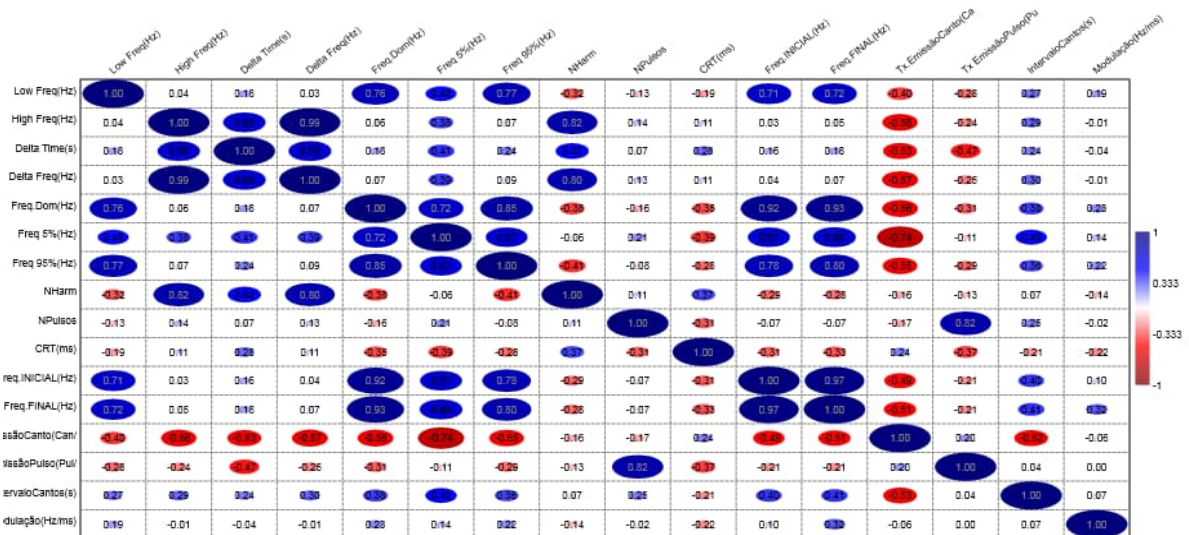
**Figura 18** – Sonogramas dos cantos de anuncio do *A. sp.* Populações de Salvador/Ba.

### 3.3 A partir de dados acústicos diretos (testes estatísticos).

#### 3.3.1 - Abordagem focada nos indivíduos (abordagem 02)

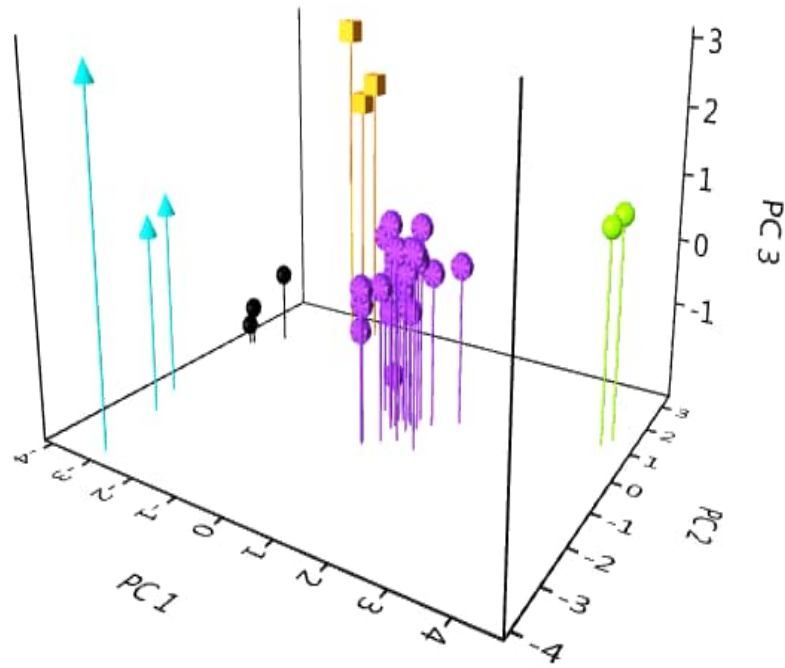
Os dados analisados nessa etapa partem inicialmente da matriz de dados brutos por onde foram levantados para cada canto mensurado um total de 16 parâmetros acústicos (temporais e espectrais). Para efeito de retirada de parâmetros espúrios e/ou redundantes garantindo a correlação dos dados adotou-se a retirada de parâmetros com valores de corte acima de 0.8 na correlação Pearson (Figura 19).



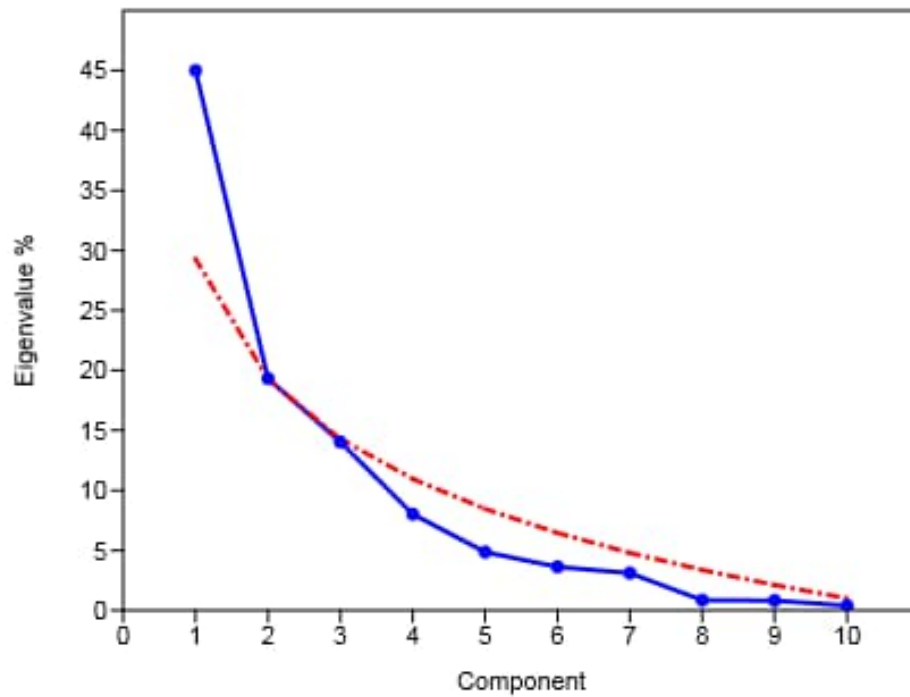


**Figura 19** – Valores de corte referentes a seleção de parâmetros de entrada após correlação par-a- par de Pearson.

Após construção de uma nova matriz de dados, agora levando em consideração 10 parâmetros acústicos que foram **i.**Frequência mínima (Hz); **ii.**Frequência máxima (Hz); **iii.**Duração do canto (s); **iv.**Frequência dominante (Hz); **v.**Frequência 5% (Hz); **vi.**Número de pulsos (nota); **vii.**Call Risig Time (ms); **viii.**Taxa de emissão de canto (s); **ix.**Intervalo entre cantos (s) e **x.**Modulação foi possível rodar a análise exploratória de dados focada nos dados dos indivíduos e/ou espécime gravados. Dessa forma como resultado da análise de componentes principais - ACP/PCA foi possível obter o componente 1 (PC1) como sendo o de maior poder explicativo para os nossos dados com 4.49992 de *eigenvalue* e 44.999% de variância. E os componente 2 (PC2) e o componente 3 (PC3) apresentaram respectivamente 1.93188 (19.319%) e 1.40312 (14.031) de *eigenvalue* e variância. Os gráficos 3d *scatter plot*, projeções dos componentes e *loadings*, assim como o *broken stick* podem ser conferidos nas figuras 20-25. Como padronização na construção dos gráficos associamos as cores verde para os dados acústicos referentes as espécie de *Adenomera thomei*, a cor roxa e/ou lilás para os dados acústicos referentes as espécie de *Adenomera sp. nov.*, a cor amarelo para os dados acústicos referentes as espécie de *Adenomera saci*, a cor preto para os dados acústicos referentes as espécie de *Adenomera martinezi* e a cor azul para os dados acústicos referentes as espécie de *Adenomera hylaedactyla*.



**Figura 20** – Projeção 3d scatter do PCA projetados dentro do programa Past ver.4.10.



**Figura 21** – Projeção do broken stick do PCA projetados dentro do programa Past ver.4.10.

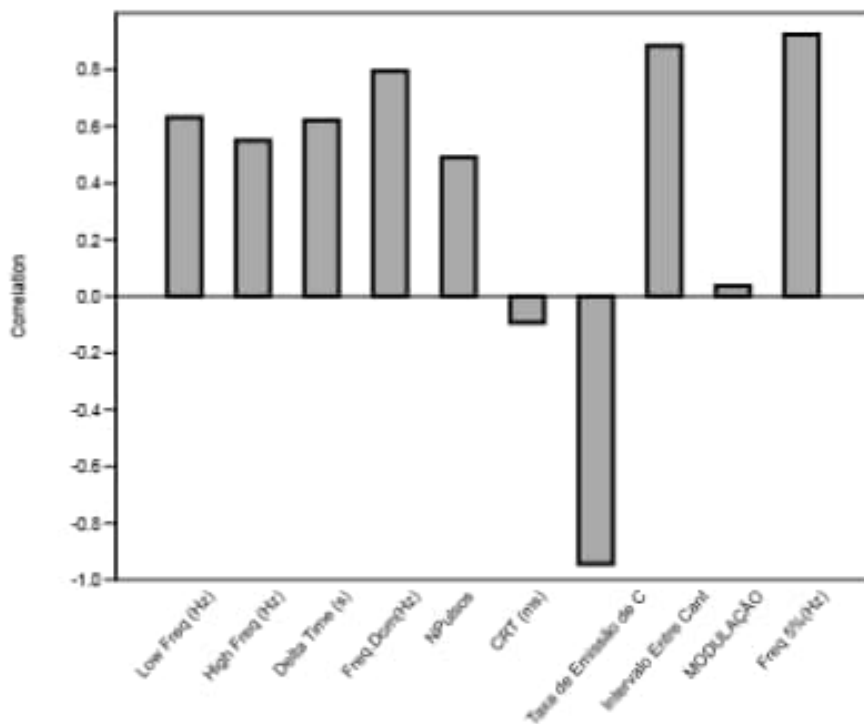


Figura 22 – Matriz de loadings do PC1 projetado dentro do programa Past ver.4.10

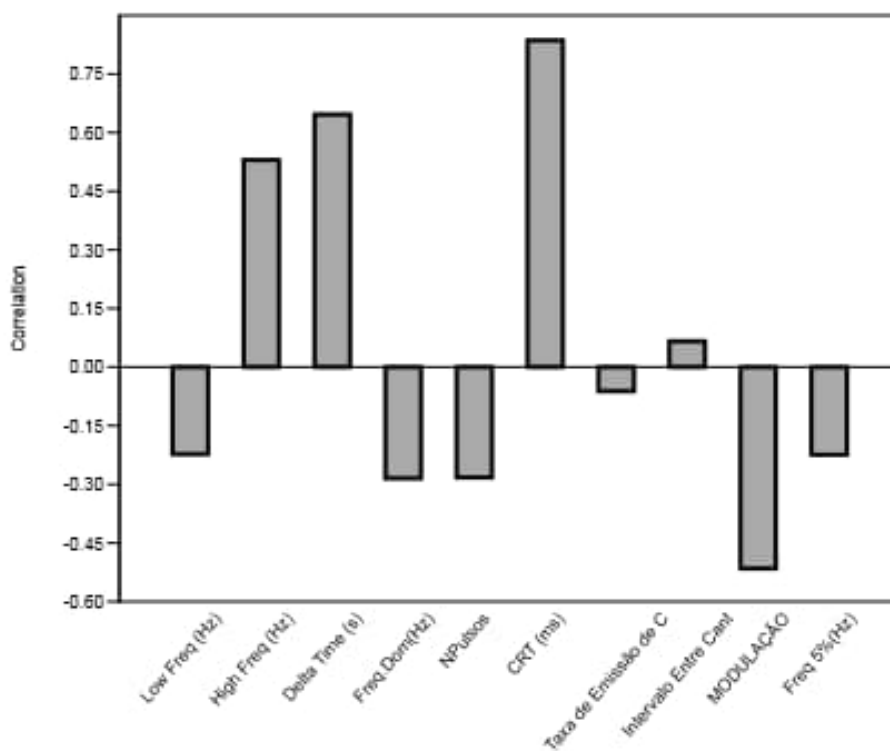
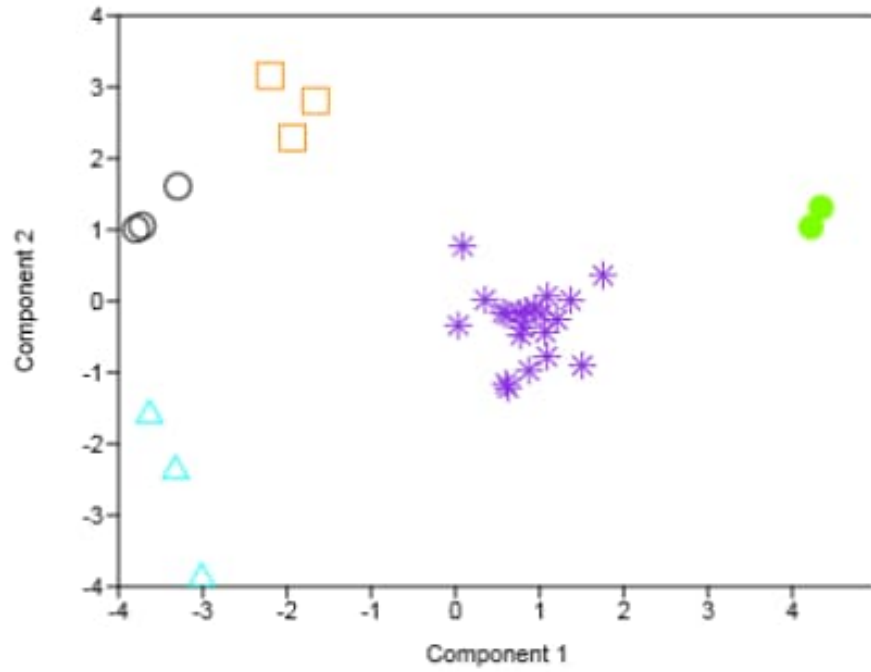
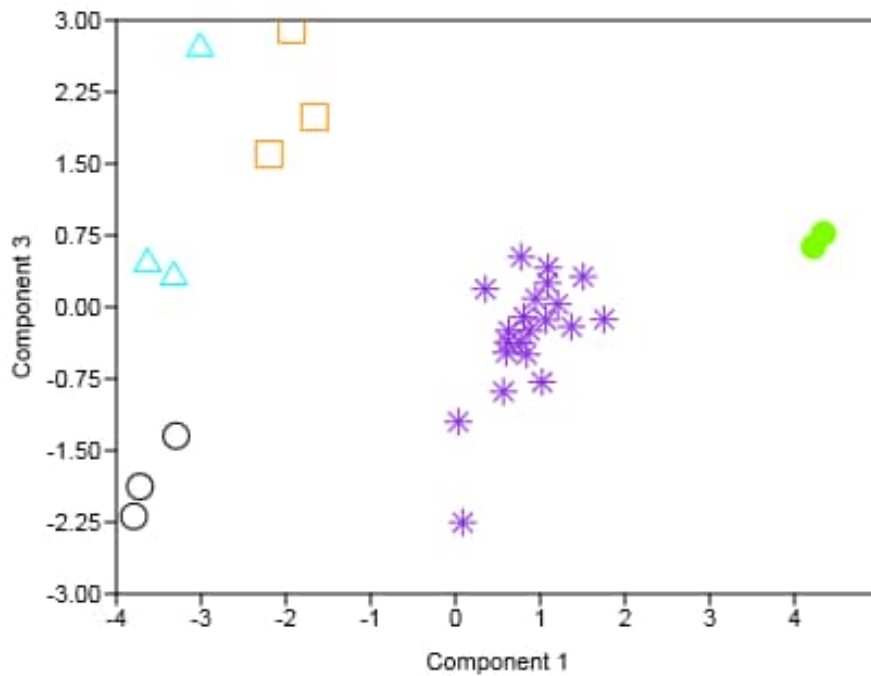


Figura 23 – Matriz de loadings do PC2 projetado dentro do programa Past ver.4.10.

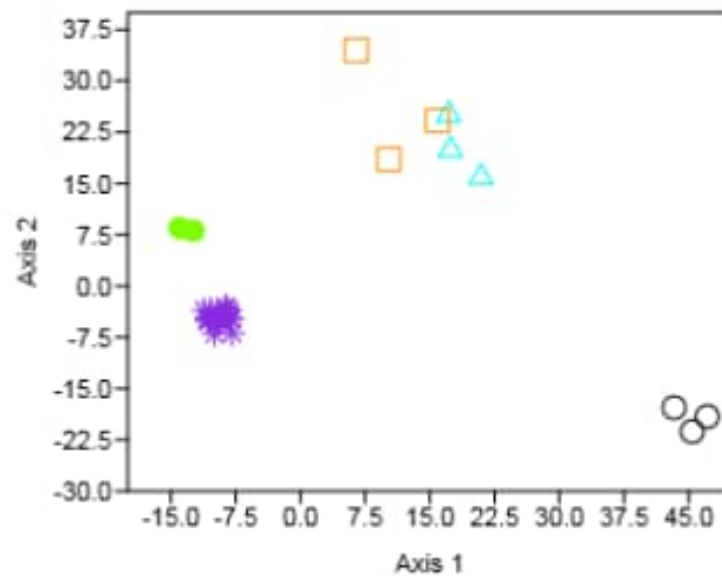


**Figura 24** – Projeção dos escores no PC1 e PC2 dentro do programa Past ver.4.10.

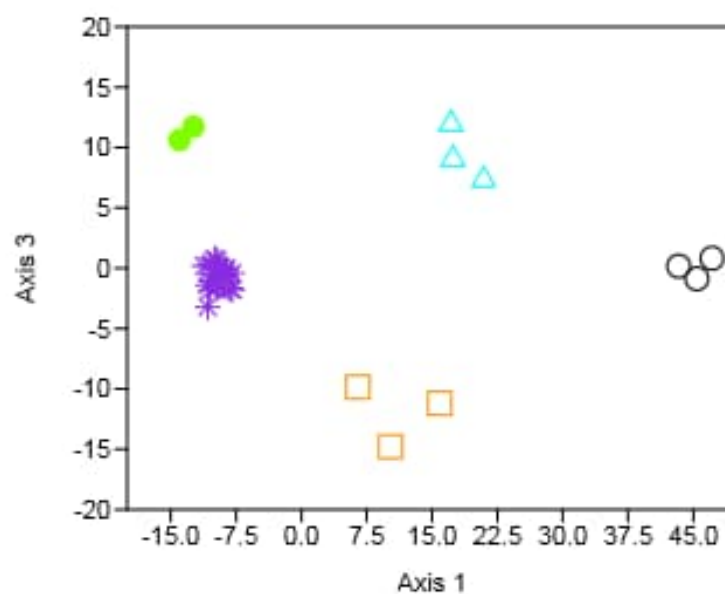


**Figura 25** – Projeção dos escores no PC1 e PC3 dentro do programa Past ver.4.10.

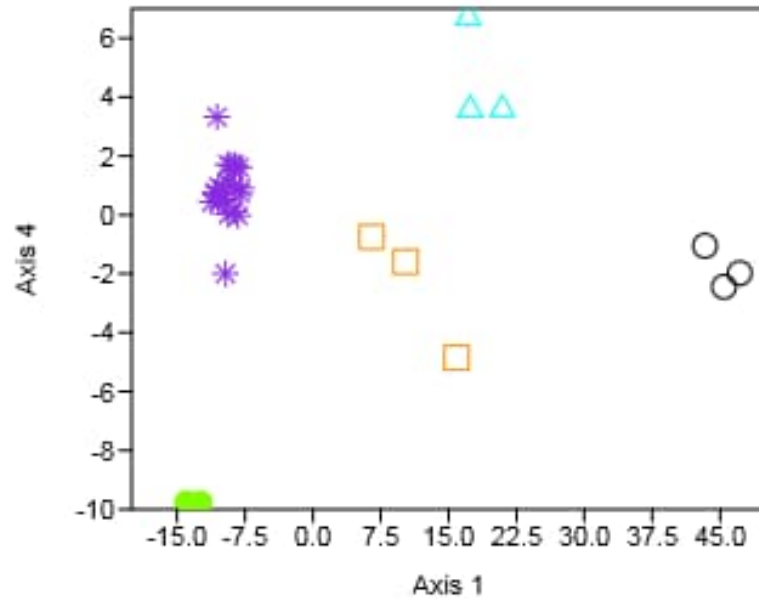
Como resultado da Análise Discriminante Linear - LDA gerada a partir dos escores obtidos no PCA foi possível obter o eixo 1 como sendo o de maior poder explicativo para os nossos dados com 489.92 de eigenvalue e 59.87% de variância. Os eixos 2, 3 e 4 apresentaram respectivamente 259.05 (31.66%); 49.948 (6.104%) e 15.848 (1.937%) de eigenvalue e variância. A matriz de confusão gerada a partir da análise discriminante obteve 100% de classificação e 65.63% com jackknifed. As projeções dos eixos podem ser conferidos nas figuras 26-28.



**Figura 26** – Projeção dos escores no Eixo 1 e Eixo 2 dentro do programa Past ver.4.10.

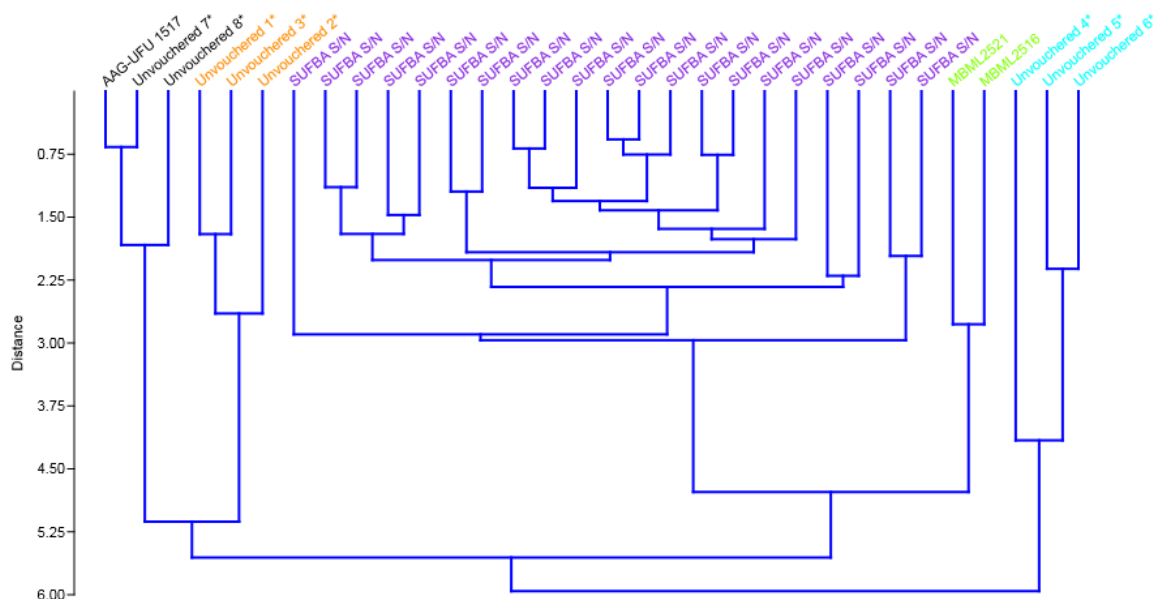


**Figura 27** – Projeção dos escores no Eixo 1 e Eixo 3 dentro do programa Past ver.4.10.

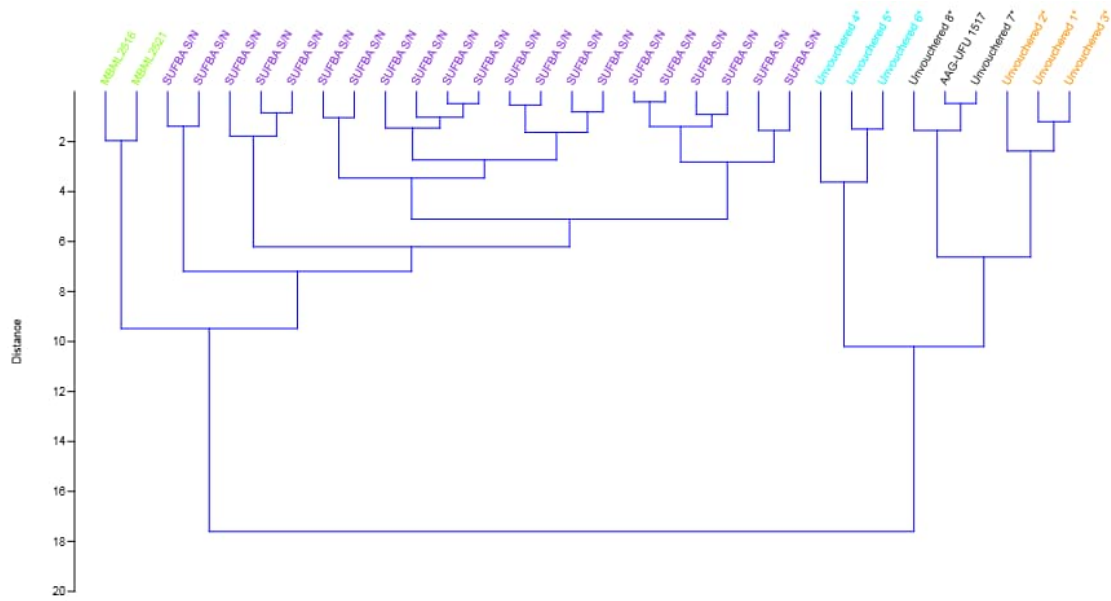


**Figura 28** – Projeção dos escores no Eixo 1 e Eixo 4 dentro do programa Past ver.4.10.

Como última etapa prevista para a abordagem 02 focada nos espécimes mensurados foi possível, na análise de agrupamento, clusterizar os dados utilizando os escores obtidos na etapa inicial de análise de agrupamento ACP/PCA. Os dendrogramas foram gerados através dos algoritmos UPGMA com index euclidiano que obteve coeficiente de correlação 0.9242 (Figura 29) e pelo método de Ward que apresentou coeficiente de correlação de 0.851(Figura 30).



**Figura 29** – Cluster produzido a partir do algoritmo UPGMA dentro do programa Past ver.4.10.



**Figura 30** – Cluster produzido a partir do método WARD dentro do programa Past ver.4.10.

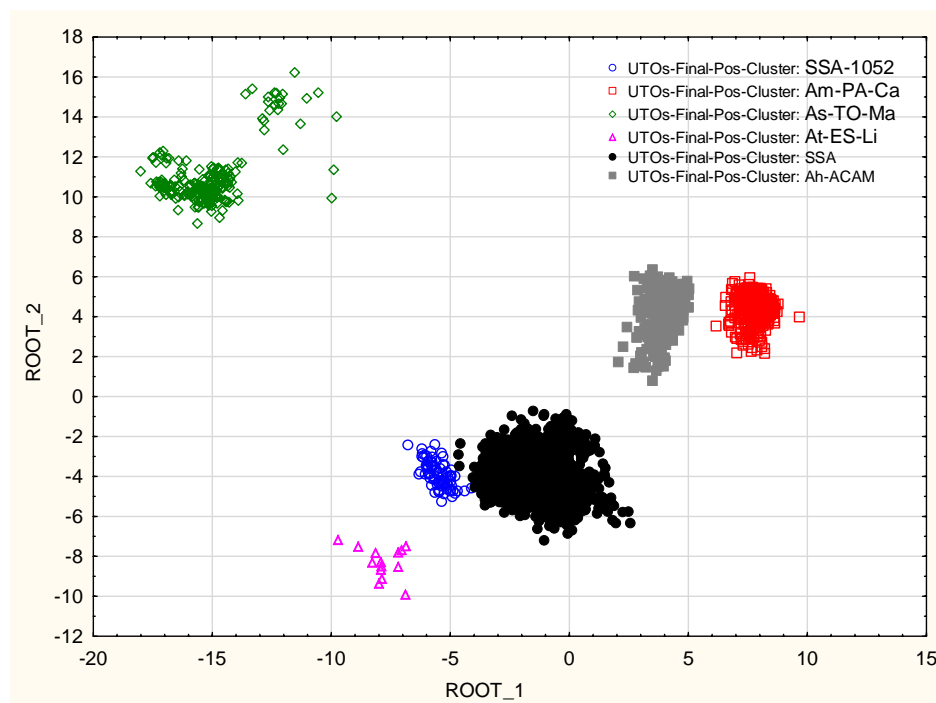
### 3.3.2 - Abordagem focada nos cantos dos indivíduos (abordagem 01)

A análise discriminante múltipla proposta para a etapa das análises dos dados diretos seguiu o protocolo modificado de Seifert *et al.*, (2013) e a distância euclidiana entre os objetos da análise (cantos) foram calculadas de forma aleatória inicialmente. A matriz de centróides produzida na análise das variáveis canônicas - CVA foi corrigida na análise de cluster generalizada K-médias. E através desse método foi possível gerar os agrupamento de dados que o modelo generalizado do programa Statistica apontou como sendo um total de seis (06) clusters. Após as análise de agrupamento foi possível extrair cinco eixos e/ou raízes significativas a partir de uma segunda análise discriminante que foi feita onde foram identificados cinco (05) eixos canônicos com poder de explicação para os nossos dados. Todos os eixos apresentaram  $\alpha < 0.05$  e foram submetidos ao método de correção de bonferroni (5 eixos / 50 comparações =  $\alpha < 0.001$ ). Dos cinco eixos canonicos identificados o primeiro eixo apresentou o eigenvalue de 35.053. Já os eixos 2, 3, 4 e 5 apresentaram o eigenvalue de 25.919; 17.199; 0.180 e 0.063 respectivamente. Como padronização na construção dos gráficos associamos as cores azul e preto para a espécie *Adenomera sp. nov.*, vermelho para as espécies de *Adenomera martinezi*, verde para as espécies de *Adenomera saci*, rosa para as espécies de *Adenomera thomei* e cinza

para as espécies de *Adenomera hylaedactyla*. A classificação dos objetos dentro dos grupos e a projeção dos escores canônicos podem ser conferidos nas figuras 31-35. E por fim, para efeito de explicação da correlação entre os parâmetros acústicos e seus respectivos eixos canônicos, foi feita uma última análise discriminante múltipla similar a MANOVA adotando o limiar de correlação de 0.5 e/ou 50%. Os valores de correlação podem ser conferidos na tabelas 1.

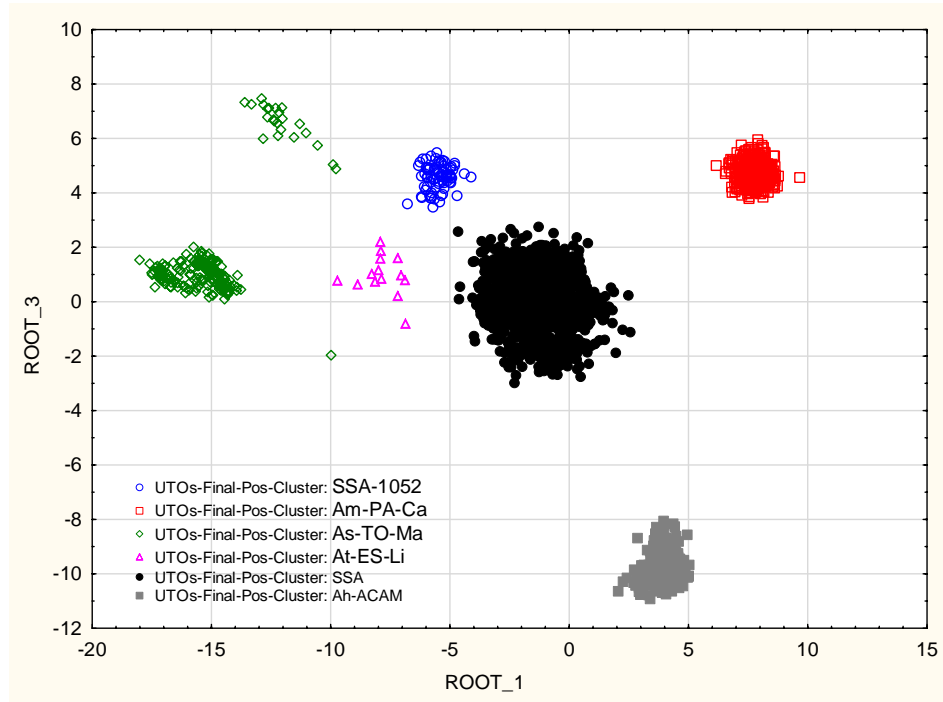
VARIÁVEIS	ROOT_1	ROOT_2	ROOT_3	ROOT_4	ROOT_5
Número de pulsos	0.562440	-0.685935	0.396457	0.040156	-0.108019
Taxa de emissão de canto	0.456857	0.798382	-0.187402	0.125052	-0.254119
Modulação	-0.106057	-0.114613	-0.217275	0.429299	-0.075650
CRT (ms)	-0.258062	0.610662	0.402349	-0.520684	-0.267881
Intervalo entre cantos (s)	-0.296242	-0.677659	0.050742	-0.202406	0.221813
Frequência máxima (Hz)	-0.444458	-0.361247	0.751571	0.073339	-0.027850
Frequência 5% (Hz)	-0.447458	-0.789888	-0.062778	-0.030600	0.044923
Frequência mínima (Hz)	-0.461281	-0.463252	-0.442903	-0.178828	0.024767
Frequência dominante (Hz)	-0.580486	-0.584647	-0.574981	-0.033295	-0.119940
Duração do canto (s)	-0.610699	-0.316437	0.593705	0.073990	-0.109235

**Tabela 1** – Escores dos parâmetros e eixos canônicos pós-análise de agrupamento.

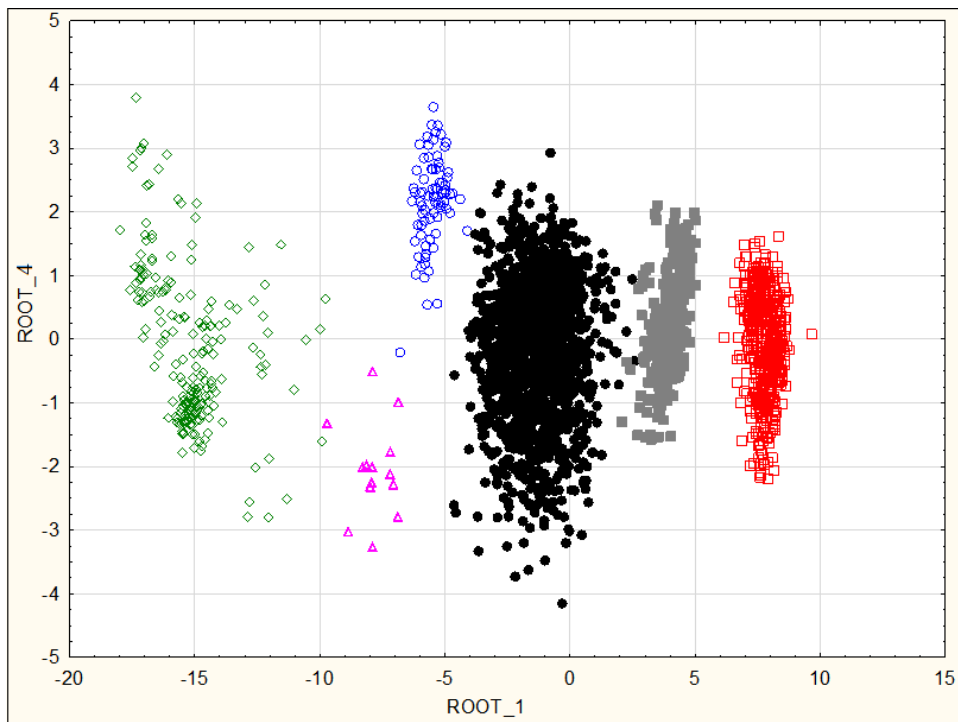


**Figura 31** – Projeção dos escores das variáveis canônicas gerado no Statistica.

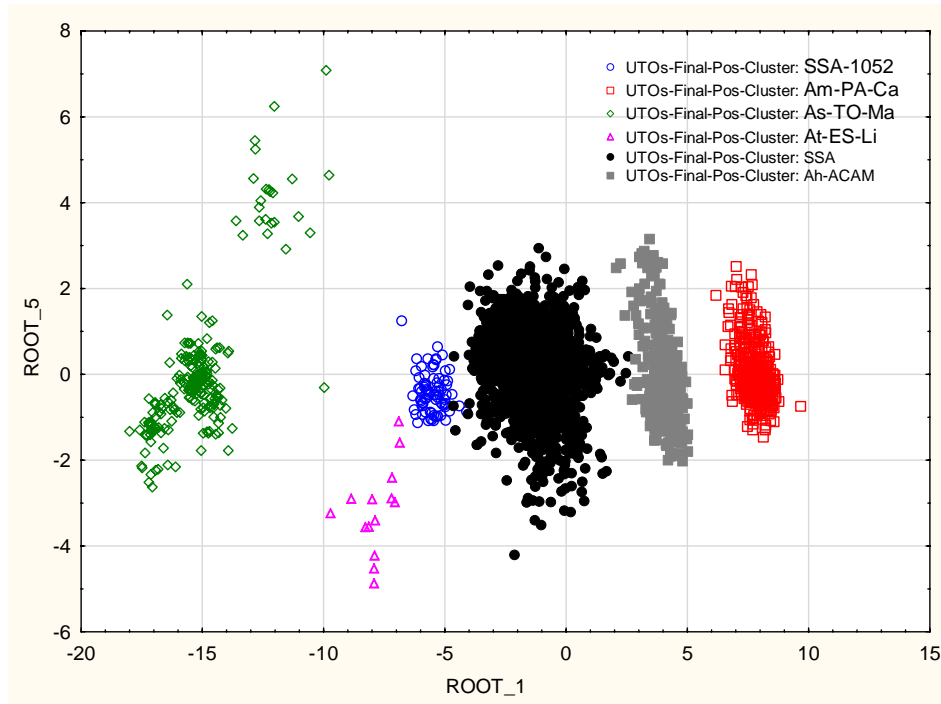




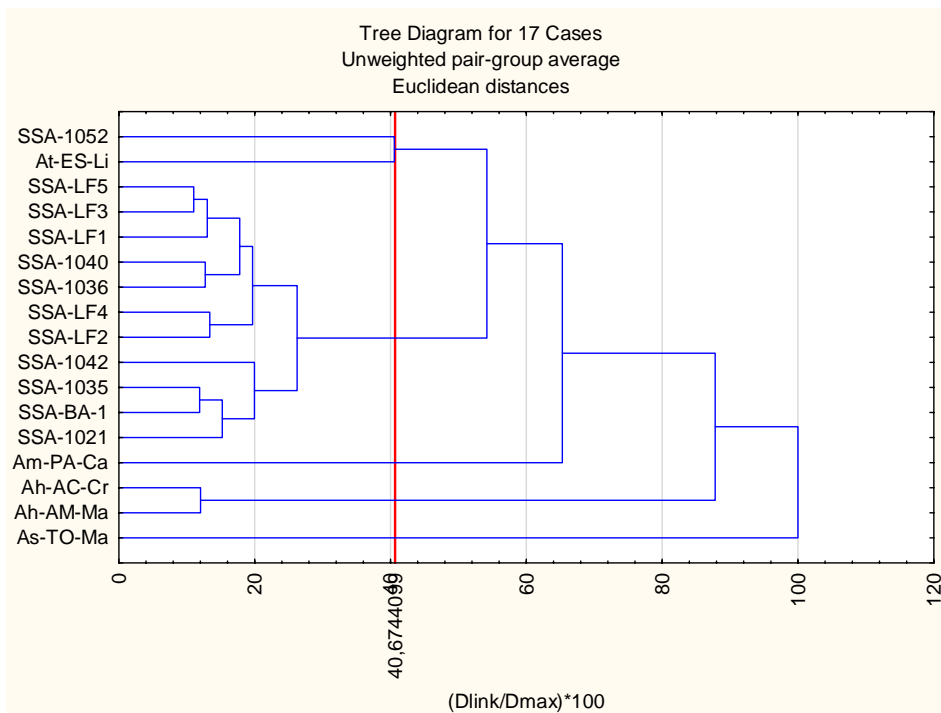
**Figura 32** – Projeção dos escores das variáveis canônicas gerado no Statistica.



**Figura 33** – Projeção dos escores das variáveis canônicas gerado no Statistica.



**Figura 34** – Projeção dos escores das variáveis canônicas gerado no Statistica.



**Figura 35** – Entidades morfológicas hipotéticas. Análise de agrupamento gerado no Statistica.

Para o teste de hipótese e das entidades morfológicas hipotéticas geradas foram feitas comparação entre os grupos com a análises de dissimilaridade efetuada por meio dos cálculos da distância de Mahalanobis e para a análise de variância entre os grupos

foram calculados os valor-F do teste de Fisher além dos cálculos dos níveis de significância do autovalor-P. Os valores podem ser conferidos nas tabelas 2-4.

#### **DISTÂNCIA DE MAHALANOBIS**

UTO's	SSA-1052	Am-PA-Ca	As-TO-Ma	At-ES-Li	SSA	Ah-ACAM
SSA-1052	0.0000	252.3492	327.2649	63.0222	44.9485	363.8473
Am-PA-Ca	252.3492	0.0000	576.3713	436.0241	176.8767	219.8993
As-TO-Ma	327.2649	576.3713	0.0000	437.1445	418.7993	534.7251
At-ES-Li	63.0222	436.0241	437.1445	0.0000	77.1099	427.0061
SSA	44.9485	176.8767	418.7993	77.1099	0.0000	189.2109
Ah-ACAM	363.8473	219.8993	534.7251	427.0061	189.2109	0.0000

**Tabela 2** – Distância de Mahalanobis baseado na distância dos centróides.

#### **TESTE-F DE FISCHER**

UTO's	SSA-1052	Am-PA-Ca	As-TO-Ma	At-ES-Li	SSA	Ah-ACAM
SSA-1052		1924.088	2072.723	83.0188	372.679	2565.878
Am-PA-Ca	1924.088		9528.684	658.9164	7622.136	4952.803
As-TO-Ma	2072.723	9528.684		634.9528	8385.327	7516.771
At-ES-Li	83.019	658.916	634.953		118.415	635.068
SSA	372.679	7622.136	8385.327	118.4146		5588.822
Ah-ACAM	2565.878	4952.803	7516.771	635.0679	5588.822	

**Tabela 3** – Teste F de Fischer. Comparação da variância entre amostras (df=9,2575).

#### **NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA**

UTO's	SSA-1052	Am-PA-Ca	As-TO-Ma	At-ES-Li	SSA	Ah-ACAM
SSA-1052		0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Am-PA-Ca	0.00000		0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
As-TO-Ma	0.00000	0.00000		0.00000	0.00000	0.00000
At-ES-Li	0.00000	0.00000	0.00000		0.00000	0.00000
SSA	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000		0.00000
Ah-ACAM	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	

**Tabela 4** – Nível de significância e autovalor-P. Valores ajustados Bonferroni (alfa < 0.001).

#### 4 - DISCUSSÃO

As comparações bioacústicas que envolveram em primeiro plano o sinal acústico do *Adenomera sp.* feitas no presente trabalho foram concebidas dentro de um arcabouço teórico de dados filogeográficos levantados para as espécies que atualmente habitam áreas abertas (grupo *Adenomera hylaedactyla* e *Adenomera martinezi*) e áreas florestadas (grupo *Adenomera thomei* e *Adenomera marmorata*). Dentro desse escopo foi desenvolvida e testada a nossa hipótese taxonômica a cerca dos padrões acústicos do canto de anúncio encontrados em *Adenomera sp.* além de copiar as variações acústicas entre grupos e até mesmo, e o limiar das variações temporais e espectrais referente ao canto de anúncio entre os grupos mais próximos. Para isso foi possível recorrer a duas abordagens nas análises estatísticas dos dados que levaram em consideração, como objeto principal, o indivíduo (abordagem 02) e os cantos de cada indivíduo (abordagem 01). Por esses caminhos foi possível expor as proximidades acústicas entre os grupos irmãos que compartilham histórias de dispersão e vicariância a mais de 20 Ma de anos.

Atualmente é sabido que as espécies de *Adenomera thomei* (Localidade tipo em Linhares - ES) encontram-se distribuídas por áreas de floresta atlântica que vão desde o litoral a sudeste do Espírito Santo, centro oeste de Minas Gerais, chegando aos remanescentes de mata atlântica alocados no recôncavo sul da Bahia com localização para a Serra da Jibóia. O *Adenomera saci* (Localidade tipo do Alto Paraíso - GO) pode ser encontrado associado a afloramentos rochosos e restingas de palmeiras típicos dos ambientes de cerrado do centro-oeste Brasileiro (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás) se estendendo mais ao norte nos estados do Tocantins e sul do Maranhão. Já o *Adenomera martinezi* é conhecido apenas através de sua localidade-tipo localizada a sudoeste do estado do Pará na Serra do Cachimbo. E por fim o *Adenomera hylaedactyla* que possui ampla distribuição pelas florestas da América do Sul. Essa última espécie encontra-se distribuída através do sudeste da Colômbia e Venezuela, a leste pelas Guianas, ao sul entrando em direção ao norte, leste e centro do Brasil, além de se distribuir pelo sul através das florestas Equatoriana e Peruana até a Bolívia mas, assim como o *A. martinezi*, a sua localidade-tipo é altamente imprecisa e abrange amplas áreas compreendidas por afluentes de rios da floresta Amazônica do Peru e do Equador (Frost 2022).

Esses dados de distribuição geográfica das espécies, fora de um contexto evolutivo e biogeográfico, pouco e/ou quase nada nos dizem, e por isso os registros exatos das localidades-tipo nas coleções zoológicas se tornam um dado essencial para os estudos e revisões taxonômicas. Sendo assim as distribuições geográficas supra podem ser compreendidas como sendo o resultado de lentos processos que aconteceram durante os últimos 200 milhões de anos. E esses acontecimentos foram compreendidos pela comunidade científica através de meios indiretos de pesquisa que levavam em consideração a construção de cenários históricos baseados em dados do registro fóssilífero dos grupos mais modernos de anuros, do entendimento das configurações continentais advindas da interpretação de gráficos paleogeográficos (Barron *et al.*, 1981) e da compreensão sobre a distribuições das zonas paleoclimáticas que se estabeleceram outrora no globo. E especificamente, no caso dos Leptodactylidae, esses eventos macroevolutivos remetem a aproximadamente 36 milhões de anos o que joga o surgimento da família para muito antes do soerguimento do istmo do Panamá que passou a conectar através de rotas terrestres a América Central com a América do Sul.

Na América do Sul muitos gêneros de Leptodactylidae se dispersaram através das terras baixas do escudo brasileiro antes mesmo do Eoceno (54 Ma) e nessas áreas alguns eventos de especiação ocorreram especialmente entre o Paleoceno (65 Ma) e o Mioceno (23 Ma) (Duellman & Trueb, 1994). Fazendo um paralelo direto com os resultados das análises biogeográficas *multi-loci* demonstrada por Fouquet *et al.* (2014) é possível sugerir que as especiações que permearam a história evolutiva do Clado Thomei em questão aparentam estar associadas aos surgimento dos refúgios do Pleistoceno propostos por Carnaval *et al.*, (2008). E dentro desse contexto é possível reconhecer o sucesso evolutivo dos Lepdotactylids primitivos como sendo um dos principais grupos que obtiveram a maior irradiações ao longo da América do Sul sendo estes, especialmente diversos nas terras baixas tropicais a leste dos Andes, exatamente nas regiões por onde as espécies de Adenomera apresentam distribuição nos dias atuais. Segundo o autor a Floresta Amazônica se demonstra como sendo o centro de origem para este gênero, sugerindo a partir de inferências filogeográficas três possíveis rotas de dispersão através da diagonal seca brasileira que possam responder pelos padrões de diversificação das espécies conhecidas atualmente (Fouquet *et al.* 2014).

Baseando-se na história evolutiva do gênero *Adenomera* que pode ser contada através da dinâmica biogeográfica e dos processos ambientais envolvendo o continente sul americano e os processos de especiação dos clados *Martinezi*, *Hylaedactyla*, *Saci*, *Thomei* que o presente trabalho se justifica dentro de um contexto histórico-evolutivo, testando os limites conhecidos para essas espécies através da bioacústica. Somado a isso é possível notar que os indivíduos que ocorrem nos remanescentes de floresta atlântica que foram amostrados dentro do perímetro urbano de Salvador demonstraram possuir padrões morfológicos e acústicos bastante similares aos encontrados entre as espécies nominais desses grupos. Mediante a tamanhas semelhanças fenéticas, a existência de uma biodiversidade críptica ainda desconhecida para o gênero assim como o desconhecimento dos reais limites de distribuição do *Adenomera thomei* na Bahia e a conectividade histórica entre as duas grandes florestas brasileiras que a relação entre os sinais acústicos do *Adenomera sp.* foi testado entre grupos irmãos próximos e não dentro do clado Mata Atlântica haja vista que procuramos por padrões evolutivos gerais e não específicos associados ao canto de anúncio.

Essas espécies apresentam histórias evolutivas únicas que foram deflagradas dentro de um contexto global singular que remontam a eventos pretéritos das eras geológicas como o Mioceno, Pleistoceno e Plioceno. Momentos únicos em que as alterações climáticas globais se tornaram as principais responsáveis pela dinâmica de expansão e retração da cobertura florestal nos continentes das floresta amazônica e floresta atlântica. A relação e a conexão entre esses dois biomas pode ser entendida dentro do contexto de interglaciações e glaciações respectivamente, gerando a partir desses fenômenos condições para a atuação dos mecanismos de seleção natural sobre as espécies de anfíbios anuros, que resultou na ocupação e/ou permanência das áreas abertas e fechadas geradas através desses processos e constatadas nos dias atuais (Duellman & Trueb, 1994). Talvez esse seja o ponto de conexão entre os processos macroevolutivos e a falta de correlação entre características fenéticas e ambientais que foram apontadas por Carvalho (2017) em sua tese de doutorado. Talvez essa seja a linha de raciocínio capaz de explicar o aparecimento e a perda de estruturas pulsionadas assim como a perda de modulação de frequência no canto de anúncio de espécies dentro do gênero haja vista que essas características foram selecionadas dentro de contextos ambientais distintos e diferentes dos que são vistos atualmente.

Para nós a explicação fornecida através da hipótese de adaptação acústica (Pijanowski, 2011) entra em consonância direta com as alterações espectrais e temporais vistas nos cantos de anúncio do *Adenomera sp.* e demais espécies, sendo, com isso, o resultado direto da seleção ambiental sobre esse caráter, atuando evolutivamente como um verdadeiro filtro ambiental, selecionando nos ambientes os sinais acústicos que apresentam maior eficiência de propagação no meio. Essa hipótese traça caminhos explicativos para entendermos, com isso, a supressão e/ou perda de modulação da frequência em espécies que se diversificaram a partir de áreas abertas mas que, devido a dinâmica climática do Pleistoceno, atualmente residem em áreas florestadas. Essa influência ambiental, capaz de gerar adaptações acústicas através da seleção ambiental também podem ser reconhecidas nas populações de Salvador reiterando a explicação das alterações acústicas percebidas entre as espécies foco através da hipótese de adaptação acústica (Pijanowski, 2011). Essas espécies parecem ter surgido a partir de ambientes florestais haja vista que ocupam preferencialmente bordas dos remanescentes de mata atlântica e apresentam cantos de anúncio com o sinal mais baixos (graves) e de baixa modulação de frequência quando comparado a espécie que se diversificaram primeiro mas que atualmente ocupam áreas abertas a exemplo do *A. hylaedactyla* (Figura 07 e 08) (Fouquet *et al.* 2014).

Assim como os dados referentes a distribuição geográfica aqui expostos para as espécies não podem ser interpretados isoladamente e/ou fora de contexto dos fatos biogeográfico e evolutivo. Os dados acústicos aqui mensurados e comparados não podem ser interpretados fora da lógica multidimensional responsável por estruturar o sistema de comunicação dos anfíbios anuros nos ambientes. E caso essas interpretações se encontrem descoladas dos significados biológicos desses sinais acústicos *sensu* Haddad (1995) os valores mensurados aqui expostos não passam de números frios relacionados as mínimas, máximas, médias e desvios padrões alijados da capacidade de explicação das espécies sobre o viés hipotético do pesquisador. Sabendo disso devem ser levados em consideração nas análise comparativas dos gráficos plotados nas figuras 5-13 a notória falta de padronização mensurativa entre os dados das espécies nos trabalhos científicos os quais possuíam em algum nível de análise a incorporação de dados acústicos das espécies de *Adenomera*. E quando comparamos os parâmetros acústicos isoladamente perceberemos que sobreposições parciais inter-específicas aconteceram entre os clados *Martinezi*, *Hylaedactyla*, *Saci* e *Thomei*.

É de se esperar que as características acústicas de grupos próximos e que possuem históricos de biodiversidade críptica também sejam pouco discriminantes acusticamente e não são raros os casos de sobreposições entre os parâmetros acústicos entre os clados analisados e com os demais. Essas semelhanças levantadas podem ser percebidas na figura 8 relativa a frequência dominante (Hz) dos *Adenomera sp.*, *Adenomera martinezi*, na figura 9 relativa a duração do canto (s) entre as espécies de *Adenomera saci*, *Adenomera thomei*, na figura 10 relativa ao tempo de subida do canto - CRT (ms) entre as espécies *Adenomera sp.*, *Adenomera hylaedactyla*, *Adenomera martinezi*, na figura 11 relativa ao intervalo dos cantos (s) entre as espécies *Adenomera sp.* e *Adenomera thomei*, na figura 12 relativa a taxa de emissão do canto (cps) entre as espécies *Adenomera sp.* e *Adenomera thomei*, na figura 13 relativa ao número de pulsos (s) entre as espécies *Adenomera sp.* e *Adenomera martinezi*. Essas são medidas unidimensionais que apresentam pouco poder explicativo se analisadas isoladamente e/ou fora de um contexto biológico lógico que leve em consideração as variâncias e covariâncias.

Já dentro de um contexto natural que se demonstra essencialmente multifatorial, esses parâmetros acústicos podem integrar e contribuir na formação de padrões estruturais, temporais e espectrais dos sinais acústicos integrando completamente o sistema de comunicação dos grupos de anuros aqui estudados. A análise desses parâmetros acústicos fora desse escopo multidimensional pouco nos tem a revelar sobre as entidades biológicas que hipotetizamos e conceituamos aqui como provável nova espécie para o gênero *Adenomera*. E nesse sentido como medida para contornar essa situação foram feitas as análises de agrupamento PCA/ACP, análise discriminante linear LDA, análises de agrupamentos baseado na distância dos centróides e análise discriminante múltipla com o intuito de levantar e confirmar a morfoespécie apontada para o município do Salvador, estado da Bahia.

Para a análise exploratória dos dados assim como para as análises de teste de hipótese das duas abordagens propostas neste trabalho assumimos como identificação taxonômica incerta os indivíduos oriundos da população localizada nas bordas de fragmentos de mata atlântica que foram amostrados para o município de Salvador em entre 2019-2022. Essa decisão se baseou na ausência de características discriminantes entre as espécies e nas semelhanças morfológicas expostas através do artigo de descrição da



espécie *Adenomera thomei* (Almeida *et al.*, 2006). Também foram levado em consideração os dados biogeográficos referente a distribuição das espécies próximas que apontam proximidades entre as localidades das populações identificadas como sendo linhagens do clado Thomei (*Adenomera L* e *Adenomera M*) ao sul e populações de *Adenomera Hylaedactyla* ao norte de Salvador/Ba que acabaram se estabelecendo nas regiões mais setentrionais do nordeste Brasileiro e que exercem influencias diretas sobre a condição monofilética do clado Mata Atlântica *sensu* Fouquet (2014). Esses dados geradores de incertezas taxonômicas tornaram necessários os procedimentos analíticos aqui adotados uma vez que existe uma flagrante falta de dados que incluam nas bases de dados analíticas mais atuais as informações morfológicas e acústicos das populações de Salvador e do litoral norte pois essas apresentam um tímbre vocal distinto quando comparada entre as espécies analisadas.

A qualidade do som diagnosticado a ouvidos humanos pôde ser estudada mais de perto e como resultado da abordagem 02 que estava focada nos indivíduos vocalizantes foi possível separar os grupos de *A. hylaedactyla*, *A. martinezi*, *A. saci*, *A. thomei* e *A. sp* através dos componentes principais do ACP/PCA e dos eixos canônicos da LDA como pode ser visto nas figuras 24-28. Referente as análises do PCA de um total de 10 componentes os que mais contribuíram na explicação dos dados foram o PC1, PC2 e PC3 com eigenvalue de 4.49992, 1.93188 e 1.40312 respectivamente sendo o PC1 o único componente que apresentou a correlação suficientemente forte conforme análise do *brokenstick* plotado na figura 21. Já os parâmetros acústicos que mais contribuíram na formação e/ou estruturação do PC1 foram **i.** taxa de emissão de pulso com loading de -0.943; **ii.** intervalo entre cantos (cps) com loading de 0.883; **iii.** frequência 5% (Hz) com loading de 0.924; **iv.** frequência dominante (Hz) com loading de 0.795 e podem ser conferidos conforme figura 22. Já o PC2 se encontra logo abaixo da linha de corte do *brokenstick* e os parâmetros que mais contribuíram na formação e/ou estruturação desse componente foram **v.** tempo de subida do canto - CRT (ms) com loading de 0.835; **vi.** tamanho do canto (s) com loading de 0.646 conforme figura 23.

Como a álgebra de matrizes utilizada na análise discriminante linear - LDA se demonstra mais precisa na explicação da distância euclidiana entre os grupos ela também foi aplicada e com isso conseguimos classificar com maior exatidão os padrões biológicos referente as espécies de *A. hylaedactyla*, *A. martinezi*, *A. saci*, *A. thomei* e *A. sp* através

de seus eixos canônicos que podem ser vistos nas figuras 26-28. A classificação a partir dessa análise assim como o PCA discriminou bem os grupos de anuros estudados e gerou um total de quatro eixos canônicos com eigenvalue para o EIXO 1 de 489.92 (59.87%); EIXO 2 de 259.05 (31.66%); EIXO 3 de 49.948 (6.104%), EIXO 4 de 15.848 (1.937) e uma matriz de confusão com 100% de classificação correta e um *jackknifed* que reclassifica a amostra original removendo o indivíduo “i” do cálculo dessa reamostragem nos dando, nesse caso, uma classificação com intervalo de confiança de 65.63%.

Para as análises de agrupamento foram utilizado os escores da análise de agrupamento ACP/PCA para integrar o processo de clusterização da amostra usando o algoritmo de agrupamento UPGMA para encontrar outliers e o método ward para testar a similaridade entre os grupos. Vale ressaltar que a utilização dos escores nesse etapa é de extrema importância pois neles encontram-se diluídos as contribuições de cada parâmetro acústico e a multidimensionalidade dos dados seja na formação dos eixos canônicos e/ou nos clusters gerados. Com isso o coeficiente de correlação obtido entre os clusters usando o algoritmo UPGMA foi bom (0.9242) sendo capaz de gerar um nó de 67 repetições em boot de 1000 repetições para o grupo de *Adenomera sp*, 83 repetições em boot de 1000 repetições para *Adenomera martinezi*, 71 repetições em boot de 1000 repetições para *Adenomera saci*, 77 repetições em boot de 1000 repetições para *Adenomera thomei* e 42 repetições em boot de 1000 repetições para *Adenomera hylaedactyla* (Figura 29). Da mesma forma o coeficiente de correlação obtido entre os clusters usando o método de agrupamento WARD foi considerado bom (0.851) e obtivemos um nó de 56 repetições em boot de 1000 repetições para o grupo de *Adenomera sp*, 79 repetições em boot de 1000 repetições para *Adenomera martinezi*, 70 repetições em boot de 1000 repetições para *Adenomera saci*, 77 repetições em boot de 1000 repetições para *Adenomera thomei* e 50 repetições em boot de 1000 repetições para *Adenomera hylaedactyla*. Nesses métodos não foram obtidos *outliers* e a topologia dos dendrogramas gerados através de ambos os métodos podem ser conferida nas figuras 29 e 30.

Na abordagem voltada para a análise dos cantos dos indivíduos que foi mensurados através da proposta do cálculo da distância dos centróides através do método de agrupamento k-média foi possível agrupar automaticamente um total de seis centróides e/ou custers que representam agrupamentos menos dissimilares entre si. Dos 10 eixos canônicos gerados pelo método generalizado do k-médias os eixos que mais contribuíram

na explicação dos dados foram ROOT 1, ROOT 2, ROOT 3, ROOT 4 e ROOT 5 com eigenvalue de 35.05302, 25.91907, 17.19978, 0.18046 e 0.06360 respectivamente. As cinco raízes apresentaram correlações suficientemente fortes ( $p$ -value < 0.001) e demonstraram ser grupos bem definidos entre si, demonstrando bons valores de lambda de wilks de 0.000045, 0.001626, 0.043763, 0.796471, 0.940201, todos abaixo de 1.0 respectivamente. Os centróides/clusters que foram formados pela análise discriminante podem ser conferidos nas figuras 31-34. Já os parâmetros acústicos que mais contribuíram na formação e/ou estruturação da ROOT 1 foram **i.**duração do canto (s) com correlação de -0.610699; **ii.**frequência dominante (Hz) com correlação de -0.580486; para a formação do ROOT 2 **iii.**taxa de emissão de canto (cps) com correlação de 0.798382; **iv.**frequência 5% (Hz) com correlação de -0.789888; **v.**número de pulso (nota) com correlação de -0.685935; **vi.**intervalo entre canto (s) com correlação de -0.677659; para a formação do ROOT 3 **vii.**frequência máxima (Hz) com correlação de 0.751571; e para a formação do ROOT 4 **viii.**tempo de subida do canto - CRT (ms) com correlação de -0.520684.

Analisando o dendrograma gerado pelo método de agrupamento k-media é possível distinguir seis grupos como sendo entidades morfológicas hipotéticas para o nosso conjunto de dados baseado na similaridade dos cantos. Desses, o grupo SSA-1052 que refere-se ao conjunto de dados de um único indivíduo coletado em Salvador no ano de 2022 e que agrupou no mesmo conjunto de dados do *Adenomera thomei* do Espírito Santo (At\_ES\_Li) foi considerado por nós, como sendo um *outlier* na entrada de dados de nossas análises (sintaxe distinta). Analisando as anotações e planilhas de campo além da constatação da sobreposição de ambos os grupos sobre o ROOT 2 (figura 31) é possível explicar que o sinal acústico emitido por esse indivíduo não se trata de um canto de anúncio sendo provavelmente um canto de encontro *sensu* Haddad (1995) que foi indevidamente incorporado em nossas análises. Essa explicação vem da constatação e interpretação do contexto social levantado no momento da gravação haja vista que existia interação e atividade acústica de outros machos sintopicamente ao sitio de vocalização. Também podemos apontar o comportamento atípico do indivíduo, pulando e se expondo para fora da serapilheira no momento antes da gravação do animal. Esse conjunto de dados nos leva a crer que o animal em questão (SSA-1052) se encontrava em franca disputa territorial sendo possível notar que o mesmo se estava visivelmente excitado acusticamente o que sugestiona que a gravação em questão inserida em nossa base de dados se trata na

verdade de um registro agonístico oriundo da interação territorial e/ou disputa de territórios entre machos próximos.

A explicação referente ao *outlier* SSA-1052 pode ser corroborada com a análise da projeção dos escores encontrados no ROOT 2 e ROOT 4 (Figura 31 e 33) que possuem formações fortemente explicadas pelos parâmetros temporais do sinal acústico como **i.** taxa de emissão de pulso (s); **ii.** número de pulsos (nota); **iii.** intervalo entre cantos (s); **iv.** tempo de subida do canto - CRT (ms). Todos esses parâmetros são facilmente alterados quando emitidos dentro de contextos agonísticos e de disputa territorial entre machos como fora constatado. Essa é a explicação mais provável para o *outlier* SSA-1052. Uma segunda explicação para o fato também é possível de ser traçada mas esta seria menos provável de acontecer que seria assumir o *outlier* SSA-1052 como sendo uma possível segunda morfoespécie haja vista que o mesmo se mantém separado dos demais centróides/cluster, incluindo o cluster de Salvador e do Espírito Santo (Figura 35). Essa explicação baseia-se na existência de uma biodiversidade críptica ainda desconhecida dentro do gênero *Adenomera* e a existência de recorrentes casos de simpatrias e sintopias entre essas espécies.

Por fim os resultados das análises discriminantes e/ou de dissimilaridade dos cantos de anúncio analisados apontados, através da distância de Mahalanobis (Tabela 2), sugerem que as populações de Salvador são mais semelhantes das populações de *Adenomera thomei* (122.86640) que as populações de *Adenomera hylaedactyla* (124.02070). Já o teste F de Fisher (Tabela 3) demonstrou que os cantos das populações de *Adenomera sp.* possuem uma menor variabilidade de seu conjunto de dados acústicos entre as populações de *Adenomera thomei* (17.54293) do que entre as populações de *Adenomera hylaedactyla* (25.45487) tornando com isso as populações de *Adenomera sp.* de Salvador/Ba mais próximas acusticamente da espécie de *Adenomera thomei* da mata atlântica do Espírito Santo. Os valores de variância calculados e ajustados pelo método Bonferroni para o teste do nível de significância conhecido como autovalor P demonstrou que os seis grupos de centróides/clusters gerados no método k-médias acumulam diferenças significativas e/ou são diferentes estatisticamente entre si (Tabela 4).

## 5 - CONCLUSÃO

A nulidade da hipótese natural (HO) foi rejeitada e com isso é possível distinguir e diagnosticar acusticamente as espécies nominais de *Adenomera hylaedactyla* (Cope, 1868), *Adenomera martinezi* (Bokermann, 1956), *Adenomera saci* Carvalho and Giaretta, 2013, *Adenomera thomei* (Almeida and Angulo) e *Adenomera sp* através de seus respectivos cantos de anúncio. Mediante os resultados dos testes estatísticos e do teste de hipótese é possível entender que existem evidências acústicas significativas e capazes de sustentar as morfoespécies final. Sendo assim as populações de Salvador tratam-se da espécie *Adenomera sp. nov.* ainda não descrita para o Clado Thomei que colonizaram a mata atlântica do perímetro urbano de Salvador e do litoral norte baiano.

## 6- REFERÊNCIAS.

AB'SABER, Aziz Nacib. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul. Primeira aproximação. 1977.

ANGULO, Ariadne; COCROFT, Reginald B.; REICHLE, Steffen. Species identity in the genus *Adenomera* (Anura: Leptodactylidae) in southeastern Peru. *Herpetologica*, v. 59, n. 4, p. 490-504, 2003.

ALMEIDA, A. de P.; ANGULO, Ariadne. A new species of *Leptodactylus* (Anura: Leptodactylidae) from the state of Espírito Santo, Brazil, with remarks on the systematics of associated populations. *Zootaxa*, v. 1334, n. 1, p. 1-25, 2006.

ALMEIDA, Antonio; GASPARINI, João. Amphibia, Anura, Leptodactylidae, *Leptodactylus thomei* Almeida and Angulo, 2006: Distribution extension and geographic distribution map. *Check List*, v. 6, n. 1, p. 13-14, 2010.

ANGULO, Ariadne; REICHLE, Steffen. Acoustic signals, species diagnosis, and species concepts: the case of a new cryptic species of *Leptodactylus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) from the Chapare region, Bolivia. *Zoological journal of the linnean society*, v. 152, n. 1, p. 59-77, 2008.

ANGULO, Ariadne; ICOCHEA, Javier. Cryptic species complexes, widespread species and conservation: lessons from Amazonian frogs of the *Leptodactylus marmoratus* group (Anura: Leptodactylidae). *Systematics and Biodiversity*, v. 8, n. 3, p. 357-370, 2010.

BERNECK, Bianca Von Mueller; COSTA, C. O. R.; GARCIA, P. C. A. A new species of *Leptodactylus* (Anura: Leptodactylidae) from the Atlantic forest of São Paulo state, Brazil. *Zootaxa*, v. 1795, n. 1, p. 46–56-46–56, 2008.

Bioacoustics Research Program. 2016. Raven Pro: Interactive sound analysis software, Version 1.5.0. Available from: [www.birds.cornell.edu/raven](http://www.birds.cornell.edu/raven).

BOISTEL, Renaud; ANGULO, Ariadne; MASSARY, Jean-Christophe de. Description of a new species of the genus *Adenomera* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) from French Guiana. Description of A new species of the genus *Adenomera* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) from French Guiana, p. 1000-1014, 2006.

CARNAVAL, Ana Carolina; MORITZ, Craig. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, v. 35, n. 7, p. 1187-1201, 2008.

CARVALHO, TR d; GIARETTA, Arioaldo Antonio. Bioacoustics reveals two new syntopic species of *Adenomera Steindachner* (Anura: Leptodactylidae: Leptodactylinae) in the Cerrado of central Brazil. *Zootaxa*, v. 3731, n. 3, p. 533-551, 2013.

CARVALHO, TR d; GIARETTA, Arioaldo Antonio. Taxonomic circumscription of *Adenomera martinezi* (Bokermann, 1956)(Anura: Leptodactylidae: Leptodactylinae) with the recognition of a new cryptic taxon through a bioacoustic approach. *Zootaxa*, v. 3701, n. 2, p. 207-237, 2013.

CARVALHO, Thiago R. de et al. A new, morphologically cryptic species of *Adenomera* closely related to *Adenomera araucaria* from the Atlantic Forest of southern Brazil (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Herpetology*, v. 53, n. 2, 2019.

CARVALHO, Thiago R. et al. A new Amazonian species of *Adenomera* (Anura: Leptodactylidae) from the Brazilian state of Pará: a tody-tyrant voice in a frog. *American Museum Novitates*, v. 2019, n. 3919, p. 1-21, 2019.

CARVALHO, Thiago R. et al. On the uncertain taxonomic identity of *Adenomera hylaedactyla* (Cope, 1868) and the composite type series of *A. andreae* (Müller, 1923)(Anura, Leptodactylidae). *Copeia*, v. 107, n. 4, p. 708-723, 2019.

CARVALHO, Thiago R. de et al. A New Forest-Dwelling Frog Species of the Genus *Adenomera* (Leptodactylidae) from Northwestern Brazilian Amazonia. *Copeia*, v. 108, n. 4, p. 924-937, 2020.

CARVALHO, Thiago R. et al. New acoustic and molecular data shed light on the poorly known Amazonian frog *Adenomera simonstuarti* (Leptodactylidae): implications for distribution and conservation. *European Journal of Taxonomy*, n. 682, 2020.

CARVALHO, Thiago R. et al. Hiding in Plain Sight: A Fourth New Cryptic Species of the *Adenomera andreae* Clade (Anura: Leptodactylidae) from Southwestern Amazonia. *Herpetologica*, v. 76, n. 3, p. 304-314, 2020.

CARVALHO, Thiago RD et al. Systematics and historical biogeography of Neotropical foam-nesting frogs of the *Adenomera heyeri* clade (Leptodactylidae), with the description of six new Amazonian species. *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 191, n. 2, p. 395-433, 2021.

CASSINI, Carla S. et al. One step beyond a broad molecular phylogenetic analysis: Species delimitation of *Adenomera marmorata* Steindachner, 1867 (Anura: Leptodactylidae). *PloS one*, v. 15, n. 2, p. e0229324, 2020.

COCROFT, Reginald B.; RYAN, Michael J. Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. *Animal behaviour*, v. 49, n. 2, p. 283-303, 1995.

CONTE, Carlos Eduardo et al. Novos registros na distribuição geográfica de anuros na Floresta com Araucária e considerações sobre suas vocalizações. *Biota Neotropica*, v. 10, p. 201-224, 2010.

DE FREITAS, Marco Antonio et al. Herpetofauna from Serra da Jibóia, an Atlantic Rainforest remnant in the state of Bahia, northeastern Brazil. *Herpetology Notes*, v. 11, p. 59-72, 2018.

DESUTTER-GRANDCOLAS, Laure; D'HAESE, Cyrille; ROBILLARD, Tony. The problem of characters susceptible to parallel evolution in phylogenetic analysis: a reply to Marques and Gnaspini (2001) with emphasis on cave life phenotypic evolution. *Cladistics*, v. 19, n. 2, p. 131-137, 2003.

DOMINATO, Ramon Costa et al. First karyotype description of the species of *Adenomera* Steindachner, 1867 (Anura, Leptodactylidae) in the "thomei" clade. *Comparative Cytogenetics*, v. 16, n. 3, p. 151-159, 2022.

DUELLMAN, William E.; TRUEB, Linda. *Biology of amphibians*. JHU press, 1994.

FERRANTE, Lucas; ANGULO, Ariadne; SACRAMENTO, Mario. Notes on range extension and geographic variation of calls in *Adenomera thomei* (Anura: Leptodactylidae). *Check List*, v. 10, n. 6, p. 1560-1562, 2014.

FOUQUET, Antoine et al. Unexpected phylogenetic positions of the genera *Rupirana* and *Crossodactylodes* reveal insights into the biogeography and reproductive evolution of leptodactylid frogs. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 67, n. 2, p. 445-457, 2013.

FOUQUET, Antoine et al. Species delimitation, patterns of diversification and historical biogeography of the Neotropical frog genus *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Biogeography*, v. 41, n. 5, p. 855-870, 2014.

FROST, D. R. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 6.1 (Date of access). Electronic Database accessible



at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. doi.org/10.5531/db.vz.0001, 2021

GIARETTA, ARIIVALDO A.; KOKUBUM, MARCELO N. DE C. A frog that lays eggs in underground chambers. *Herpetozoa*, 16(3/4): 115-126, 2004.

HADDAD, C. F. B. Comunicação em anuros (Amphibia). *Anais de etologia*, n. 13, p. 116-132, 1995.

HAMMER, Ø. et al. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, v. 4.10, 2022.

HARTIGAN, J. A. *Clustering algorithms* John Wiley & Sons. Inc., New York, NY, 1975.

HARTIGAN, J. A.; WONG M. A. Algorithm as 136: A k-means clustering algorithm. *Applied statistics*, v. 28, n. 1, p. 100, 1979.

HEYER, W. Ronald. Systematics of the marmoratus group of the frog genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). *Contributions in Science*, 1973.

HEYER, W. Ronald et al. frogs of Boracéia. *Arquivos de zoologia*, v. 31, n. 4, p. 231-410, 1990.

LITTLEJOHN, M. J. Long-range acoustic communication in anurans: an integrated and evolutionary approach. In: *The reproductive biology of amphibians*. Springer, Boston, MA, 1977. p. 263-294.

MAZZONI, D. Audacity, version 3.0, copyright 2018–2019, Audacity Team. 2022.

MCLISTER, D.; STEVENS, E. D.; BOGART, JAMES P. Comparative contractile dynamics of calling and locomotor muscles in three hylid frogs. *The journal of experimental biology*, v. 198, n. 7, p. 1527-1538, 1995.

KÖHLER, J. et al. 2017. The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa* 4251(1): 001-124.

KOK, Philippe JR et al. Morphological variation in *Leptodactylus lutzi* (Anura, Leptodactylidae) with description of its advertisement call and notes on its courtship behavior. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, v. 6, n. 1, p. 45-60, 2007.

KOKUBUM, Marcelo N. de C.; GIARETTA, Arioaldo A. Reproductive ecology and behaviour of a species of *Adenomera* (Anura, Leptodactylinae) with endotrophic tadpoles: systematic implications. *Journal of Natural History*, v. 39, n. 20, p. 1745-1758, 2005.

KOKUBUM, Marcelo N. de C. Ecologia reprodutiva e diversidade acústica de espécies de *Leptodactylus* do grupo *marmoratus* (Anura; Leptodactylidae). 2008.

KOKUBUM, Marcelo Nde C.; DE SOUSA, Moisés Barbosa. Reproductive ecology of *Leptodactylus aff hylaedactylus* (Anura, Leptodactylidae) from an open area in northern Brazil. *South American Journal of Herpetology*, v. 3, n. 1, p. 15-21, 2008.

KWET, Axel; ANGULO, Ariadne. A new species of *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae) from the Araucaria forest of Rio Grande do Sul (Brazil), with comments on the systematic status of southern populations of the genus. *Alytes*, v. 20, n. 1-2, p. 28-43, 2002.

KWET, Axel. Bioacoustic variation in the genus *Adenomera* in southern Brazil, with revalidation of *Leptodactylus nanus* Müller, 1922 (Anura, Leptodactylidae). *Zoosystematics and evolution*, v. 83, n. S1, p. 56-68, 2007.

KWET, Axel; STEINER, Josefina; ZILLIKENS, Anne. A new species of *Adenomera* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) from the Atlantic rain forest in Santa Catarina, southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, v. 44, n. 2, p. 93-107, 2009.

LYNCH, John D.; SCHWARTZ, Albert. Taxonomic disposition of some 19th Century leptodactylid frog names. *Journal of Herpetology*, p. 103-114, 1971.

MÁRQUEZ, R.; DE LA RIVA, I.; BOSCH, J. Advertisement calls of Bolivian Leptodactylidae (Amphibia, Anura). *Journal of Zoology*, v. 237, n. 2, p. 313-336, 1995.

MCLISTER, D.; STEVENS, E. D.; BOGART, JAMES P. Comparative contractile dynamics of calling and locomotor muscles in three hylid frogs. *The journal of experimental biology*, v. 198, n. 7, p. 1527-1538, 1995.

MENIN, Marcelo; DE ALMEIDA, Alexandre P.; DE C. KOKUBUM, Marcelo N. Reproductive aspects of *Leptodactylus hylaedactylus* (Anura: Leptodactylidae), a member of the *Leptodactylus marmoratus* species group, with a description of tadpoles and calls. *Journal of Natural History*, v. 43, n. 35-36, p. 2257-2270, 2009.

MUNDINGER, Paul C. Call learning in the Carduelinae: ethological and systematic considerations. *Systematic Biology*, v. 28, n. 3, p. 270-283, 1979.

NUNES-DE-ALMEIDA, Carlos Henrique Luz; HADDAD, Célio Fernando Batista; TOLEDO, Luis Felipe. A revised classification of the amphibian reproductive modes. *Salamandra*, v. 57, n. 1, p. 413-427, 2021.

PEZZUTI, Tiago Leite et al. The tadpoles of the Iron Quadrangle, Southeastern Brazil: a baseline for larval knowledge and anuran conservation in a diverse and threatened region. *South American Journal of Herpetology*, v. 22, n. sp1, p. 1-107, 2021.

PIJANOWSKI, Bryan C. et al. Soundscape ecology: the science of sound in the landscape. *BioScience*, v. 61, n. 3, p. 203-216, 2011.

QGIS Development Team, 2022. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>.

R Core Team. (2022). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>.

SCHNEIDER, Hans; SINSCH, Ulrich. Contributions of bioacoustics to the taxonomy of the Anura. *Amphibian biology*, v. 7, p. 2892-2932, 2007.

SEGALLA M. V. et al. 2019. Brazilian amphibians: list of species. SBH 65-96.  
(accessed 15 Janeiro 2020)

SEIFERT, Bernhard; RITZ, Markus; CSÓSZ, Sándor. Application of exploratory data analyses opens a new perspective in morphology-based alpha-taxonomy of eusocial organisms. *Myrmecological News*, 2014.

STRAUGHAN, Ian R.; HEYER, W. Ronald. A functional analysis of the mating calls of the Neotropical frog genera of the *Leptodactylus* complex (Amphibia, Leptodactylidae). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 1976.

STREICHER, Jeffrey W.; SADLER, Rowland; LOADER, Simon P. Amphibian taxonomy: early 21st century case studies. *Journal of Natural History*, v. 54, n. 1-4, p. 1-13, 2020.

TIBCO. 2022. Statistica: analytics system software, Version 14.0.1. Available from: <https://www.tibco.com/>.

VIELLIADR J. 2004. A diversidade de sinais e sistemas de comunicação sonora fauna brasileira. I Seminário Música Ciência Tecnologia: Acústica musical. USP, São Paulo.

VIELLIADR J.; SILVA M. L. 2010. "A Bioacústica como ferramenta de pesquisa em Comportamento animal". in MATTER S. V. et al. (Org.) *Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento*. Rio de Janeiro: Technical Books Editora, 2010.

WENZEL, Elizabeth M. Localization in virtual acoustic displays. *Presence: Teleoperators & Virtual Environments*, v. 1, n. 1, p. 80-107, 1992.

ZIMMERMAN, Barbara L.; BOGART, James P. Vocalizations of primary forest frog species in the Central Amazon. *Acta Amazonica*, v. 14, p. 473-520, 1984.