



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Biologia da Conservação

Dissertação

**Eficácia das barreiras mitigadoras para anfíbios na estrada
EM535**

João Daniel Guerra Rato

Orientador(es) | Paulo Sá-Sousa

Évora 2021



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Biologia da Conservação

Dissertação

**Eficácia das barreiras mitigadoras para anfíbios na estrada
EM535**

João Daniel Guerra Rato

Orientador(es) | Paulo Sá-Sousa

Évora 2021



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Carla Pinto Cruz (Universidade de Évora)

Vogais | João Eduardo Rabaça (Universidade de Évora) (Arguente)
Paulo Sá-Sousa (Universidade de Évora) (Orientador)

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

MESTRADO EM BIOLOGIA DA CONSERVAÇÃO

DISSERTAÇÃO

Eficácia das barreiras mitigadoras para anfíbios na estrada
EM535



JOÃO DANIEL GUERRA RATO

ORIENTADOR: PAULO SÁ SOUSA

ÉVORA, 2021

Agradecimentos

Quero agradecer ao Professor Paulo Sá Sousa, pois sem ele não tinha sido possível realizar esta dissertação. Ele que, após várias propostas da minha parte, me sugeriu uma mais exequível no tempo que tinha disponível. Enquanto orientador demonstrou-se sempre disponível em todas as fases desta dissertação para ajudar e guiar quando necessário. E por isso agradeço-lhe.

Agradeço também a todos os que durante a Licenciatura e Mestrado me acompanharam, que entre aulas, apresentações, exames e saídas de campo fizeram este percurso a meu lado. Na impossibilidade de referir todos, agradeço ao Pedro Almeida, Hugo Anjos, Miguel Trindade e Pedro Brandão. A todos muito obrigado!

Não poderia deixar de agradecer à minha família que sempre me apoiaram no meu percurso académico e que tiveram um papel essencial no decorrer desta dissertação, tanto na realização das saídas de campo como no apoio e encorajamento durante a escrita. Foram críticos para o sucesso desta dissertação principalmente tendo em conta a minha situação de saúde.

Tenho também de agradecer ao pai da minha namorada, que se disponibilizou para ir às saídas de campo comigo quando mais ninguém me podia acompanhar. Muito obrigado!

Por fim, quero agradecer á minha namorada, Rita Rocha, que me acompanhou e apoiou durante todo o processo. Sem ela não tinha sido possível realizar esta dissertação, principalmente devido ao meu estado de saúde. Obrigado pelo apoio durante as saídas de campo e durante a escrita da dissertação, sem ela não teria sido possível. Sei que por me ouvir falar tanto de anfíbios, em parte ficou um bocado contagiada por eles.

O meu Muito Obrigado a todos!

Índice

Resumo	6
Abstract.....	7
Introdução	8
Impacto das estradas nas comunidades de anfíbios	8
Movimentos dos anfíbios nas estradas	10
Tendências da mortalidade rodoviária de anfíbios	12
Medidas mitigadoras da mortalidade de anfíbios.....	14
Eficácia das barreiras e passagens subterrâneas.....	16
Objetivos do trabalho	17
Material e métodos	18
Área de estudo.....	18
Anfíbios ocorrentes na área de estudo.....	19
Barreiras mitigadoras.....	19
Recolha de dados.....	20
Dados do LIFE LINES.....	22
Análise estatística	23
Resultados	25
Eficácia da barreira permanente	26
Eficácia dos setores adjacentes à barreira permanente.....	27
Eficácia da barreira de lona	28
Eficácia dos setores adjacentes à barreira de lona.....	28
Direção dos anfíbios	29
Discussão	31
Influência do desenho estrutural das barreiras na sua eficácia	31
Influência da estação do ano na eficácia da barreira permanente	32
Setores adjacentes à barreira permanente	34
Setores adjacentes à barreira de lona	35
Impacto do setor no direcionamento dos anfíbios	37
Influência da estação do ano na direção dos anfíbios.....	38
Barreiras uni- VS bilaterais.....	39
Aspetos a melhorar.....	41
Conclusão.....	42
Bibliografia.....	44
Dados suplementares	49

Índice de figuras

- Figura 1 - Divisão dos setores de amostragem. Setor lona corresponde ao setor onde estava implementada a barreira de lona. Setor permanente corresponde ao setor onde estava implementada a barreira permanente. Setores L_1 e L_2 são os setores adjacentes à barreira de lona. Setores P_1 e P_2 são os setores adjacentes à barreira permanente. Setor Controlo é o setor sem influência da barreira..... 21
- Figura 2 - Esquema de como foram assinaladas as deslocações dos anfíbios. D- em direção à barreira, F- na direção oposta à barreira e O- movimento paralelo à estrada..... 22
- Figura 3- Número de indivíduos por saída por quilómetro para cada interação entre setor e tratamento; C- setor de controlo; P- setor permanente; Aus- barreira ausente; Pres1- barreira presente no Outono e Inverno; Pres2- barreira presente na Primavera e Verão. As letras (a-d) indicam as interações significativamente diferentes. 26
- Figura 4- Número de indivíduos por saída por quilómetro para cada interação entre setor e tratamento; C- setor de controlo; P_1-setor adjacente à barreira permanente; P_2- setor adjacente à barreira permanente; Aus- barreira ausente; Pres1- barreira presente no Outono e Inverno; Pres2- barreira presente na Primavera e Verão. As letras (a-d) indicam as interações significativamente diferentes..... 27
- Figura 5- Número de indivíduos por saída por quilómetro para cada interação entre setor e tratamento; C- setor de controlo; L-setor da barreira de lona; Aus- barreira ausente; Pres1- barreira presente no Outono e Inverno; Pres2- barreira presente na Primavera e Verão..... 28
- Figura 6- Número de indivíduos por saída por km para cada interação entre setor e tratamento; C- setor de controlo; L_1-setor adjacente a barreira de lona; L_2- setor adjacente a barreira de lona; Aus- barreira ausente; Pres1- barreira presente no Outono e Inverno; Pres2- barreira presente na Primavera e Verão. As letras (a-d) indicam as interações significativamente diferentes. 29
- Figura 7- Correlação entre a direção dos anfíbios e os diferentes setores. Os círculos vermelhos correspondem a correlações negativas e os círculos azuis a correlações positivas. Quanto maior e mais escuro o círculo mais forte é a correlação. D- Direção no sentido da barreira; F- direção no sentido oposto ao da barreira; O- paralelo à estrada; Controlo- setor de controlo; L_1-setor adjacente à barreira de lona; L_2- setor adjacente à barreira de lona; Lona- setor da barreira de Lona; P_1-setor adjacente à barreira permanente; P_2- setor adjacente à barreira permanente; Permanente- setor da barreira permanente 30
- Figura 8-Correlação entre a direção dos anfíbios e as diferentes estações do ano. Os círculos vermelhos correspondem a correlações negativas e os círculos azuis a correlações positivas. Quanto maior e mais escuro o círculo mais forte é a correlação. D- Direção no sentido da barreira; F- direção no sentido oposto ao da barreira; O- paralelo à estrada; Inverno- dados recolhidos no Inverno; Outono- dados recolhidos no Outono; Primavera- dados recolhidos na Primavera; Verão- dados recolhidos no Verão..... 30
- Figura 9- Vegetação que ultrapassa o limite superior da barreira permanente no fim da Primavera..... 33
- Figura 10- À esquerda no Setor L_1 é evidente a presença de muros com mais de 2 metros dos dois lados da estrada. À direita podemos ver espaço entre o muro do setor L_1 e a barreira de lona. A seta a vermelha indica a localização da barreira temporária..... 36

Índice de tabelas

Tabela i- Espécies de anfíbios potencialmente ocorrentes na área de estudo (Loureiro <i>et al.</i> , 2008; Maravalhas & Soares, 2018; Speybroeck <i>et al.</i> , 2020)	19
--	----

Resumo

Os anfíbios são o grupo de vertebrados mais afetado por mortalidade por atropelamento. A utilização de barreiras bilaterais associadas a passagens subterrâneas é a principal medida mitigadora para diminuir o número de anfíbios atropelados. Porém a maioria das medidas de conservação não consideram a direção para que os anfíbios se deslocam. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia das barreiras mitigadoras unilaterais instaladas pelo projeto LIFE LINES na estrada municipal EM535. Através de transetos rodoviários foram monitorizadas duas barreiras unilaterais (uma permanente e uma de lona), quatro zonas adjacentes às barreiras e uma zona de controle. A barreira permanente unilateral mostrou-se eficaz, apesar da sua eficácia ser inferior às barreiras bilaterais. A excessiva presença de vegetação nas bermas afetou esta eficácia. Por outro lado, as zonas adjacentes às barreiras não apresentaram um maior número de anfíbios nas estradas. Se há um claro padrão espacial associado às deslocações dos anfíbios, então nenhum padrão sazonal de deslocamento foi identificado. Conclui-se que as barreiras unilaterais devem ser instaladas apenas quando não é exequível colocar barreiras bilaterais. Não obstante deve ter-se sempre em conta os padrões espaciais de deslocamento, de modo a aumentar a eficácia desta medida de mitigação.

Palavras-chave: Anfíbios; Atropelamento; Estradas; Barreiras; Unilateral; Mitigação; Conservação.

Abstract

Effectiveness of the mitigating barriers for amphibians on the EM535 road

Amphibians are the group of vertebrates most affected by roadkill. Bilateral mitigation barriers associated to under-passages is the main mitigation measure to solve the number of roadkilled amphibians. Moreover, most mitigation measures do not consider the movement direction of the amphibians. The aim of the present study was to evaluate the efficiency of unilateral barriers installed by LIFE LINES project, into the EM535 road, along the stretch between Santiago do Escoural and São Cristovão (Montemor-o-Novo). Through road transects, two unilateral barriers (one permanent and another made from tarp), four areas adjacent to the barriers and a control area were monitored. The permanent unilateral barrier proved to be effective, despite its effectiveness being lower than of bilateral barriers. The excessive presence of vegetation on the road edges affected this effectiveness. On the other hand, the areas adjacent to the barriers did not have a higher number of amphibians on the road. If there is a clear spatial pattern associated to the amphibian displacement, then no seasonal displacement has been identified. It is concluded that unilateral barriers should only be installed when it is not feasible to place bilateral barriers. Nevertheless, the spatial patterns of amphibian displacement should always be taken into account, in order to increase the effectiveness of this mitigation measure.

Key words: Amphibians; Roadkill; Road; Barriers; Unilateral; Mitigation; Conservation

Introdução

Os anfíbios (classe Lissamphibia) têm associadas várias causas de declínio que os tornam um dos grupos de vertebrados mais ameaçados, mais que as aves ou os mamíferos (Stuart *et al.*, 2004). Segundo Collins & Storfer (2003), estas causas englobam as alterações globais (climáticas e de radiação UV), a sobre-exploração, as espécies invasoras, alterações da forma de uso do solo, doenças infecciosas emergentes e contaminação por poluentes. Por exemplo, a construção de uma estrada constitui uma radical alteração no uso de solo e irá ter, conseqüentemente, impactos duradouros nas comunidades de anfíbios. Um impacto rodoviário significativo pode implicar a uma elevada mortalidade de anfíbios por atropelamento. Ora na Europa, entre 2000 e 2014, ocorreu um aumento na quantidade total de estradas de 13% (OECD, 2015). Em Portugal, entre 2009 e 2018, houve um aumento de 7% nas autoestradas e 10% nas restantes estradas (Eurostat, 2020). Adicionalmente, o número de veículos de passageiros usados entre 2005 e 2015 cresceu 293 milhões, a nível mundial, e cerca de 296 mil, em Portugal (International Organization of Motor Vehicle Manufacturers, s/data). Neste cenário prevê-se que, tanto o número de estradas como o número de veículos a circular, irá aumentar (van der Ree *et al.*, 2015), tornando ainda maior a importância do estudo da ecologia das estradas nas comunidades de anfíbios.

Entretanto Hocking & Babbitt (2014) mostraram que os anfíbios contribuem para os quatro tipos de serviços de ecossistema propostos no Millennium Ecosystem Assessment (2005). Os autores referem no artigo que, para além dos serviços de provisionamento e de cultura, os anfíbios são essenciais para os serviços de suporte e de regulação. Como acréscimo, vários autores (Glista *et al.*, 2007; Sillero, 2008; Beebee, 2013; Matos, 2017, entre outros) salientam que os anfíbios são dos vertebrados mais impactados pelas rodovias.

Impacto das estradas nas comunidades de anfíbios

Um dos impactos provocado pelas rodovias consiste na fragmentação de habitat, que ocorre sempre que as estradas atravessam os biótipos anteriormente existentes de forma contínua, levando a uma redução da conectividade (Colino-Rabanal & Lizana, 2012; Matos, 2017). Assim, para além da fragmentação de habitat, as estradas promovem outros impactos, como perda de habitat; o aumento do efeito de orla; o efeito de barreira (ou seja, falta de permeabilidade); o aumento das perturbações ambientais, alterações comportamentais, favorecem as espécies invasoras e sobretudo, causam elevada mortalidade de anfíbios por atropelamento (Coffin, 2007;

Goosem, 2007; Sillero, 2008; Colino-Rabanal & Lizana, 2012; Hamer *et al.*, 2015; van der Ree *et al.*, 2015a; Matos, 2017). Podendo ainda criar isolamento genético (Jochimsen *et al.*, 2004; Marsh *et al.*, 2008; Beebee, 2013). Os anfíbios são particularmente vulneráveis a estes efeitos das rodovias, devido à sua fraca mobilidade (Kovar *et al.*, 2009; Colino-Rabanal & Lizana, 2012; Matos, 2017).

A zona influenciada pela estrada, é a área afetada para além do limite da mesma, sendo que a sua extensão depende de vários fatores (van der Ree *et al.*, 2015). A zona anteriormente mencionada pode sofrer alterações de habitat (Jochimsen *et al.*, 2004; Coffin, 2007; Colino-Rabanal & Lizana, 2012; van der Ree *et al.*, 2015), sendo estas provocadas por uma alteração nas componentes abióticas (hidrologia, geomorfologia, transporte e erosão de sedimentos, entre outros), bem como nas componentes bióticas, por exemplo, através do estabelecimento de espécies exóticas (Jochimsen *et al.*, 2004; Coffin, 2007; van der Ree *et al.*, 2015), uma vez que as estradas podem funcionar como corredores de dispersão (Colino-Rabanal & Lizana, 2012; van der Ree *et al.*, 2015a). A alteração das componentes abióticas ocorre em parte pelo aumento do efeito de orla (Goosem, 2007), podendo ser de tal modo significativa que leva à perda de habitat, demonstrando assim que a fragmentação e a alteração de habitat estão correlacionadas.

A presença de rodovias também provoca contaminação ambiental por poluentes os quais podem advir da utilização da estrada, bem como de atividades de manutenção da mesma (Coffin, 2007; Colino-Rabanal & Lizana, 2012). Por exemplo, o uso de sal anticongelante para impedir que as estradas fiquem cobertas de neve, poderá causar mortalidade nos anfíbios quando este se acumula em corpos de água (Colino-Rabanal & Lizana, 2012).

Um outro fator que afeta as comunidades de anfíbios é a poluição sonora, gerada pelos veículos que transitam na estrada (Coffin, 2007; Grace & Noss, 2018). O ruído gerado pelas rodovias poderá provocar uma alteração no número de notas dos coxos dos batráquios (sapos e rãs), redução do número dessas vocalizações por minuto, um aumento da frequência das vocalizações ou aumento da amplitude (duração), entre outras (Grace & Noss, 2018). Porém, nem todas as espécies apresentam esta plasticidade acústica (Colino-Rabanal & Lizana, 2012), ficando o seu sinal mascarado.

Contudo, dependendo da espécie, a resposta das populações difere, ocorrendo situações em que estas diminuem, aumentam ou mantêm-se estáveis (Colino-Rabanal & Lizana, 2012; Beebee, 2013). Grace & Noss (2018) demonstraram experimentalmente que o ruído produzido nas estradas pode conduzir a uma diminuição da abundância de batráquios nas proximidades da

estrada. Por outro lado, as rodovias aparentam ter um impacto negativo na diversidade das comunidades de anfíbios (Jochimsen *et al.*, 2004; Colino-Rabanal & Lizana, 2012; Beebee, 2013).

Por fim, um outro impacto das estradas sobre os anfíbios incide na mortalidade por atropelamento, a qual é a principal causa de morte direta. Ao contrário das interações biológicas naturais, como a predação, o atropelamento não depende da densidade das populações (Puky, 2005). O esmagamento de anfíbios pelos veículos vai apresentar diferentes intensidades de acordo com a espécie e a faixa etária mais atingida (Green, 2005). Para uma espécie anfíbia cuja dinâmica populacional assenta no baixo recrutamento e na baixa capacidade de dispersão, a morte de adultos nas estradas poderá inviabilizar as suas populações; enquanto as espécies que auferem de uma capacidade de dispersão superior e uma taxa de recrutamento maior, elas conseguem suportar melhor demograficamente a perda de indivíduos adultos, mas apenas se esta ocorrer após a reprodução (Jochimsen *et al.*, 2004; Green, 2005; Rytwinski & Fahrig, 2015).

Movimentos dos anfíbios nas estradas

Segundo Sinsch (1990), os anfíbios necessitam de quatro tipos de recursos no seu ciclo vital: locais de estivação, locais de hibernação, corpos de água para se reproduzirem e áreas ricas em presas. Estes locais muitas vezes encontram-se espacialmente separados (Sinsch, 1990) e é nas deslocações entre os diferentes locais que os anfíbios atravessam as estradas. A decisão de início, duração e extensão destas deslocações são influenciadas por uma série de características externas e internas a cada indivíduo (Pittman *et al.*, 2014). Estes movimentos sazonais podem ser classificados em dois grupos distintos: movimentos migratórios e movimentos de dispersão.

Os movimentos migratórios são definidos como movimentos bidirecionais, dentro da mesma população (Semlitsch, 2008; Sinsch, 2014). A maior parte dos anfíbios apresentam movimento migratórios realizados pelos indivíduos adultos entre os locais de refúgio (de hibernação e estivação) e os locais de reprodução (Sinsch, 1990; Semlitsch, 2008; Pittman *et al.*, 2014; Matos, 2017), sendo estes movimentos não aleatórios, uma vez que a maior parte dos anfíbios que se reproduzem em charcos apresentam filopatria aos locais de reprodução (Semlitsch, 2008; Pittman *et al.*, 2014). No entanto, estas migrações sazonais quando comparadas a outros vertebrados, ocorrem a distâncias relativamente curtas (Sinsch, 1990). Num estudo realizado por Kovar *et al.* (2009) em anfíbios centro europeus, a maioria das espécies não apresentou movimentos migratórios para lá dos 600m do charco inicial e a distância máxima de

migração ocorreu para o sapo-comum (*Bufo spinosus*). Devido aos requisitos hídricos e térmicos dos anfíbios, estas migrações tendem a ocorrer em alturas de humidade e de temperaturas amenas (Sinsch, 1990). Podem ocorrer ainda movimentos migratórios secundários entre os locais de refúgio de Inverno e de Verão e os locais de alimentação (Semlitsch, 2008). E também, os indivíduos adultos efetuam movimentos diários dentro da sua área vital enquanto procuram alimento ou acesso a microhabitats, correspondendo a distâncias curtas (Semlitsch, 2008; Pittman *et al.*, 2014; Sinsch, 2014).

Para além destes movimentos migratórios, existem ainda os movimentos de dispersão. A dispersão é definida como um movimento unidirecional entre populações distintas com consequências no fluxo genético (Sinsch, 2014), a qual é essencial para a manutenção das populações e dos respetivo intercâmbio genético (Semlitsch, 2008; Pittman *et al.*, 2014). Estes movimentos são altamente influenciados pelos comportamentos individuais e encontram-se divididos em dispersão pré-reprodutora ou natal e dispersão entre locais de reprodução sucessivos (Matos, 2017). A dispersão pré-reprodutora ou natal ocorre em juvenis que não se associam filopatricamente aos charcos onde nasceram (Sinsch, 2014), e este movimento tende a ser aleatório a partir do charco inicial (Semlitsch, 2008; Pittman *et al.*, 2014). Nestas deslocações, que ocorrem após a metamorfose, os juvenis poderão atingir distâncias maiores relativamente aos adultos (Semlitsch, 2008; Pittman *et al.*, 2014; Sinsch, 2014). Contudo, os juvenis aparentam estar mal adaptados para realizarem esta dispersão, especialmente em espécies que sofrem a metamorfose quando ainda têm pequenas dimensões (Semlitsch, 2008). Por isto, Semlitsch (2008) sugere que esta dispersão juvenil ocorre ao longo de vários anos, à medida que os juvenis vão crescendo e adquirindo uma maior capacidade de deslocação. No início da dispersão juvenil, a taxa de movimentação é relativamente elevada e a resposta ao habitat reduzida. Porém à medida que os juvenis estabelecem a sua área vital, a resposta ao habitat aumenta e a taxa de movimentação diminui, havendo ainda uma alteração de um movimento aleatório para um movimento enviesado (Pittman *et al.*, 2014). Ao contrário da migração nos adultos, a dispersão entre locais de reprodução sucessivos configura uma movimentação que ocorre entre diferentes populações (Sinsch, 2014); e apenas uma pequena parte dos indivíduos adultos participam neste tipo de dispersão (Semlitsch, 2008). Este tipo de dispersão é fundamental para a manutenção da conectividade funcional, particularmente em habitats fragmentados (Matos, 2017).

Por fim, os anfíbios podem ser ainda atraídos para as estradas (Cunnington *et al.*, 2014). Aí acresce haver uma tendência para os anfíbios se manterem imobilizados perante a aproximação

de veículos (Mazerolle *et al.*, 2005), o que irá contribuir para o aumento da sua vulnerabilidade ao atropelamento.

Tendências de mortalidade

Dentro da classe Lissamphibia as espécies mais suscetíveis a sofrerem atropelamento são os animais mais terrestres (por exemplo salamandras e sapos) e semiaquáticas (Puky, 2005; Sillero, 2008; Beebee, 2013). Existem estudos que reportam que os atropelamentos ocorrem mais frequentemente em anuros (ex. sapos) do que em caudados (ex. salamandras) (Matos *et al.*, 2012; Beebee, 2013), no entanto, as espécies e a frequência com que estas são atropeladas varia localmente (Puky, 2005; Matos *et al.*, 2012). Num estudo realizado na região de Salamanca, em Espanha, as espécies com maior mortalidade foram os sapos *Epidalea calamita*, *Pelobates cultripes* e *Bufo spinosus* (Sillero, 2008). Num segundo estudo, realizado em Espanha perto do rio Ebro, o sapo comum (*Bufo spinosus*) dominou o número de anfíbios mortos com mais de 80% (Martínez-Freiría & Brito, 2012). Resultados semelhantes foram obtidos num estudo de mortalidade de anfíbios na estrada, na região do Porto, em Portugal (Matos *et al.*, 2012).

Verifica-se um padrão temporal nos atropelamentos de anfíbios associado aos movimentos migratórios e aos movimentos de dispersão (Puky, 2005; Glista *et al.*, 2007). Este padrão apresenta um pico máximo nas épocas amenas (Outono e Primavera mediterrânicos) com maior humidade e temperatura morna (Glista *et al.*, 2007), períodos em que estas espécies se deslocam (Puky, 2005; Orłowski, 2007, Seo *et al.*, 2015). Sendo animais poiquilotérmicos a sua atividade metabólica aumenta com as temperaturas mornas (18 a 25°C). Todavia, dada a pele nua dos anfíbios, a sua fisiologia de osmorregulação para manutenção do balanço hídrico é assegurada através da absorção cutânea, isto facilmente provoca desidratação quando as temperaturas ambientais são mais elevadas (Vitt & Caldwell, 2014). Assim os anfíbios necessitam de humidade do ar/solo bastante elevada para estarem ativos. Na região mediterrânica, a mortalidade rodoviária de anfíbios apresenta tendencialmente dois picos que correspondem às duas épocas de reprodução, no Outono e na Primavera (Carvalho & Mira, 2011; Martínez-Freiría & Brito, 2012; Garriga *et al.*, 2017; Canal *et al.*, 2018), épocas do ano em que as condições de temperatura e de humidade são adequadas para os anfíbios realizarem as suas deslocações. Ainda assim, o pico do Outono tende a apresentar um maior número de anfíbios ativos (Canal *et al.*, 2018).

Apesar das movimentações dos anfíbios serem maioritariamente controladas pelas condições de temperatura e humidade, elas estão também associadas ao ciclo lunar (Mestre *et al.*, 2019; Jarvis *et al.*, 2021). Noites de lua cheia permitem uma maior detetabilidade de predadores

melhor comunicação visual e podem ter influência sobre a escolha de parceiros; por outro lado, noites de lua nova reduzem a probabilidade de detecção por parte de predadores visuais (Grant *et al.*, 2009; Arnfield *et al.*, 2012; Grant *et al.*, 2013; Mestre *et al.*, 2019; Jarvis *et al.*, 2021). Ainda assim, a forma como respondem ao ciclo lunar é específica de cada espécie (Grant *et al.*, 2013; Mestre *et al.*, 2019; Jarvis *et al.*, 2021). Por exemplo, Mestre *et al.* (2019) demonstraram que espécies com coloração aposemática, como *Salamandra salamandra*, apresentam mais indivíduos atropelados nas imediações da lua cheia, enquanto que espécies sem coloração aposemática, como *Pleurodeles waltl*, apresentavam um maior número de carcaças próximo da lua nova.

A presença de habitats adequados vai também condicionar a distribuição espacial dos anfíbios atropelados (Jochimsen *et al.*, 2004; Sillero, 2008; Colino-Rabanal & Lizana, 2012). A presença de massas de água nas proximidades de estradas está correlacionada positivamente com o número de anfíbios atropelados (Puky, 2005; Glista *et al.*, 2007; Goosem, 2007; Colino-Rabanal & Lizana, 2012; Seo *et al.*, 2015), no entanto, estes padrões podem ser alterados por características intrínsecas às próprias espécies (Sillero, 2008), bem como pela abundância local de cada espécie, que por sua vez está relacionado com a qualidade do habitat envolvente (Orlowski, 2007).

No entanto, o atropelamento não depende apenas de fatores temporais e das características de cada espécie. Essa mortalidade vai também depender de fatores como a densidade de estradas, a proximidade a determinado biótopo, a intensidade do tráfego, da velocidade dos veículos, se existe vegetação circundante, pela posição e estrutura das estradas e dos fatores meteorológicos, entre outros (Puky, 2005; Glista *et al.*, 2007; Goosem, 2007; Carvalho & Mira, 2011; Colino-Rabanal & Lizana, 2012; Martínez-Freiría & Brito, 2012; Matos *et al.*, 2012; Seo *et al.*, 2015; Canal *et al.*, 2018;). E nem todos os fatores afetam todas as espécies da mesma forma, por exemplo, nas estradas secundárias do Canadá a mortalidade da rã *Pseudacris crucifer* foi maior para uma intensidade de tráfego baixa; para as rãs do género *Rana* foi maior para intensidades moderadas; e para o sapo *Bufo americanus* a mortalidade foi maior para uma intensidade de tráfego elevada, enquanto que algumas espécies não responderam às variações de tráfego (Mazerolle, 2004).

Perante o já exposto fique claro que os padrões espaciais e temporais de mortalidade de anfíbios podem alterar-se anualmente. Uma das razões para isto acontecer prende-se com a quantidade anual de chuva (Marsh, 2001). Carvalho & Mira (2011) verificaram que um ano particularmente seco reduziu a mortalidade de anfíbios, uma vez que a falta de água limitou a sua movimentação. Para além da reduzida precipitação, as grandes flutuações populacionais dos

anfíbios podem estar relacionadas com outros fatores que provoquem alterações na taxa de recrutamento, contudo, estas flutuações dependem da história de vida de cada espécie (Marsh, 2001; Green, 2005). Por acréscimo, alterações no habitat, tais como estradas, que afetem as movimentações dos anfíbios, em particular dos juvenis, podem gerar depauperamentos populacionais locais (Pittman *et al.*, 2014).

Medidas mitigadoras da mortalidade de anfíbios

As medidas mitigadoras deverão ser planeadas de forma hierárquica para evitar, minimizar, mitigar e por fim, compensar o impacto gerado pela estrada (Chee, 2015). Os autores Glista *et al.* (2009) e Beebee (2013) sugerem que as medidas mitigadoras podem ser classificadas em duas categorias: aquelas que modificam os comportamentos humanos e aquelas que modificam os comportamentos dos anfíbios, independentemente da sua natureza permanente ou temporária. As primeiras englobam medidas como a sinalização vertical e a alteração do limite de velocidade, enquanto as segundas compreendem medidas como criação de novos charcos para reprodução de anfíbios, a instalação de barreiras e de passagens para fauna (Glista *et al.*, 2009; Beebee, 2013).

Uma situação ideal, mas utópica, seria a completa remoção dos troços de estrada onde os anfíbios são mais atropelados (Puky, 2005; Schmidt & Zumbach, 2008). Também poder-se-ia proceder à interrupção temporária da circulação rodoviária da mesma (Jochimsen *et al.*, 2004; Puky, 2005; Cunnington *et al.*, 2014). Este corte de trânsito na estrada ocorreria normalmente entre as 17h e as 07h, entre Março e Abril. Contudo, este método nem previne a mortalidade juvenil, nem a mortalidade de indivíduos não reprodutores (Schmidt & Zumbach, 2008). Jochimsen *et al.* (2004) salientam que a utilização desta medida, para além de uma redução do número de anfíbios mortos, permite a manutenção das rotas migratórias e redução de stress dos animais. Apesar da sua eficácia, não é muito utilizada, uma vez que as pessoas necessitarão de alterar as suas rotas rodoviárias (Schmidt & Zumbach, 2008).

Outra medida passa pela colocação de sinais rodoviários com indicação de travessia de anfíbios, que pode ser usado em combinação com outras medidas mitigadoras (Huijser *et al.*, 2015). Todavia trata-se de um método pouco eficaz (Schmidt & Zumbach, 2008; Glista *et al.*, 2009; Beebee, 2013). Também a redução do limite de velocidade apresenta uma baixa eficácia, devido ao incumprimento por parte dos condutores (Schmidt & Zumbach, 2008).

Uma solução temporária consiste na colocação de barreiras temporárias que dirigem os anfíbios para caírem numa armadilha de fossetins (pitfall) de onde estes seriam depois retirados por voluntários. Mas como desvantagem requer uma grande quantidade de trabalho voluntário

durante um tempo limitado, constrangimento que minimiza os resultados, em especial para indivíduos dispersores e recém metamorfozados. (Puky, 2005; Beebee, 2013; Hamer *et al.*, 2015). A sua principal vantagem é o papel educacional ambiental na sociedade civil (Hamer *et al.*, 2015).

Uma maneira ecológica de modificar o comportamento dos anfíbios radica na construção artificial de novos charcos para reprodução, prevenindo que estes tenham de atravessar as estradas, enquanto que os anfíbios podem ser translocados ou colonizar naturalmente o charco (Puky, 2005; Schmidt & Zumbach, 2008). Não obstante, a construção de um novo charco não significa que exatamente as mesmas espécies o colonizem, ou que a qualidade deste seja igual a outros locais de reprodução. Ademais a translocação pode não ser bem sucedida, uma vez que maioria dos indivíduos de várias espécies apresentam filopatria ao local de nascença (Schmidt & Zumbach, 2008). Adicionalmente, no caso de colonização natural, o novo charco poderá demorar a ser colonizado (Hamer *et al.*, 2015).

Entretanto a instalação de passagens subterrâneas/aéreas e das suas barreiras associadas constituem medidas mitigadoras de caráter definitivo e surtem mais eficazes na redução da mortalidade aquando das épocas de migração e movimento de juvenis (Schmidt & Zumbach, 2008). Porém as barreiras induzem uma redução da conectividade populacional e, em casos mais graves, a uma perda de diversidade genética. Daí que haja uma combinação com passagens para fauna (Colino-Rabanal & Lizana, 2012; Beebee, 2013; van der Ree *et al.*, 2015b). As barreiras devem encaminhar os anfíbios para as passagens, ter uma pala no topo da barreira e não apresentar espaços que permitam o crescimento de vegetação ou que os anfíbios trepem (Jochimsen *et al.*, 2004; Schmidt & Zumbach, 2008). O topo destas deverá estar ao nível da superfície da estrada, de modo a que anfíbios que estejam na mesma consigam sair e, por fim, devem ser dispostas em alinhamento de ziguezague (Schmidt & Zumbach, 2008; van der Ree *et al.*, 2015b). Aliás, as passagens para a fauna variam bastante na sua estrutura e dimensão, dependendo das espécies alvo (Jochimsen *et al.*, 2004; Beebee, 2013), e claramente são mais eficazes quando associadas às barreiras (Cunnington *et al.*, 2014; van der Ree *et al.*, 2015b). No caso dos anfíbios, os tipos de passagens mais utilizadas são as subterrâneas, as quais tanto podem ser viadutos sobre um rio, como ser passagens hidráulicas (com ou sem modificações) e túneis específicos para anfíbios e répteis (Beebee, 2013; Hamer *et al.*, 2015). Os túneis criados especificamente para anfíbios podem ser unidirecionais ou bidirecionais, sendo esta última modalidade a mais utilizada (Schmidt & Zumbach, 2008). Algumas desvantagens destas medidas radicam nos custos relativamente elevados na sua implementação (Glista *et al.*, 2009), na possível

hesitação na travessia por partes de alguns anfíbios, ou então no aumento do efeito de predação por uma potencial maior concentração de predadores (Jochimsen *et al.*, 2004; Beebee, 2013).

Eficácia das barreiras e passagens subterrâneas

Não é apenas suficiente aplicar as medidas para reduzir a mortalidade por atropelamento, torna-se também necessário avaliar a sua eficácia. No caso das barreiras e das passagens subterrâneas, para além da sua função de reduzir o número de anfíbios que possam entrar na estrada, elas devem permitir que os anfíbios reprodutores utilizem os túneis e, em última análise, permitir a manutenção de uma população viável (Schmidt & Zumbach, 2008). Forman *et al.* (2003) no seu livro *Road Ecology: Science & Solutions* sintetizaram os seis critérios que devem ser aplicados na avaliação da eficácia das barreiras e das passagens para fauna. Estes critérios compreendem a (1) redução de mortalidade, (2) manutenção da conectividade, (3) preservação do fluxo genético, (4) conservação dos processos populacionais e funções do ecossistema, (5) livre circulação para dispersão e recolonização e, por fim, (6) manutenção das condições biológicas. É então necessário que a medição da eficácia esteja adaptada à/às espécie/s alvo e à estrutura mitigadora, de modo a obter dados fiáveis, que permitam comparações entre estudos (van der Grift *et al.*, 2015).

A localização das passagens é, portanto, um fator crítico no que toca à sua eficácia (Glista *et al.*, 2009; Hamer *et al.*, 2015). Estas devem ser implementadas nos locais de maior travessia de anfíbios, sendo estes locais mais fáceis de determinar para as espécies migradoras (Beebee, 2013). Todavia, tendo em conta que a mortalidade nas estradas está também associada à qualidade do habitat envolvente, as medidas de mitigação, de um modo geral, deverão ser aplicadas onde este é de melhor qualidade (Sillero, 2008; Hamer *et al.*, 2015), englobando assim tanto as espécies não migradoras, como também os indivíduos dispersores.

Existe um conjunto de características que podem afetar o uso das passagens subterrâneas pelos anfíbios (Jochimsen *et al.*, 2004; Beebee, 2013). A continuidade entre o habitat envolvente e as passagens, através da manutenção de vegetação natural e de solo, aumenta a sua eficácia para a fauna em geral (Glista *et al.*, 2009; Hamer *et al.*, 2015). Contudo, a resposta à presença de solo no fundo das passagens é diferente consoante as espécies de anfíbios (Lesbarrères *et al.*, 2004; Beebee, 2013). A presença de aberturas no topo das passagens, as quais permitem a entrada de luz, ar e água, facilitam o uso das mesmas, uma vez que irão permitir que os anfíbios se orientem e diminuir o efeito dissuasor criado pelas diferenças de temperatura e de humidade dentro e fora

das passagens. (Jochimsen *et al.*, 2004; Glista *et al.*, 2009). As características estruturais da própria passagem (tipo de abertura, dimensões e materiais de construção, entre outros) podem também influenciar o seu uso (Jochimsen *et al.*, 2004; Glista *et al.*, 2009). É então necessário que na construção das passagens seja tida em conta a/es espécie/s alvo, de modo a maximizar a sua eficácia (Hamer *et al.*, 2015; van der Ree *et al.*, 2015b).

No caso dos anfíbios, a utilização das passagens subterrâneas tem de estar associada à construção de barreiras, uma vez que a passagem per si não reduz a mortalidade anfíbios nas estradas (Cunnington *et al.*, 2014). Por outro lado, a utilização apenas de barreiras pode reduzir a mortalidade a zero, mas afetar a conectividade entre populações (Schmidt & Zumbach, 2008; Glista *et al.*, 2009). Todavia, diferentes tipos de barreiras vão apresentar eficácias diferentes. Cunnington *et al.* (2014), reportam uma redução de 40% na mortalidade de anfíbios numa estrada com uma barreira temporária implementada dos dois lados da estrada e com passagens subterrâneas. Já no caso das barreiras de cimento, Helldin & Petrovan (2019) reportam uma eficácia entre 85 e 100%, contudo, nas zonas adjacentes às barreiras ocorreu um aumento de mortalidade, que poderá dever-se a um encaminhamento dos anfíbios no fim das barreiras para a estrada ou a uma modificação das rotas de migração para esses locais. Para reduzir esta mortalidade no final das barreiras poderá construir-se as mesmas de modo a afastar os animais da estrada, terminar as barreiras em zonas com habitats de baixa qualidade ou ainda colocar-se sistemas de deteção de animais na estrada no fim das barreiras (van der Ree *et al.*, 2015b). Porém, independentemente do tipo de barreiras e passagens subterrâneas, estas devem ter manutenção anual para não reduzir a sua eficácia (Hamer *et al.*, 2015; van der Ree *et al.*, 2015b).

As passagens subterrâneas e as barreiras associadas são mais eficazes para espécies mais terrestres e com maior mobilidade (Matos, 2017). Contudo, mesmo dentro de cada espécie, o comportamento individual ao atravessarem as passagens é bastante variável, existindo indivíduos que completam a travessia, outros que voltam para trás e alguns que nem chegam a entrar nas passagens (Matos, 2017; Testud *et al.*, 2020).

Objetivos

Tendo em conta que o anteriormente referido nesta dissertação tem como objetivo geral determinar se as barreiras unilaterais implementadas na estrada EM535 são eficazes na redução da mortalidade de anfíbios, existem 3 objetivos específicos:

1. Avaliar a eficácia de duas barreiras com designs diferentes, uma delas temporária, localizada numa área mais urbanizada e de pequenas dimensões e outra de maior extensão, localizada numa área menos urbanizada e de caráter definitivo.
2. Determinar se os setores adjacentes às barreiras irão sofrer um aumento de mortalidade após a implementação das barreiras.
3. Aferir padrões de movimentação de modo a maximizar a localização sazonal das barreiras temporárias e identificar se será suficiente a utilização de barreiras unilaterais.

Métodos

Área de estudo

Os trabalhos de campo tiveram lugar na estrada municipal 535 (EM535), a qual liga, em cerca de 14km, as localidades de Santiago do Escoural à de São Cristóvão, ambas no concelho de Montemor-o-Novo. No âmbito desta dissertação apenas foram amostrados uns 2 km iniciais de estradas, os quais começam 200 m antes da primeira barreira e terminam 400 m após a última barreira.

Esta estrada EM535 encontra-se envolvida por um sistema agroflorestal de montado, no qual predomina a pecuária de gado bovino e suíno. O estrato arbóreo é composto essencialmente por sobreiro *Quercus suber* e azinheira *Quercus rotundifolia* e a sua densidade aumenta à medida que nos afastamos de Santiago do Escoural. Entretanto no troço inicial da estrada existe alguma influência humana pela proximidade de edificações nas proximidades e ainda, nos primeiros 500m, há valas e muros nas bermas. Ademais todo o troço de estrada é acompanhado, de forma mais ou menos paralela, por uma ribeira. As bermas das estradas são essencialmente compostas por herbáceas, as quais foram ceifadas no Verão de 2020 pelos serviços municipais e por particulares.

Em termos bioclimáticos, esta estrada localiza-se no Alentejo Central, registando-se uma temperatura média anual 15,9°C (IPMA, n.d.). Contudo, nesta região ocorre uma grande amplitude térmica, em que o mês mais frio corresponde a janeiro (9,3°C) e o mês com 19 temperatura mais elevada corresponde a agosto (23,3°C) (IPMA, n.d.). A pluviosidade anual média nesta região é de 609,4 mm, sendo que o mês mais chuvoso é dezembro (102,7 mm) e o mês menos chuvoso é agosto (6,6 mm), contudo, o mês de julho não difere muito em termos pluviométricos (8,6 mm), comparando com agosto (IPMA, n.d.). Assim, devido aos Invernos frescos e chuvosos e aos Verões quentes e secos, mas também ao facto de nos meses de seca (julho e agosto) a precipitação ser inferior a duas vezes a temperatura média, o clima desta região classifica-se como bioclima mediterrânico de acordo com Rivas-Martínez (2008).

Espécies ocorrentes na área de estudo

A lista de potenciais espécies ocorrentes está de acordo com Loureiro *et al.*, (2008); Maravalhas & Soares, (2018) e Speybroeck *et al.*, (2020) e encontram-se representadas na tabela I. Na área de estudo podem ser encontradas 13 espécies de anfíbios: 4 espécies de caudados e 9 espécies de anuros, das quais 3 são rãs e 6 são sapos.

Tabela I - Espécies de anfíbios potencialmente ocorrentes na área de estudo (Loureiro *et al.*, 2008; Maravalhas & Soares, 2018; Speybroeck *et al.*, 2020).

Espécie	Nome comum	Sigla
<i>Alytes cisternasii</i>	Sapo-parteiro-ibérico	Ac
<i>Bufo spinosus</i>	Sapo-comum	Bs
<i>Epidalea calamita</i>	Sapo-corredor	Ec
<i>Discoglossus galganoi</i>	Rã-de-focinho-pontiagudo	Dg
<i>Hyla meridionalis</i>	Rela-meridional	Hme
<i>Hyla molleri</i>	Rela-ibérica	Hmo
<i>Lissotriton sp.</i>	Tritão-de-ventre-laranja	L
<i>Pelobates cultripipes</i>	Sapo-de-unha-negro	Pc
<i>Pelodytes sp.</i>	Sapinho-de-verrugas-verdes	P
<i>Pelophylax perezi</i>	Rã-verde	Pp
<i>Pleurodeles waltl</i>	Salmandra-de-costelas-salientes	Pw
<i>Salamandra salamandra</i>	Salmandra-de-pintas-amarelas	Ss
<i>Triturus pygmaeus</i>	Tritão-marmoreado-pigmeu	Tp

Barreiras mitigadoras

Existem duas barreiras no troço de estrada amostrado, ambas unilaterais e colocadas do lado esquerdo da estrada quando nos dirigimos de Santiago do Escoural para São Cristóvão.

A primeira barreira, instalada no dia 14 de dezembro de 2018, fica localizada no início da estrada, numa zona com alguma influência humana, por estar nas proximidades de habitações. Trata-se de uma barreira de lona (linóleo), com uma extensão reduzida (cerca de 60 m de comprimento) e sem estar associado a nenhuma passagem subterrânea. Para impedir que os anfíbios passassem rasteiros junto ao solo, a aba inferior desta barreira foi previamente enterrada. Não obstante em vários pontos a lona encontrava-se levantada do solo. Durante o estudo e ao longo desta barreira de lona, verificou-se que o crescimento da vegetação nas bermas fazia com que várias plantas que ultrapassassem o limite superior da aba da lona.

A segunda barreira foi construída em cimento com cerca de 800 m de comprimento, tendo sido finalizada no dia 30 março de 2018. Esta barreira conta com três passagens subterrâneas /hidráulicas associadas: uma em cada ponta da barreira e outra numa posição mais intermédia. Semelhante ao que acontecia na barreira de lona, também algumas plantas ultrapassam o limite superior da barreira. A presença de plantas foi maior na amostragem realizada na Primavera, uma vez que os serviços municipais procederam ao corte das plantas durante o Verão.

Recolha de dados

Existem vários métodos de quantificação da mortalidade nas estradas. Nesta dissertação optamos por realizar cruzeiro rodoviário. Este método pode apresentar teoricamente um poder de deteção ligeiramente menor para animais e carcaças pequenos do que o transeto feito a pé (Beebe, 2013), então constitui um método bastante referido na literatura científica. Ademais, o cruzeiro rodoviário que permitiu comparar os nossos dados com aqueles dados obtidos pelo projeto LIFE LINES, obtidos similarmente na mesma estrada. Assim, em cada sessão de amostragem foram então realizadas duas passagens de carro ao longo e em cada direção da estrada, conduzindo a uma velocidade de aproximadamente 10 km/h, parando quando necessário para registar os anfíbios avistados, vivos ou mortos presentes no pavimento. Esta velocidade foi inferior àquela usada em outros estudos (Glista *et al.*, 2007; Sillero, 2008; Carvalho & Mira, 2011; Martínez-Freiría & Brito, 2012b; Matos *et al.*, 2012; Garriga *et al.*, 2017; Canal *et al.*, 2018). Tal foi possível devido à curta extensão do troço de estrada analisado, permitindo assim aumentar a

detetabilidade de animais mais pequenos. Entretanto a segunda passagem de amostragem foi sempre iniciada 20 min após terminada a primeira. A realização de duas passagens de carro, mais uma vez, só é possível pelo troço de estrada ser de reduzida dimensão. Mas permite um acréscimo do número de anfíbios amostrados, bem como a deteção de indivíduos e/ou espécies que não foram amostrados na primeira passagem. Contudo, não foram removidos os cadáveres para não interferir com a amostragem do LIFE LINES. Então para evitar contabilizar o mesmo indivíduo morto mais que uma vez, cada indivíduo encontrado morto na estrada foi marcado com uma fita fluorescente. Assim que as amostragens do LIFE LINES findaram, passaram a ser removidos as carcaças da estrada. Perante o exposto, estatisticamente, os dados de cada passagem foram posteriormente tratados como se tratasse de observações independentes. Anotou-se ainda a direção de deslocação/atravessamento dos anfíbios tanto para os indivíduos vivos como para os indivíduos mortos.

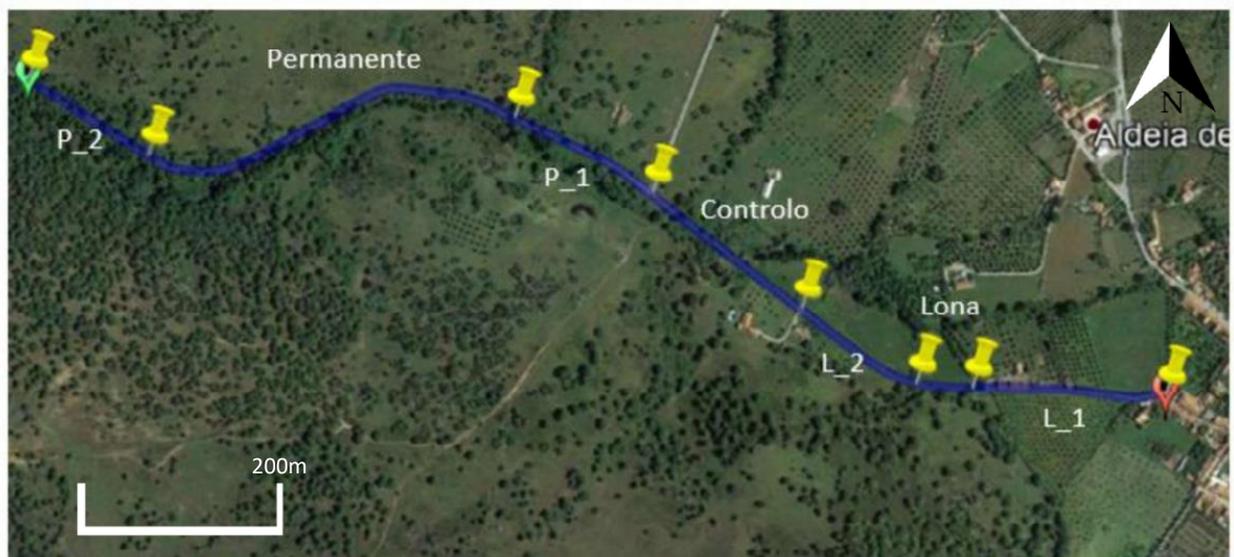


Figura 1 – Divisão dos setores de amostragem. Setor lona corresponde ao setor onde estava implementada a barreira de lona. Setor permanente corresponde ao setor onde estava implementada a barreira permanente. Setores L_1 e L_2 são os setores adjacentes à barreira de lona. Setores P_1 e P_2 são os setores adjacentes à barreira permanente. Setor Controlo é o setor sem influência da barreira.

Cada sessão de amostragem foi temporalmente adaptada para aqueles dias em que se previu noites chuvosas ou com humidade relativa superior a 80% e temperatura mínima igual ou superior a 10°C, normalmente quando anfíbios se encontravam mais ativos e apresentavam maior probabilidade de atravessarem as estradas (Mazerolle, 2004; Mazerolle *et al.*, 2005; Sillero, 2008). Também a amostragem decorreu fora das épocas reprodutoras dos anfíbios ibéricos que habitam na região mediterrânea, de forma a abranger os movimentos diários fora destas épocas.

A ideia inicial era amostrar a pé as zonas de barreiras, tanto na barreira de lona como na barreira de cimento, para contabilizar o número de anfíbios que tentavam atravessar a estrada, embora potencialmente impedidos pela própria barreira. Todavia, devido ao estado de conservação das barreiras, mormente à quantidade exuberante de vegetação presente durante Primavera, tal impedia visualização rápida destas bandas, pelo que a ideia foi abandonada.

Entretanto para efeitos de recolha de dados, facilitou dividir a área de estudo em sete setores diferentes, como demonstrado na figura 1. Os setores adjacentes às barreiras têm pelo menos 200 m de comprimento, pois com base nos dados disponíveis em Trochet *et al.* (2014) foi calculada a média das distâncias percorridas durante o período migratório de anfíbios europeus. Outros estudos demonstram que 75% dos anfíbios não se deslocam muito mais que estes 200m estipulados para a amostragem (Rittenhouse & Semlitsch, 2007).

Os dados recolhidos agrupam-se por setor em que cada anfíbio foi encontrado, com a indicação da espécie observada, e anotou-se a direção de deslocação para a qual os anfíbios se dirigiam quando observados. Esta última foi assinalada: com D, se os animais se dirigissem ao encontro da barreira; com F, caso se dirigissem para o lado oposto à barreira; e com O se eles fossem encontrados mais ou menos paralelos à linha de estrada (figura 2).

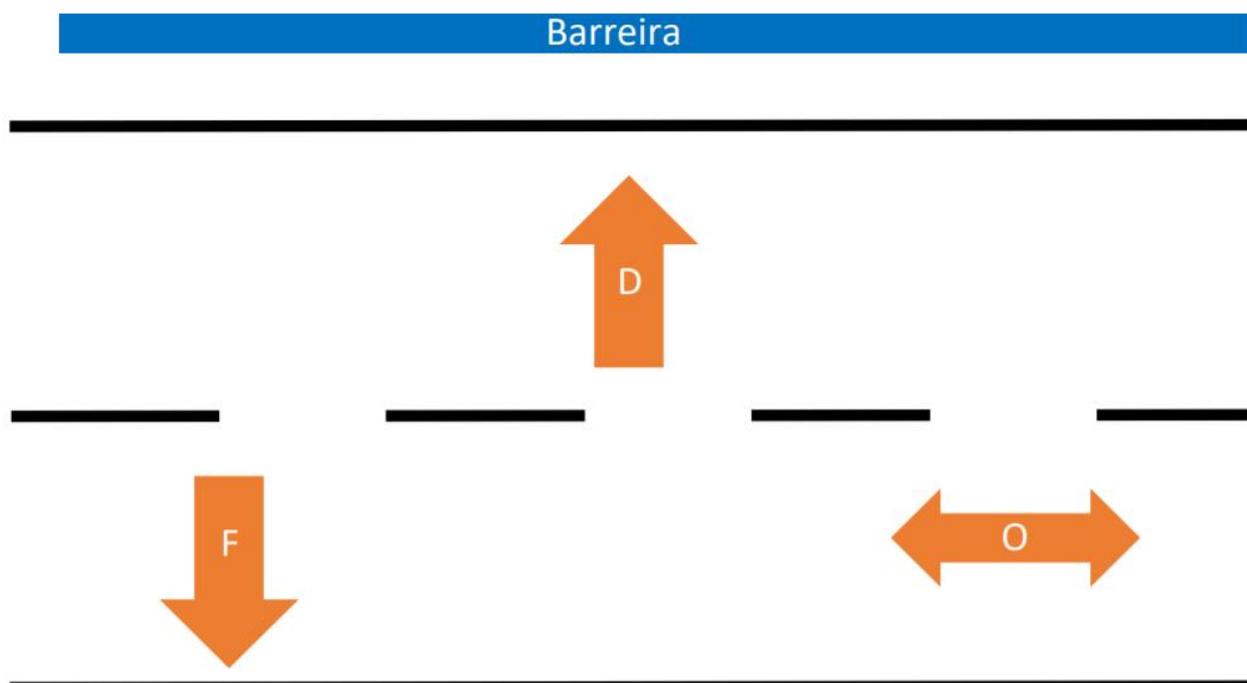


Figura 2– Esquema de como foram assinaladas as deslocações dos anfíbios. D- em direção à barreira, F- na direção oposta à barreira e O- movimento paralelo à estrada.

Dados do LIFE LINES

Gentilmente foram-nos cedidos pelo projeto LIFE LINES os respetivos dados anteriores e posteriores à construção das barreiras, os quais adicionados aos nossos próprios dados permitiram uma análise mais robusta dos resultados. Especificando os dados anteriores à construção das barreiras abrangem os anos de 2015, 2016, 2017 e 2018. No ano 2015 foram realizadas pela equipa do projeto 9 saídas de campo, que contaram com um total de 113 anfíbios na área de estudo selecionada e abordada nesta dissertação. Para a mesma área, em 2016 e 2017 foram realizadas 5 saídas por ano, em que no primeiro foram encontrados 45 anfíbios e no segundo 40 anfíbios. Nos anos de monitorização anteriores à construção das barreiras, o ano 2018 foi o que contou com maior número de saídas de campo, tendo um total de 13, bem como maior número de anfíbios encontrados, com um total de 3437. Assim, antes de construídas as barreiras fizeram-se 32 saídas de campo, registando-se 3635 anfíbios. No caso dos dados após a construção das barreiras, estes correspondem aos anos 2018 e 2019 complementados com dados recolhidos nos anos 2020 e 2021. No ano 2019 foram realizadas 11 saídas de campo, tendo sido encontrados 840 anfíbios. Ao contrário dos dados recolhidos nesta dissertação, os dados do projeto LIFE LINES resultam apenas de uma passagem unidirecional de carro.

Análise estatística

Para todo o tratamento e análise dos dados foi realizada com recurso ao software R Studio (versão 1.1.463).

Antes da análise estatística propriamente dita, foi necessário realizar um bootstrap, para aleatoriamente selecionar quais os anfíbios amostrados na primeira volta e quais os amostrados na segunda volta durante a Primavera, Verão e Outono de 2020, uma vez que por lapso não fora anotada essa passagem distinta. Por isso aplicou-se um teste de Mann-Whitney para perceber se o número de anfíbios por saída por quilómetro era diferente entre as duas voltas. Ademais no bootstrap simularam-se os dados 10 000 vezes, calculando para cada um dos replicados um fator de correção do número de indivíduos encontrados na primeira volta. De seguida, estimou-se a média dos fatores de correção e daí foi criada uma distribuição binomial aleatória em que a probabilidade de encontrar um indivíduo na primeira passagem era igual à média dos fatores de correção.

A análise estatística abarca os três tópicos fundamentais, que vão ao encontro dos objetivos desta dissertação: eficácia das barreiras mitigadoras, análise das zonas adjacentes às barreiras e análise dos padrões de deslocação.

No que respeita à análise da eficácia das barreiras mitigadoras, realizou-se uma análise semelhante ao apresentado em Cunnington *et al.* (2014), em que se desenvolveu um modelo GLM com a família binomial negativa, para comparar o setor de controlo, com os setores onde estão implementadas as barreiras. Este método foi escolhido perante o incumprimento de alguns pressupostos para a realização de testes paramétricos e da fraca precisão dos testes não paramétricos alternativos à ANOVA multifatorial. Uma vez que durante o projeto LIFE LINES apenas foram realizadas saídas de campo durante o Outono e o Inverno, foram então comparados os períodos de Inverno e Outono separadamente dos períodos de Primavera e Verão. Se não foi aplicada uma distribuição Poisson, muito usada para dados de contagens, então usou-se uma distribuição binomial negativa, a qual é adequada para dados de contagens em que o desvio padrão é superior à média, e no caso desta última condição não ser verificada, a distribuição transforma-se numa Poisson.

Em suma, os dados foram agrupados em três categorias diferentes, aqui denominadas de tratamentos: dados recolhidos quando as barreiras estavam ausentes (Aus), dados recolhidos durante o Inverno e Outono quando as barreiras estavam presentes (Pres1) e dados recolhidos durante a Primavera e Verão quando as barreiras estavam presentes (Pres2). Optámos por desenvolver dois modelos em separado: um para a barreira de lona e outro para a barreira permanente, de modo a não inserir uma terceira variável explicativa, uma vez que as barreiras foram implementadas em diferentes épocas do ano. As barreiras devem impedir a passagem de anfíbios para a estrada, então, por este motivo, para testar a sua eficácia foi modelado o número de anfíbios encontrados na estrada por saída por quilómetro, em função do tratamento e do setor (Controlo e Barreira de Lona ou Barreira Permanente). No caso da interação entre tratamento e setor ser significativa foram realizados testes emparelhados com a correção de Tukey.

As zonas adjacentes às barreiras sofreram o mesmo tipo de análise estatística que as zonas com barreira, onde foi comparado o número de anfíbios por saída por quilómetro, em função do tratamento e setor, sendo que mais uma vez foi realizado um modelo para cada setor em separado, tendo sido realizados na totalidade quatro modelos (para L_1, L_2, P_1 e P_2).

Já para os padrões de deslocação usaram-se testes de independência de qui-quadrado, avaliando a associação da direção de movimento às estações do ano e aos setores. Para estas duas análises apenas incluímos os dados referentes aos anfíbios observados vivos, de modo a evitar contabilizar as mudanças de direção causadas pelos veículos. Para a análise das estações do ano a variável utilizada foi o número de indivíduos por saída, enquanto para a análise dos setores foi analisado o número de indivíduos por quilómetro. No caso da análise das estações apenas foram utilizados os dados referentes ao setor controlo de modo a não existir influência das barreiras nesta análise. De referir ainda que os dados da direção apenas foram recolhidos quando as duas barreiras já estavam instaladas. Foi posteriormente calculado os valores dos resíduos de Pearson, de modo a perceber qual a natureza destas associações.

Resultados

No total das 80 saídas de campo foram observados 5260 anfíbios pertencentes a 12 das 13 espécies potenciais de serem encontradas na área de estudo (Tabela I): para *Pelodytes ibericus* houve apenas 4 registos, ao invés a espécie mais observada foi *Epidalea calamita* (4436 registos). Mas 16 carcaças não foram possíveis de identificar. O ano de 2018 mostrou um maior número de anfíbios observados (média de 264,4 indivíduos por saída) enquanto o ano de 2017 foi aquele com menor número de anfíbios (média de 8 anfíbios por saída). No cálculo da diversidade batracofaunística, o ano de 2019 destacou-se (com um valor médio do índice de Shannon por saída de -0,223). Já a menor diversidade ocorreu em 2020, (índice de Shannon por saída de -1,201). No cômputo geral a estação do ano, em que obtivemos um maior número de registos de anfíbios por saída foi o Outono, seguiu-se o Verão, depois o Inverno e por fim a Primavera (média de 107,2; 34; 15,8 e 13,8 anfíbios por saída, respetivamente). No conjunto total dos 7 anos acumularam-se registos de 2656,6 anfíbios por quilómetro, sendo mais abundante no setor L_1 (10056,6 indivíduos por quilómetro) e menos abundante no setor barreira permanente (481,25 indivíduos por quilómetro).

Comparados com o setor de controlo, observou-se uma diminuição de anfíbios de 89,84% no setor da barreira permanente, de 51,83% para o setor P_1 e de 66,77% para o setor P_2, isto para o tratamento Pres1. Já para o tratamento Pres2, comparativamente ao setor de controlo, verificou-se uma diminuição de 72,83%, 60,87% e 76,09%, para os setores da barreira permanente, P_1 e P_2, respetivamente. No que respeita a barreira de lona, para o tratamento

Pres1, obteve-se uma diminuição de 54,63% para o setor L_2 e um aumento do número de anfíbios de 79,44% e de 39,87% (setores L_1 e Lona, respetivamente), quando comparados com o setor de controlo. Para o tratamento Pres2 ocorreu uma diminuição de 14,73% para L_1, de 48,84% para L_2 e de 36,05% para o setor de lona, quando comparado com o setor de controlo.

Eficácia da barreira permanente

No período em que a barreira permanente estava ausente foram identificados 292 anfíbios, sendo que destes apenas 128 foram observados nos setores de controlo e da barreira permanente. No setor de controlo foram contabilizados 18 indivíduos, enquanto no setor da barreira permanente foram contabilizados 110 indivíduos, no total de 25 saídas de campo. A partir da implementação da barreira foram detetados nestes dois setores 692 anfíbios no Inverno e Outono (492 no controlo e 2 na zona da barreira permanente) e 144 anfíbios no Verão e Primavera (69 no controlo e 75 na zona da barreira permanente).

A análise estatística revelou, que ao comparar o setor controlo com o setor de barreira, existe uma interação significativa entre o setor e o tratamento (dados suplementares tabela I), indicando assim existir uma influência da presença das barreiras e da estação do ano na quantidade de anfíbios encontrados nas estradas. Ocorreram diferenças significativas no setor de controlo entre a ausência de barreira e a sua presença no Outono/Inverno ($p = <.0001$), setor de controlo entre a presença da barreira no Outono/Inverno e a sua presença na Primavera e Verão ($p = <.0001$), entre o setor de barreira permanente e o setor de controlo aquando da ausência de barreira ($p = 0.0004$) e entre o setor de barreira permanente e o setor de controlo quando a barreira estava presente no Outono e no Inverno ($p = 0.0275$) (figura 3).

Eficácia da barreira permanente

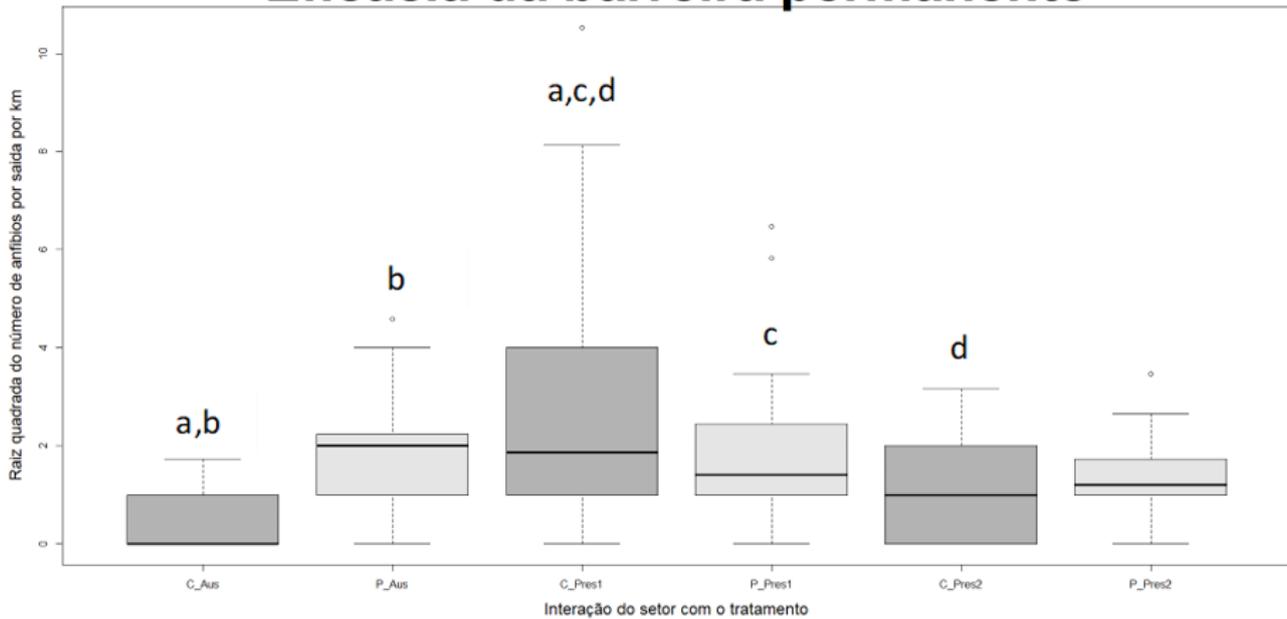


Figura 3- Número de indivíduos por saída por quilômetro para cada interação entre setor e tratamento; C- setor de controle; P- setor permanente; Aus- barreira ausente; Pres1- barreira presente no Outono e Inverno; Pres2- barreira presente na Primavera e Verão. As letras (a-d) indicam as interações significativamente diferentes.

Eficácia dos setores adjacentes à barreira permanente

No conjunto dos três setores (controle, P_1 e P_2) antes da implementação da barreira foram contabilizados 83 anfíbios: 18 no setor de controle, 22 em P_1 e 43 em P_2. No Inverno e Outono, já com a barreira permanente instalada, foram identificados no setor de controle 492 anfíbios, no setor P_1 237 anfíbios e no setor P_2 327 anfíbios, dando um total de 1056 anfíbios. Por fim, com a barreira presente na Primavera e Verão foram identificados 129 anfíbios (69 no Controle, 27 em P_1 e 33 em P_2).

Tal como para o setor Permanente, para o modelo que incorpora o setor P_2, a interação entre o setor e tratamento foi significativo ($p= 0.02424$), sendo que esta interação não foi significativa para o modelo com o setor P_1 ($p= 0.0871688$) (dados suplementares tabela II). No que diz respeito ao setor de controle foram encontradas diferenças significativas entre a ausência de barreira e a sua presença no Outono e Inverno ($p= <.0001$) e entre o último tratamento e a presença da barreira na Primavera e Verão ($p= 0.0002$) (figura 4). Da mesma forma para o setor P_2, as diferenças significativas ocorreram entre a ausência de barreira e a sua presença no Outono e Inverno ($p= 0.0010$) e entre o último tratamento e a presença da barreira na Primavera e Verão ($p= <.0001$) (figura 4).

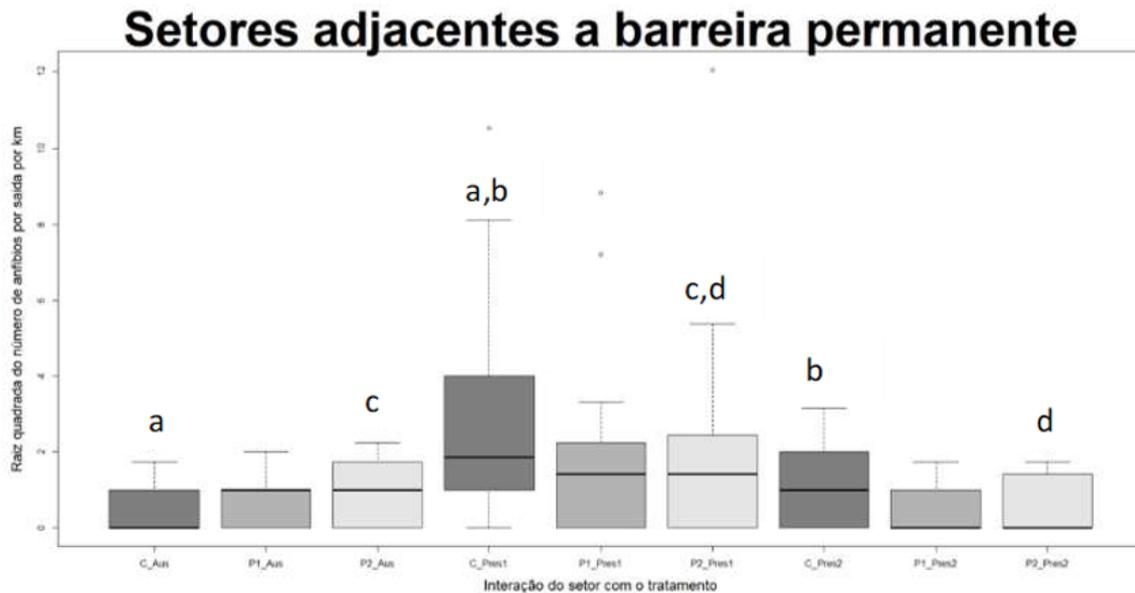


Figura 4- Número de indivíduos por saída por quilômetro para cada interação entre setor e tratamento; C- setor de controlo; P_1- setor adjacente à barreira permanente; P_2- setor adjacente à barreira permanente; Aus- barreira ausente; Pres1- barreira presente no Outono e Inverno; Pres2- barreira presente na Primavera e Verão. As letras (a-d) indicam as interações significativamente diferentes

Eficácia da barreira de lona

No setor da barreira de lona foram identificados 126 anfíbios com a barreira ausente, 122 com a barreira presente no Inverno e Outono e 17 com a barreira presente na Primavera e Verão, perfazendo um total de 265 anfíbios. Nos mesmos períodos foram identificados no setor de controlo 309 anfíbios, 201 anfíbios e 69 anfíbios, respetivamente, dando um total de 579 anfíbios.

O modelo desenvolvido para o setor Lona não apresentou uma interação significativa entre o setor e o tratamento ($p= 0.45863$), sendo que apenas o setor e o tratamento isoladamente foram significativos ($p= 0.00322$ e $p= 2.542e-05$, respetivamente) (figura 5, dados suplementares tabela I).

Eficácia da barreira de lona

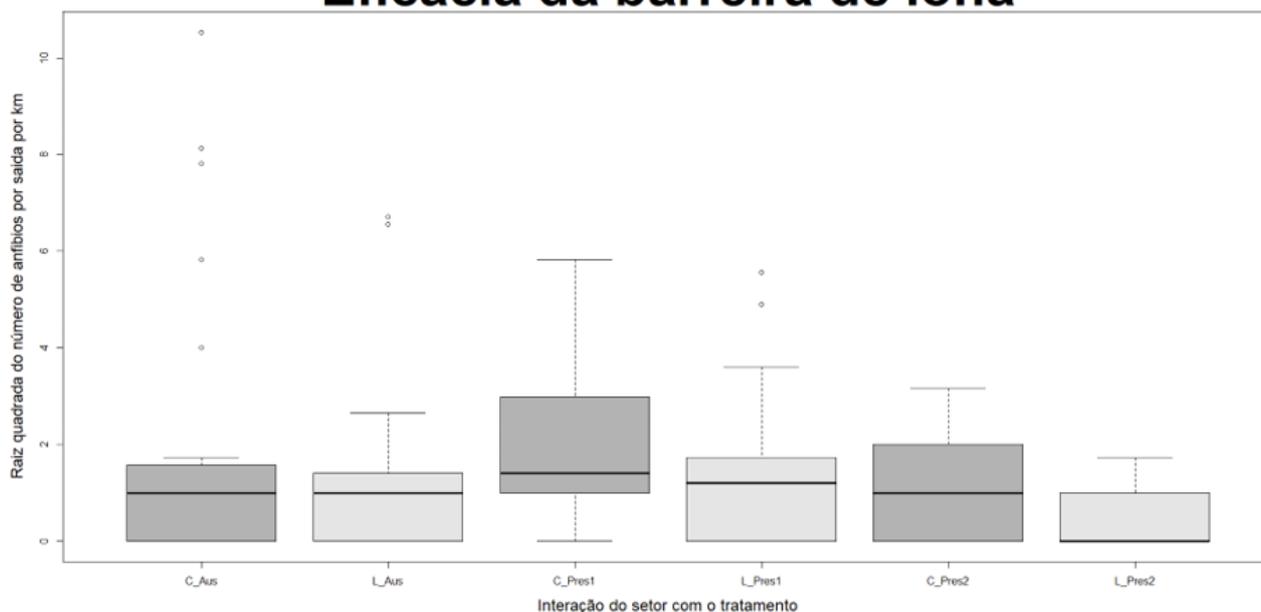


Figura 5- Número de indivíduos por saída por quilômetro para cada interação entre setor e tratamento; C- setor de controlo; L-setor da barreira de lona; Aus- barreira ausente; Pres1- barreira presente no Outono e Inverno; Pres2- barreira presente na Primavera e Verão.

Eficácia dos setores adjacentes à barreira de lona

O número total de anfíbios registados quando a barreira estava ausente foi de 2860: 309 no setor de controlo, 2351 no setor L_1 e 200 no setor L_2. A presença de barreira no Inverno e no Outono levou a uma diminuição do número de anfíbios identificados, tendo passado para 201 no setor de controlo, para 602 no setor L_1 e 97 no setor L_2. Por fim, na Primavera e Verão e na presença da barreira de lona foram amostrados 69 indivíduos no setor de controlo, 64 no setor L_1 e 28 no setor L_2.

Á semelhança das zonas adjacentes à barreira permanente, apenas um dos dois modelos apresentou como significativa a interação entre setor e tratamento, neste caso o modelo que continha o setor L_1 ($p= 0.02144$) (dados suplementares tabela III). As diferenças significativas ocorreram quando a barreira estava ausente entre os setores controlo e L_1 ($p= 0.0002$), no setor L_1 entre a ausência de barreira e a sua presença no Outono e Inverno ($p= 0.0321$), no setor L_1 entre a ausência da barreira e a sua presença na Primavera e Verão ($p= <.0001$) e no setor L_1 entre Outono/Inverno e Primavera/Verão ($p= 0.0005$) (figura 6).

Setores adjacentes a barreira de lona

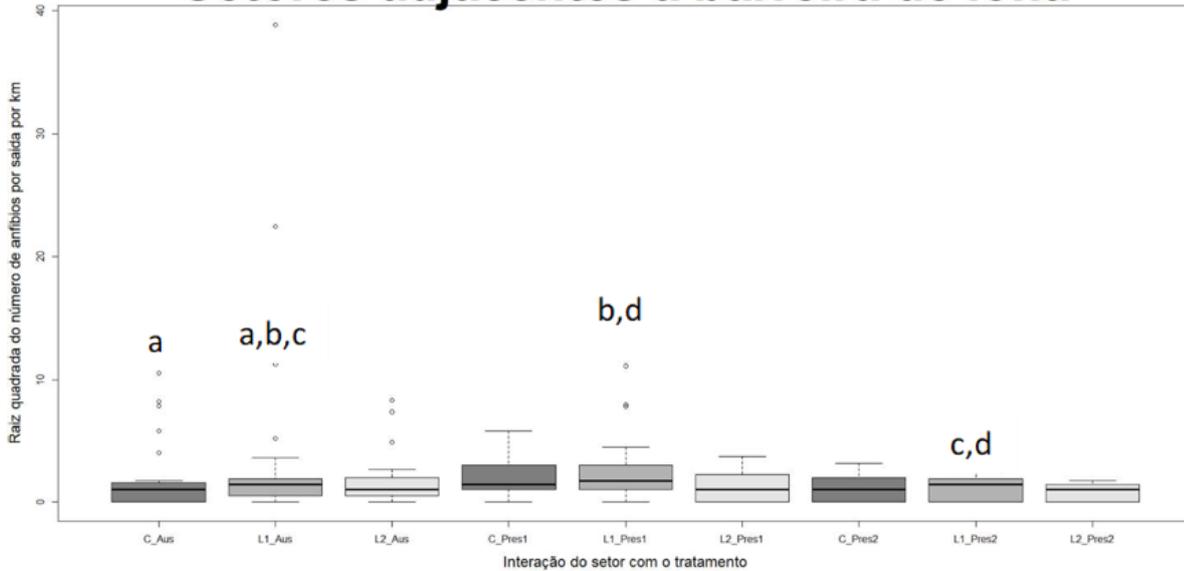


Figura 6- Número de indivíduos por saída por quilômetro para cada interação entre setor e tratamento; C- setor de controle; P_1- setor adjacente à barreira permanente; P_2- setor adjacente à barreira permanente; Aus- barreira ausente; Pres1- barreira presente no Outono e Inverno; Pres2- barreira presente na Primavera e Verão. As letras (a-d) indicam as interações significativamente diferentes

Direção dos anfíbios

A direção dos anfíbios apenas foi avaliada após a construção das barreiras. Da realização do teste do qui quadrado conclui-se que existe uma associação entre o setor e a direção dos anfíbios ($p= 0.0004998$), bem como entre a estação do ano e a direção dos mesmos ($p= 0.0009995$). Em relação aos setores, existe uma associação negativa entre os anfíbios que se deslocam na direção F e o setor de controle, mais ainda, existe uma associação positiva entre o setor de controle e os anfíbios que se deslocam na direção D (figura 7). Por outro lado, o setor da barreira permanente está associado positivamente aos anfíbios que se deslocam na direção D. Por fim, relativo às estações do ano, apenas foi encontrada uma associação positiva entre o Verão e os anfíbios com movimentos paralelos à estrada (figura 8).

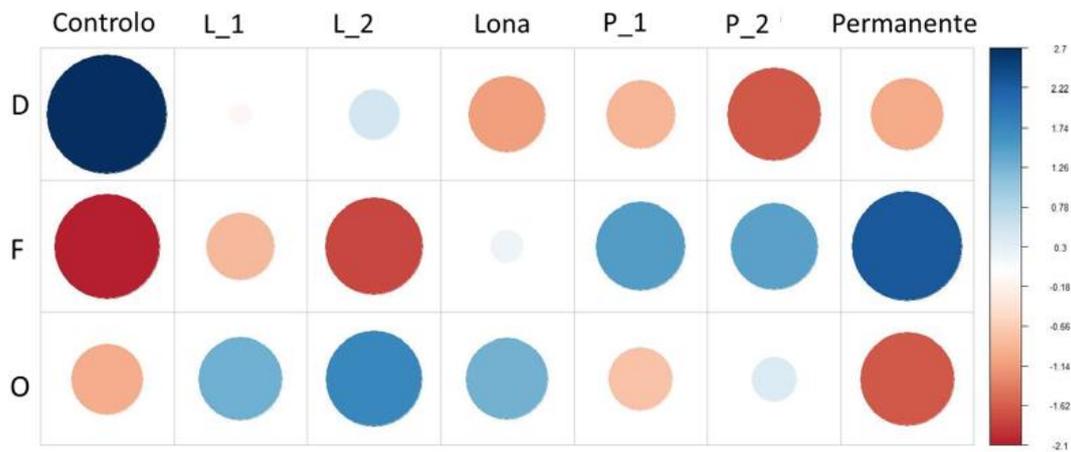


Figura 7 Correlação entre a direção dos anfíbios e os diferentes setores. Os círculos vermelhos correspondem a correlações negativas e os círculos azuis a correlações positivas. Quanto maior e mais escuro o círculo mais forte é a correlação. D- Direção no sentido da barreira; F- direção no sentido oposto ao da barreira; O- paralelo à estrada; Controlo- setor de controlo; L_1-setor adjacente à barreira de lona; L_2-setor adjacente à barreira de lona; Lona- setor da barreira de Lona; P_1-setor adjacente à barreira permanente; P_2- setor adjacente à

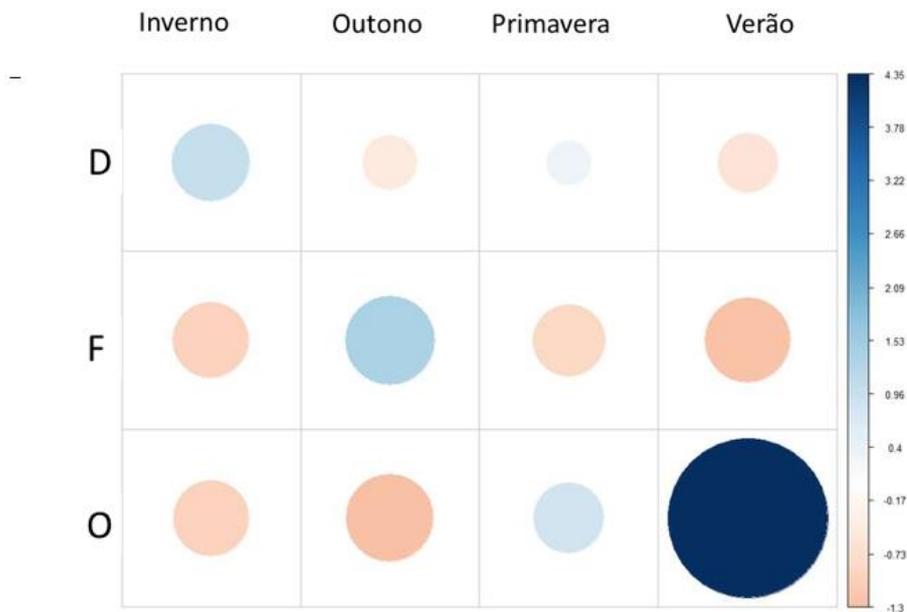


Figura 8-Correlação entre a direção dos anfíbios e as diferentes estações do ano. Os círculos vermelhos correspondem a correlações negativas e os círculos azuis a correlações positivas. Quanto maior e mais escuro o círculo mais forte é a correlação. D- Direção no sentido da barreira; F- direção no sentido oposto ao da barreira; O- paralelo à estrada; Inverno- dados recolhidos no Inverno; Outono- dados recolhidos no Outono; Primavera- dados recolhidos na Primavera; Verão- dados recolhidos no Verão.

Discussão

Influência do design das barreiras na sua eficácia

Para serem eficazes as barreiras necessitam impedir que os anfíbios tenham acesso à estrada, diminuindo assim a probabilidade destes serem atropelados (van der Ree et al., 2015b). Ora a realização de estudos de BACI (Before-After-Control-Impact) (van der Ree et al., 2015c), que permite identificar se as mudanças observadas na quantidade de anfíbios nas estradas se devem à instalação das barreiras ou às flutuações nas populações de anfíbios (van der Grift et al., 2015).

Neste estudo foi possível perceber que as características de cada barreira têm impacto na sua eficácia. Neste caso, o setor da barreira permanente, após a instalação da barreira, apresentou menos anfíbios na estrada no Outono e Inverno que o setor controle no mesmo período (Figura 3). Assim sendo, podemos concluir que a barreira permanente impediu o acesso dos anfíbios à estrada. Por outro lado, a presença da barreira de lona, durante o Outono e o Inverno não impediu o acesso de anfíbios à estrada (Figura 5, dados suplementares Tabela I), sugerindo assim que o design da barreira pode influenciar a eficácia da mesma. Isto corrobora com o estudo de Helldin & Petrovan (2019), em que a instalação de barreiras permanentes em três estradas diferentes levou a uma diminuição de 85-100% do número de anfíbios encontrados, percentagem essa superior àquela apurada após a da instalação de barreiras temporárias (ex: lona), que em alguns casos rondou os 40% (Cunnington et al., 2014). Esta diferença de eficácia pode ser explicada, em parte, pela capacidade de algumas espécies treparem pela barreira temporária/lona com facilidade (Aresco, 2005); e ainda pela possibilidade de escaparem por partes rasteiras da barreira desenterradas ou através de eventuais rasgões na lona (Hamer et al., 2015). No caso das barreiras permanentes de cimento, a presença de uma determinada espécie mais ágil pode reduzir a sua eficácia. Por exemplo Dodd et al. (2004) verificaram uma redução de 93,5% para 65% na eficácia da barreira usada quando eram consideradas as relas (*Hyla* sp.). Todavia neste estudo apenas foram registados cinco indivíduos do gênero *Hyla*. Existem também alguns indivíduos que conseguem trepar pelas plantas que ultrapassam a parte superior da barreira (Hamer et al., 2015; van der Ree et al., 2015b). No entanto, no nosso estudo as bermas junto das duas barreiras apresentavam densidades semelhantes de vegetação circundantes, pelo que esta variável não parece ter influenciado as diferenças de eficácia observadas.

Apesar de neste estudo existirem diferenças na eficácia entre as duas barreiras (por possuírem características muito distintas de localização, dimensão, material de construção e 32

presença de passagens subterrâneas), seriam necessários outros estudos que avaliassem individualmente estas variáveis, de modo a minimizar o efeito sinérgico destes vários fatores envolvidos na análise da sua eficácia. Contudo, parece existir uma tendência na literatura mais para avaliar a eficácia das diferentes concepções estruturais de passagens subterrâneas (exemplos: Jochimsen et al., 2004; Glista et al., 2009), e não tanto do perfil das barreiras. De acordo com Rytwinski et al. (2016), olhando globalmente para os táxones em conjunto (mamíferos, aves reptéis e anfíbios), a dimensão das barreiras parece ter pouco impacto na sua eficácia. Todavia, se a presença de passagens reduz a eficácia média das barreiras de 85,8% para 50,7%, então os autores tendiam a explicar essa diferença como o efeito das diferenças de design das barreiras ou designo de delineamento distinto dos estudos, quando comparados, e não devido à presença das passagens por si só (Rytwinski et al., 2016). Por outro lado, as barreiras com passagens subterrâneas terminais, semelhantes à barreira permanente deste estudo, poderiam evitar que os anfíbios, ao chegarem ao fim das ditas barreiras caminhassem para o interior da zona mitigada (Helldin & Petrovan, 2019), levando a uma maior eficácia da mitigação quando comparada com barreiras sem passagens terminais. Também a altura das barreiras pode influenciar a eficácia (Woltz et al., 2008) e daí a necessidade de um planeamento estrutural tendo em vista uma ou várias espécies alvo e as características biológicas dessas espécies (van der Ree et al., 2015b).

Influência da estação do ano na eficácia da barreira permanente

Ao contrário da diferença entre o setor de controlo e o setor de barreira permanente no Outono e Inverno, a presença da barreira na Primavera e Verão não provocou diferenças significativas na quantidade de anfíbios avistados entre os dois setores; ou seja, a barreira apenas parece ser eficaz no Outono e Inverno (Figura 3). Porém, esta influência das estações não se verificou na barreira de lona (dados suplementares na Tabela I, Figura 5).

Ao analisar a Figura 3, verificamos que a barreira foi eficaz no período com maior quantidade de anfíbios (Outono e Inverno), no setor de controlo e no setor de barreira permanente, que corrobora os dados de Garriga et al. (2017), em que apesar de existirem dois picos na quantidade de anfíbios nas estradas, o pico do Outono é maior. Contudo, quando avaliarmos a eficácia das barreiras temos de ter em consideração se esta levou a uma diminuição de anfíbios na estrada comparativamente ao setor de controlo para cada tratamento e não comparando o mesmo setor para tratamentos diferentes.



Figura 9- vegetação que ultrapassa o limite superior da barreira permanente no fim da Primavera.

As diferenças de eficácia podem ser explicadas por três situações. A primeira é uma alteração na composição de espécies. Para além dos dois picos sazonais de anfíbios nas estradas (Garriga et al., 2017), existem também variações na composição de espécies ao longo do ano (Coleman et al., 2008; Ciolan et al., 2017). Espécies com maior capacidade de trepar (e com aderência do ventre ao substrato), como *Triturus pygmaeus* (Schmidt & Zumbach, 2008; Cordeiro, 2019), ou espécies com discos adesivos, neste caso espécies do género *Hyla* (Smith et al., 2006), poderão com alguma facilidade ultrapassar a barreira (Dodd et al., 2004). Assim, uma maior presença ou maior atividade destas espécies na Primavera e Verão poderão reduzir a eficácia estatística das barreiras. Uma segunda causa que pode explicar a redução da eficácia das barreiras é a maior presença de vegetação junto às barreiras, em particular na Primavera. Em contexto mediterrânico, a Primavera é a estação do ano com maior crescimento de vegetação, pelo que iremos encontrar plantas maiores no fim desta época do ano (Ramos et al., 2015) (Figura 9), e tendo em conta o referido anteriormente, de que a presença de vegetação facilita a subida da barreira por parte dos anfíbios (Hamer et al., 2015; van der Ree et al., 2015b), esta estação do ano poderá contribuir para a diminuição da eficácia das barreiras no período de Primavera e Verão. Apesar de no final da Primavera e início de Verão se realizar o corte da vegetação para combater incêndios, o efeito desse corte pode estar mascarado pelo número reduzido de saídas realizadas no Verão (n=1). Por fim, a última explicação assenta na eventual alteração da direção dos movimentos dos anfíbios. Por serem unilaterais as barreiras estudadas, existe a possibilidade de que uma alteração dos padrões de movimentos com as estações do ano justifique a presente redução de eficácia. Pode existir uma associação entre o Outono/Inverno com a direção F, o que significaria que uma parte dos anfíbios ficariam retidos na barreira, e uma alteração dos movimentos de anfíbios para a direção oposta, por exemplo, provocada por alterações ambientais (Russell et al., 2005; Hamer et al., 2015), levaria a uma maior quantidade de anfíbios encontrados

na estrada. No entanto, no caso deste estudo, a associação entre o tratamento (presença da barreira no Outono/Inverno ou Primavera/Verão) e a direção dos anfíbios não é significativa, o que leva a crer não existir alteração dos padrões de movimentações entre os dois períodos. De referir ainda que as explicações acima mencionadas podem atuar em conjunto na alteração da eficácia das barreiras. À semelhança do que acontece com os diferentes designs de barreiras, não existe muita literatura que avalie o impacto da estação do ano na eficácia das mesmas, muitos menos de barreiras unilaterais.

Neste estudo os dados recolhidos quando a barreira estava ausente apenas foram relativos ao período de Outono e Inverno. Assim, é necessária alguma precaução na avaliação da eficácia das barreiras no período de Primavera e Verão, uma vez que não existe um verdadeiro controlo com o qual comparar este período.

Setores adjacentes à barreira permanente

Apenas o modelo que englobava o setor P_2 apresentou interação significativa entre o setor e o tratamento (dados suplementares tabela II), no entanto, não foram encontradas diferenças entre o setor de controlo e o setor P_2 para os vários tratamentos, mas sim diferenças entre tratamentos para o setor P_2 (Figura 4). Da mesma forma foram encontradas diferenças entre tratamentos para o setor de controlo (Figura 4). Sugerindo assim que esta barreira não provoca o aumento de anfíbios nas suas extremidades.

O efeito de fim de barreira (fence-end effect) encontra-se bem descrito e por norma está associado a um aumento da mortalidade nas zonas adjacentes às barreiras (por exemplo: Helldin & Petrovan, 2019). Dodd et al. (2004), ao analisar dados de mortalidade de anfíbios, répteis e mamíferos, obtiveram uma diminuição de mortalidade dentro da zona da barreira, e um aumento de mortalidade nos 300 m de estradas adjacentes a esta, após a construção da barreira. Os estudos realizados apenas com anfíbios apresentam resultados semelhantes, com um aumento de mortalidade logo após a barreira terminar (Helldin & Petrovan, 2019).

Mas estando este efeito tão bem descrito, porque é que não existem diferenças significativas entre o controlo e as zonas adjacentes à barreira neste estudo? Porque na maioria dos estudos as barreiras instaladas não terminam com uma passagem subterrânea (por exemplo: Dodd et al., 2004; Helldin & Petrovan, 2019), e esta variação pode estar associada à diferença de resultados. O aumento de mortalidade no fim das barreiras poderá dever-se ou as alterações das

rotas de migração ou a um encaminhamento dos anfíbios das barreiras para a estrada (Helldin & Petrovan, 2019), podendo esta última ser evitada pela instalação de passagens no final das barreiras, como neste estudo. Outras medidas para diminuir este aumento de mortalidade no fim das barreiras incluem a instalação de sistemas de detecção de animais, terminar a barreira num habitat desadequado para o animal e ainda a construir o fim da barreira de forma a que este não direcione os animais para a estrada (van der Ree et al., 2015b). No entanto, a nosso ver, apenas os sistemas de detecção de animais poderão ser uma solução caso o aumento de mortalidade se deva a uma alteração das rotas migratórias, contudo, estes apresentam baixa eficácia na detecção de anfíbios (Huijser et al., 2015). Adicionalmente, as alterações espaciotemporais das rotas migratórias podem ser desencadeadas por alterações nas componentes bióticas e abióticas dos ecossistemas (Russell et al., 2005; Hamer et al., 2015), tornando difícil de prever e controlar aumentos de mortalidade por alteração das rotas usuais.

Uma outra causa que pode levar a um aumento de anfíbios nos setores adjacentes à barreira, é o crescimento natural e flutuante da população de anfíbios. Husby (2016), demonstrou que a abundância de aves nas proximidades das estradas estava positivamente correlacionada com o número de aves encontradas nas estradas. Assim, um maior número de anfíbios na estrada nos setores adjacentes à barreira pode refletir um crescimento populacional, que é acompanhado por um aumento do número de anfíbios no setor de controlo, sem que haja diferenças significativas entre ambos, que é o que podemos visualizar na figura 4. Deste modo, assumido que as barreiras não alteram a quantidade de anfíbios que chegam aos setores adjacentes, as diferenças que ocorrem entre os dois tratamentos devem-se, mais uma vez, a um maior pico de anfíbios no Outono (Garriga et al., 2017), entre Pres1 e Pres2, e às flutuações populacionais naturais dos anfíbios (Marsh, 2001; Green, 2005), entre Aus e Pres1.

Setores adjacentes à barreira de lona

De forma semelhante aos setores adjacentes à barreira permanente, apenas um dos modelos foi significativo para a interação entre setor e tratamento, neste caso o modelo que continha o setor L_1 (dados suplementares na Tabela III). E mais uma vez, também aqui não foram encontradas diferenças entre o setor de controlo e o setor L_1 após a implementação da barreira (Figura 6), demonstrando que a presença da barreira não contribui nem para o aumento, nem

diminuição da quantidade de anfíbios nos setores adjacentes às barreiras quando comparado com a situação controlo.



Figura 10 À esquerda no Setor L_1 é evidente a presença de muros com mais de 2 metros dos dois lados da estrada. À direita podemos ver espaço entre o muro do setor L_1 e a barreira de lona. A seta a vermelho representa a localização da barreira temporária.

Ao observar a Figura 6, vemos que há uma diferença na quantidade de anfíbios amostrados no setor de controlo e no setor L_1, quando a barreira estava ausente. A maioria do setor L_1 é composta por muros com mais de 2 m de altura e uma pequena parte sem muro do lado da barreira, junto a esta (Figura 10). Assim, muitos dos anfíbios que entram neste setor ficam encurralados, criando um efeito armadilha. O mesmo efeito ocorre nas zonas entre barreiras as bilaterais. A rutura, a passagem da barreira ou entrada no fim da barreira que permite o acesso dos animais às estradas, pode levar a que estes fiquem aprisionados entre a barreira, sendo que existem métodos que permitem que estes animais saiam destas zonas (Schmidt & Zumbach, 2008; van der Ree et al., 2015b). Apesar de existirem algumas passagens para água nos muros e de algumas espécies terem a capacidade de os trepar (género *Hyla* e *Triturus pygmaeus*), a maioria dos anfíbios encontrados neste setor de Verão advêm de entradas em diagonal à estrada. As entradas em diagonal nas zonas de fim das barreiras contribuem para um aumento da mortalidade dentro dos setores das barreiras (Helldin & Petrovan, 2019), e não existe nenhuma razão pelo qual o mesmo processo não se possa aplicar a este caso, em que na ausência de barreira, o muro funciona como barreira.

A entrada de anfíbios com outras direções que não as perpendiculares em relação à estrada, faz com que indivíduos que entrem na estrada no setor da barreira de lona, antes da implementação da mesma, se movam na diagonal até ao setor L_1. Assim, a instalação da barreira de lona reduziu o número de anfíbios em L_1, existindo duas razões aparentes para tal acontecimento: o encurtamento do espaço de entrada e/ou a alteração do ângulo de entrada na

estrada. Estas duas razões explicam a diminuição do número de anfíbios no setor L_1 entre a ausência da barreira de lona e a presença desta (quer em Pres1, quer em Pres2).

Semelhante ao que acontece para os setores adjacentes à barreira permanente, também existe um número diferente de anfíbios no setor L_1 conforme a época de amostragem, após a implementação da barreira. Uma vez mais, esta alteração reflete os padrões naturais deste grupo com um número maior de anfíbios no Outono e Inverno (Garriga et al., 2017). Contudo, contrariando o observado nos setores adjacentes à barreira permanente, não ocorreu diferenças no setor de controlo entre os mesmos períodos (Pres1 e Pres2). A barreira permanente foi implementada em março de 2018 e a barreira de lona foi implementada a meados de Dezembro do mesmo ano. Deste modo, os dados da barreira permanente de Outono de 2018 enquadram-se no tratamento Pres1, enquanto que os dados referentes à barreira de lona se enquadram no tratamento Aus. Tendo sido o ano de 2018 o ano com maior número de anfíbios, isto pode explicar as diferenças encontradas no setor de controlo quando avaliados os modelos que incorporam os setores adjacentes à barreira permanente e a falta de diferenças significativas para os setor controlo nos modelos que incorporam os setores adjacentes à barreira de lona.

Impacto do setor na direção dos anfíbios

No que diz respeito aos setores, existe uma clara relação espacial entre a direção dos anfíbios e o setor em que se encontram. Os primeiros 3 setores (L_1, lona e L_2) demonstram uma associação positiva com a direção O, enquanto o setor de controlo apresenta uma forte associação positiva com a direção D e uma associação negativa forte com a direção F (figura 7). Por outro lado, os últimos 3 setores (P_1, Permanente e P_2) apresentam uma associação negativa com a direção D e uma associação positiva com a direção F (figura 7).

A associação positiva da direção O com os primeiros 3 setores deve-se à presença da barreira de lona. O facto de não existirem passagens subterrâneas onde a barreira termina faz com que os anfíbios sejam encaminhados para a estrada, podendo manter ou desviar os ângulos de deslocação quer entrem nas zonas adjacentes quer invertam a sua direção para dentro do setor da estrada delimitado pela barreira (Helldin & Petrovan, 2019). Em qualquer umas das situações, dificilmente se obteriam ângulos de deslocação (quase) perpendiculares à estrada que permitissem classificar como F. Portanto, a associação entre estes setores e a direção O ilustra os dois pontos acima referidos: o setor de barreira pôde mostrar mais anfíbios registados devido à

entrada em diagonal dos animais neste setor; já o aumento de anfíbios no setor L_1 pode dever-se ao encaminhamento, por parte da barreira de lona. Adicionalmente, no setor L_1 a presença de muros dos dois lados da estrada explica a associação negativa com as direções D e F.

A associação positiva entre os 3 últimos setores e a direção F demonstra duas situações diferentes. A primeira é que, apesar de eficaz, a barreira permanente continua a permitir a passagem de anfíbios do lado em que se encontra instalada. A falta de manutenção, no que respeita à remoção da vegetação, poderá ser parte do problema. van der Ree et al. (2015b), referem que a falta de manutenção das barreiras pode permitir o acesso à estrada por parte de anfíbios, répteis e pequenos mamíferos. Então é necessária uma manutenção regular para que a sua eficácia não seja comprometida (van der Ree et al., 2015b). No entanto, apesar de alguns anfíbios conseguirem ultrapassar a barreira, esta não deixa de ser eficaz, o que significa que pelo menos uma parte significativa dos anfíbios foi impedida de chegar à estrada. Em segundo lugar, a associação positiva entre os 3 últimos setores e a direção F, pode dever-se a características da paisagem. A ribeira localizada na área de estudo, acompanha a estrada do lado contrário às barreiras nos primeiros 3 setores e na maioria do setor de controlo, e no restante percurso acompanha a estrada do lado das barreiras. Esta localização da linha de água pode explicar as relações positivas encontradas entre a direção D e o setor de controlo e a direção F e os 3 últimos setores. A proximidade a corpos de água influencia a quantidade de anfíbios mortos nas estradas (Glista et al., 2007; Carvalho & Mira, 2011), e tendo em conta que as espécies da área de estudo podem apresentar reprodução tanto em sistemas lóticos, como lênticos (dados suplementares de Trochet et al., 2014), a presença da ribeira pode explicar estes padrões de movimentação. Mais ainda, alguns anfíbios poderão sofrer migrações acidentais devido às correntes da ribeira, acabando por sair em zonas mais a jusante (Thompson & Russell, 2005). Este padrão geográfico associado à ribeira não é evidente nos primeiros 3 setores devido à presença de muros e valas no lado em que se encontra a ribeira.

Influência da estação do ano na direção dos anfíbios

Apesar da associação estatística entre estações do ano e direção ser significativa, não há uma associação clara entre o Outono e Primavera (períodos migratórios) com uma direção específica (Figura 8). Apenas existe uma associação positiva bastante forte entre o Verão e a direção O (Figura 8).

O Verão não é o período de migração de anfíbios por excelência na região mediterrânica. A direção O poderá estar ligada a direções pouco definidas, correspondendo a movimentos dentro da área vital para alimentação e termorregulação (Semlitsch, 2008). Por serem mais aleatórios não podem ser considerados movimentos migratórios (Semlitsch, 2008). Assim, estes movimentos veranis são movimentos dentro das áreas vitais, e não movimentos migratórios, caracterizados por movimentos de distâncias mais curtas e que podem ocorrer diariamente (Sinsch, 2014). Estes movimentos dentro das áreas vitais têm tendência a ser maiores quando existe maior densidade de indivíduos da mesma espécie (Sinsch, 2014).

A falta de associação entre as épocas de reprodução (Primavera e Outono) e uma direção em específico, poderá dever-se ao facto dos movimentos migratórios serem movimentos bidirecionais (Semlitsch, 2008). No início da época de reprodução, os anfíbios irão dirigir-se para a massa de água onde se reproduzem, e no fim da mesma, irão deslocar-se na direção oposta (Semlitsch, 2008). Quando estas rotas são atravessadas por estradas, teremos indivíduos no início da época de reprodução a dirigirem-se num sentido e no final da época de reprodução a dirigirem-se no sentido oposto, fazendo com que ao analisar a influência das estações não exista nenhuma associação com uma época reprodutiva em particular.

Barreiras uni- VS bilaterais

Da sua meta-análise, Rytwinski et al. (2016) concluem que as medidas mitigadoras que avaliaram têm uma eficácia de 40% e que as barreiras, com ou sem passagens associadas, tinham uma eficácia de 54%; contudo não referem se as barreiras avaliadas eram uni ou bilaterais. Neste nosso estudo, a barreira uniliteral de lona esteve associada a um aumento do número de anfíbios na estrada no Outono e Inverno (39,87%) e a uma redução 36,05% no número de anfíbios na Primavera e Verão, ambas as situações face ao setor controlo. Por outro lado, a presença da barreira permanente unilateral levou a uma diminuição dos anfíbios que acederam à estrada quer no Outono e Inverno, quer na Primavera e Verão (89,84% e 72,83%, respetivamente).

Na maior parte dos estudos realizados, não são utilizadas barreiras unilaterais e em alguns casos nem a descrição das barreiras utilizadas é muito explícita. Jochimsen et al. (2004), sintetizam a eficácia da utilização de barreiras para a herpetofauna em vários estudos, contudo, apenas dois desses estudos quantificam o impacto da barreira, e desses dois apenas um descreve de modo

geral a barreira. Dos dois estudos acima mencionados ocorreu uma redução de 89% na mortalidade de tartarugas do deserto e 90% na mortalidade anfíbios.

Nos estudos em que as barreiras se encontram bem descritas estas são por norma bilaterais, tendo um carácter permanente ou temporário. A utilização de barreiras permanentes bilaterais na Flórida, resultou numa redução de 65% em toda a herpetofauna e de 93,5% quando retirados os dados relativos às relas (Dodd *et al.*, 2004), mostrando mais uma vez a capacidade de trepar associada a este grupo. Já noutro estudo realizado na Suécia, também com barreiras bilaterais permanentes, verificou-se uma redução entre 85% a 100%, consoante a estrada onde a barreira foi implementada (Helldin & Petrovan, 2019). As barreiras bilaterais temporárias (ou de lona) demonstraram uma eficácia mais reduzida para anfíbios, cerca de 40% no caso de Cunnington *et al.* (2014).

A utilização de barreiras unilaterais, também denominadas barreiras parciais (“partial-fencing”) (Markle *et al.*, 2017), não só permitem um aumento das populações afetadas pela estrada, como aumentam a diversidade genética (Ascensão *et al.*, 2013). Ademais neste estudo. Foram encontradas diferenças significativas após a instalação da barreira, entre o setor de barreira perante e o setor de controlo. Devido a constrangimentos fisiológicos (facilidade de dessecar), os anfíbios não conseguem deslocar-se a distâncias tão grandes como, por exemplo, os répteis (Russell *et al.*, 2005). Assim, enquanto os répteis são capazes de percorrer barreiras com dimensões superiores a 200 m e entrar na estrada no fim da barreira, a maioria dos anfíbios não têm essa capacidade (Kovar *et al.*, 2009). Por último, o comprimento da barreira permanente (800 m) e a presença de passagens subterrâneas no fim desta poderão ser os fatores que contribuem para a melhor eficácia da barreira permanente unilateral neste estudo, comparativamente ao estudo de Markle *et al.* (2017).

Entretanto para realizar uma comparação precisa entre dois ou mais estudo seria necessário que sejam realizados com métodos semelhantes, utilizando espécies semelhantes e em áreas geograficamente próximas, idealmente na mesma estrada, que não é o caso para nenhum dos estudos acima referidos. Mas Cordeiro (2019) realizou a sua dissertação de mestrado na estrada EM529, que fica a cerca 30 minutos da estrada deste estudo e também avaliou a eficácia de barreira mitigadoras, sendo no seu caso bilaterais. Cordeiro (2019) contabilizou apenas 4 indivíduos na zona entre as barreiras e 290 indivíduos nas barreiras, assim apenas 1,36% dos indivíduos observados chegaram à estrada, perfazendo uma eficácia de 98,64%. Este resultado é cerca de 10% superior ao resultado da barreira permanente deste estudo, sendo que isto se pode

dever aos indivíduos provenientes do lado que não tem a barreira ou ainda a diferenças metodológicas, como a não contabilização dos indivíduos que foram impedidos de chegar à estrada pela barreira.

Aspetos a melhorar

Se existem vários métodos que permitem avaliar a eficácia das medidas mitigadoras, dependendo do propósito para que estas foram construídas (van der Grift et al., 2015), então todos eles apresentam pontos positivos e negativos (Smith & van der Ree, 2015). O método dos transetos é frequentemente escolhido em ecologia das estradas, seja realizado a pé ou de carro (Smith & van der Ree, 2015). Ora elegeram-se o transeto de carro (= cruzeiro rodoviário), de modo a manter uma uniformidade metodológica entre os dados recolhidos neste estudo e aqueles provenientes do LIFE LINESs. O principal problema relacionado com o cruzeiro rodoviário de carro é uma menor detetabilidade inversamente proporcional à maior velocidade do carro (Smith & van der Ree, 2015). Por isso, para aumentar a detetabilidade reduzimos a velocidade do veículo aos 10 km/h, bastante mais baixa quando comparada a outros estudos (Mazerolle, 2004; Mazerolle et al., 2005; Carvalho & Mira, 2011; Glista et al., 2007; Sillero, 2008; Martínez-Freiría & Brito, 2012; Matos et al., 2012; Garriga et al., 2017; Canal et al., 2018).

Qualquer que seja o método utilizado irão sempre existir enviesamentos relativamente à quantidade total de anfíbios observados, especialmente dos anfíbios mortos (Guinard et al., 2015). Existem três pontos a ter em consideração para calcular o enviesamento dos dados de anfíbios mortos: a probabilidade de detetar a carcaça, a probabilidade de surgir uma nova carcaça entre duas contagens sucessivas e a probabilidade de persistência da carcaça (Guinard et al., 2015). Assim sendo, os anfíbios devido à sua reduzida dimensão apresentam uma reduzida detetabilidade e um tempo de persistência da carcaça reduzido (Santos et al., 2011, 2016). Para minimizar o número de anfíbios subestimado deverão seguir-se as recomendações de Guinard et al. (2015): realização de sessões de amostragem de dois dias em que se realizem pelo menos quatro contagens e no caso da amostragem ser realizada de carro, deverão ser realizados transetos a pé para corrigir a detetabilidade.

Durante a análise estatística criou-se um modelo GLM para verificar se a interação entre o setor e tratamento era significativa. Todavia esta análise não tem em consideração os fatores aleatórios que podem estar na base das diferenças obtidas. Estes fatores podem ser, por exemplo,

a utilização de diferentes observadores e diferentes velocidades entre os nossos dados e os dados recolhidos pelo LIFE LINES. Mais ainda, os dados para cada setor são resultado de amostras repetidas. Para ter em conta a influência dos diversos observadores e diferentes velocidades e as amostras repetidas deverá utilizar-se um modelo GLMM (“generalized linear mixed model” (Markle *et al.*, 2017).

As medidas mitigadoras dos impactos das estradas para serem eficazes deverão não só reduzir a mortalidade das mesmas, como reduzir o efeito barreira a elas associadas (Forman et al., 2003). Dos critérios definidos em Forman et al. (2003), apenas a redução do número de anfíbios que acedem à estrada foi avaliado neste estudo. Os restantes critérios que estão relacionados com a diminuição do efeito de barreira, devem ser avaliados através da monitorização das passagens, bem como através de outros métodos, que em conjunto permitam avaliar a conectividade, fluxo genético, dispersão e recolonização, requerimentos biológicos e processo ecológicos e metapopulacionais (Forman et al., 2003). Assim, a avaliação de qualquer tipo de medida mitigadora deverá ter uma abordagem holística e avaliar os critérios acima referidos, para que seja possível comparar diferentes medidas mitigadoras utilizando os mesmos critérios.

Por falta de dados relativos ao período de Primavera e Verão, antes da instalação das barreiras, os dados deste período foram comparados ao período em que a barreira esteve ausente no Inverno e Outono. Deste modo, não temos um controlo verdadeiro com o qual comparar os dados de Primavera e Verão. É então necessário recolher dados de todos os períodos antes da instalação das barreiras, para obter dados mais fidedignos.

Conclusão

De um modo geral, podemos concluir que a barreira unilateral de cimento é eficaz em reduzir a quantidade de anfíbios que chegam à estrada, apesar de apresentar eficácia inferior em relação às barreiras bilaterais. Por outro lado, a barreira unilateral de lona não foi eficaz, sendo que não é possível individualizar as características que contribuíram para esta falta de eficácia. Assim, a implementação de barreiras unilaterais, em particular barreiras de cimento, poderá ser utilizada como medida mitigadora quando existem constrangimentos financeiros, logísticos e/ou espaciais que não permitam a construção de barreiras bilaterais. No entanto, independentemente

da barreira construída, a manutenção da mesma deverá ser feita de forma regular, para que não exista uma redução da sua eficácia, principalmente no que diz respeito à vegetação.

Contrariamente ao evidenciado noutros estudos, não foi encontrada nenhuma evidência de que as barreiras provocassem um aumento do número de anfíbios nos setores adjacentes às mesmas, mais ainda, nalguns setores a presença da barreira levou a uma diminuição da quantidade de anfíbios nos setores adjacentes. Isto poderá dever-se, em parte, à falta da barreira de um dos lados da estrada, o que permite a manutenção de algumas rotas migratórias e reduz o número de anfíbios encaminhados para a estrada pelas barreiras. Adicionalmente, a redução do espaço de entrada para estrada e a presença de passagens subterrâneas na extremidade das barreiras poderão ser fatores que contribuem para não existir um aumento de anfíbios na estrada nestes setores.

Da análise dos padrões de direção é possível retirar duas conclusões principais. A primeira é que na realidade existem anfíbios que conseguem ultrapassar as barreiras, que mais uma vez pode estar associado à falta de manutenção das barreiras no que respeita à vegetação. O segundo aspeto é que os padrões de movimentos dos anfíbios variam espacialmente, assim sendo, antes da implementação de barreiras unilaterais deverá realizar-se uma análise da direção dos anfíbios para maximizar a eficácia das mesmas.

Bibliografia

- Aresco, M., 2005. Mitigation measures to reduce highway mortality of turtles and other herpetofauna at a North Florida Lake. *Journal of Wildlife Management* 69, 549–560. [https://doi.org/10.2193/0022-541X\(2005\)069\[0549:MMTRHM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2193/0022-541X(2005)069[0549:MMTRHM]2.0.CO;2)
- Arnfield, H., Grant, R., Monk, C., Uller, T., 2012. Factors influencing the timing of spring migration in common toads (*Bufo bufo*): Timing of spring migration in toads. *Journal of Zoology* 288, 112–118. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2012.00933.x>
- Ascensão, F., Clevenger, A., Santos-Reis, M., Urbano, P., Jackson, N., 2013. Wildlife–vehicle collision mitigation: Is partial fencing the answer? An agent-based model approach. *Ecological Modelling* 257, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2013.02.026>
- Beebee, T., 2013. Effects of Road Mortality and Mitigation Measures on Amphibian Populations: Amphibians and Roads. *Conservation Biology* 27, 657–668. <https://doi.org/10.1111/cobi.12063>
- Canal, D., Camacho, C., Martín, B., Lucas, M., Ferrer, M., 2018. Magnitude, composition and spatiotemporal patterns of vertebrate roadkill at regional scales: a study in southern Spain. *Animal Biodiversity and Conservation* 41, 281–300. <https://doi.org/10.32800/abc.2018.41.0281>
- Carvalho, F., Mira, A., 2011. Comparing annual vertebrate road kills over two time periods, 9 years apart: a case study in Mediterranean farmland. *European Journal of Wildlife Research* 57, 157–174. <https://doi.org/10.1007/s10344-010-0410-0>
- Chee, Y., 2015. Principles underpinning biodiversity offsets and guidance on their use, in: van der Ree, R., Smith, D., Grilo, C. (Eds.), *Handbook of Road Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, UK.
- Ciolan, E., Cicort-Lucaciu, A.-S., Sas-Kovács, I., Ferenczi, S., Covaciu-Marcov, S.-D., 2017. Wooded area, forest road-killed animals: Intensity and seasonal differences of road mortality on a small, newly upgraded road in western Romania. *Transportation Research Part D: Transport and Environment* 55, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.trd.2017.06.014>
- Coffin, A., 2007. From roadkill to road ecology: A review of the ecological effects of roads. *Journal of Transport Geography* 15, 396–406. <https://doi.org/10.1016/j.jtrangeo.2006.11.006>
- Coleman, J., Ford, N., Herriman, K., 2008. A Road Survey of Amphibians and Reptiles in a Bottomland Hardwood Forest. *Southeastern Naturalist* 7, 339–348. [https://doi.org/10.1656/1528-7092\(2008\)7\[339:ARSOAA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1656/1528-7092(2008)7[339:ARSOAA]2.0.CO;2)
- Colino-Rabanal, V., Lizana, M., 2012. Herpetofauna and roads: a review. *Basic and Applied Herpetology* 26, 5–31. <https://doi.org/10.11160/bah.12008>
- Collins, J., Storfer, A., 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions* 9, 89–98.
- Cordeiro, J., 2019. Efeito mitigador das barreiras anti-atropelamento de anfíbios na estrada municipal EM529. (Dissertação de mestrado). Universidade de Évora, Évora.
- Cunnington, G., Garrah, E., Eberhardt, E., Fahrig, L., 2014. Culverts alone do not reduce road mortality in anurans. *Écoscience* 21, 69–78. <https://doi.org/10.2980/21-1-3673>
- Díaz-Rodríguez, J., Gehara, M., Márquez, R., Vences, M., Gonçalves, H., Sequeira, F., Martínez-Freiría, I., Tejedo, M., 2017. Integration of molecular, bioacoustical and morphological data reveals two new cryptic species of *Pelodytes* (Anura, Pelodytidae) from the Iberian Peninsula. *Zootaxa* 4243, 1–41. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4243.1.1>
- Díaz-Rodríguez, J., Gonçalves, H., Sequeira, F., Sousa-Neves, T., Tejedo, M., Ferrand, N., Martínez-Solano, I., 2014. Molecular evidence for cryptic candidate species in Iberian *Pelodytes* (Anura, Pelodytidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 83, 224–241. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.12.007>
- Dodd, C., Barichivich, W., Smith, L., 2004. Effectiveness of a barrier wall and culverts in reducing wildlife mortality on a heavily traveled highway in Florida. *Biological Conservation* 118, 619–631. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2003.10.011>
- Eurostat, 2020. Length of other roads by category of roads. URL <https://ec.europa.eu/eurostat/web/transport/data/database> (accessed 4.23.20).

- Forman, R., Sperling, D., Bissonette, J., Clevenger, A., Cutshall, C., Dale, V., Fahrig, L., France, R., Goldman, C., Heanue, K., Jones, J., Swanson, F., Turrentine, T., Winter, T., 2003. Road ecology: Science and Solutions.
- Garriga, N., Franch, M., Santos, X., Montori, A., Llorente, G., 2017. Seasonal variation in vertebrate traffic casualties and its implications for mitigation measures. *Landscape and Urban Planning* 157, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2016.05.029>
- Glista, D., DeVault, T., DeWoody, J., 2009. A review of mitigation measures for reducing wildlife mortality on roadways. *Landscape and Urban Planning* 91, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2008.11.001>
- Glista, D., DeVault, T., Dewoody, J., 2007. Vertebrate road mortality predominantly impacts amphibians. *Herpetological Conservation and Biology* 3, 77–87.
- Goosem, M., 2007. Fragmentation impacts caused by roads through rainforests. *Current Science* 93, 1587–1595.
- Grace, M., Noss, R., 2018. Evidence for selective avoidance of traffic noise by anuran amphibians. *Animal Conservation* 21, 343–351. <https://doi.org/10.1111/acv.12400>
- Grant, R., Chadwick, E., Halliday, T., 2009. The lunar cycle: a cue for amphibian reproductive phenology? *Animal Behaviour* 78, 349–357. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.05.007>
- Grant, R., Halliday, T., Chadwick, E., 2013. Amphibians’ response to the lunar synodic cycle—a review of current knowledge, recommendations, and implications for conservation. *Behavioral Ecology* 24, 53–62. <https://doi.org/10.1093/beheco/ars135>
- Green, D., 2005. Biology of Amphibian Declines, in: Lannoo, M. (Ed.), *Amphibian Declines: The Conservation Status of United States Species*. University of California Press, Berkeley, California, EUA, pp. 28–33. <https://doi.org/10.1525/california/9780520235922.003.0007>
- Guinard, É., Prodon, R., Barbraud, C., 2015. Case study: A robust method to obtain a defensible data on wildlife mortality, in: van der Ree, R., Smith, D., Grilo, C. (Eds.), *Handbook of Road Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, UK.
- Hamer, A., Langton, T., Lesbarrères, D., 2015. Making a safe leap forward: mitigating road impacts on amphibians, in: van der Ree, R., Smith, D., Grilo, C. (Eds.), *Handbook of Road Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, UK.
- Helldin, J., Petrovan, S., 2019. Effectiveness of small road tunnels and fences in reducing amphibian roadkill and barrier effects at retrofitted roads in Sweden. *PeerJ* 7, e7518. <https://doi.org/10.7717/peerj.7518>
- Hocking, D., Babbitt, K., 2014. Amphibian Contributions to Ecosystem Services. *Herpetological Conservation and Biology* 9, 18.
- Huijser, M., Mosler-Berger, C., Olsson, M., Strein, M., 2015. Wildlife warning signs and detection systems aimed at reducing wildlife-vehicle collisions, in: van der Ree, R., Smith, D., Grilo, C. (Eds.), *Handbook of Road Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, UK.
- Husby, M., 2016. Factors affecting road mortality in birds. *Ornis Fennica* 93, 212–224.
- International Organization of Motor Vehicle Manufacturers, s/data. PC World Vehicles in Use.
- IPMA, n.d. O Clima, Normas climatológicas – Évora [WWW Document]. IPMA. URL <http://www.ipma.pt/pt/oclima/normas.clima/1971-2000/#557> (accessed 11.2.20).
- Jarvis, L., Grant, R., SenGupta, A., 2021. Lunar phase as a cue for migrations to two species of explosive breeding amphibians—implications for conservation. *European Journal of Wildlife Research* 67, 11. <https://doi.org/10.1007/s10344-020-01453-3>
- Jochimsen, D., Peterson, C., Andrews, K., Gibbons, J., 2004. Literature Review of the Effects of Roads on Amphibians and Reptiles. Idaho Fish and Game Department USDA Forest Service.
- Kovar, R., Brabec, M., Bocek, R., Vita, R., 2009. Spring migration distances of some Central European amphibian species. *Amphibia-Reptilia* 30, 367–378. <https://doi.org/10.1163/156853809788795236>
- Lesbarrères, D., Lodé, T., Merilä, J., 2004. What type of amphibian tunnel could reduce road kills? *Oryx* 38, 220–223. <https://doi.org/10.1017/S0030605304000389>
- Loureiro, A., de Almeida, N.F., Carretero, M.A., Paulo, O.S. (Eds.), 2008. *Atlas dos Anfíbios e Répteis de Portugal*. Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade, Lisboa.
- Maravalhas, E., Soares, A., 2018. *Anfíbios e Répteis de Portugal*, 1ª. ed. Booky publisher.

- Markle, C., Gillingwater, S., Levick, R., Chow-Fraser, P., 2017. The true cost of partial fencing: Evaluating strategies to reduce reptile road mortality: Mitigating Reptile Road Mortality. *Wildlife Society Bulletin* 41, 342–350. <https://doi.org/10.1002/wsb.767>
- Marsh, D., 2001. Fluctuations in amphibian populations: a meta-analysis. *Biological Conservation* 101, 327–335. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(01\)00076-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(01)00076-3)
- Marsh, D., Page, R., Hanlon, T., Corritone, R., Little, E., Seifert, D., Cabe, P., 2008. Effects of roads on patterns of genetic differentiation in red-backed salamanders, *Plethodon cinereus*. *Conservation Genetics* 9, 603–613. <https://doi.org/10.1007/s10592-007-9377-0>
- Martínez-Freiría, F., Brito, J., 2012a. Quantification of road mortality for amphibians and reptiles in Hoces del Alto Ebro y Rudrón Natural Park in 2005. *Basic and Applied Herpetology* 26, 33–42. <https://doi.org/10.11160/bah.11014>
- Martínez-Freiría, F., Brito, J., 2012b. Quantification of road mortality for amphibians and reptiles in Hoces del Alto Ebro y Rudrón Natural Park in 2005. *Basic and Applied Herpetology* 26, 33–42. <https://doi.org/10.11160/bah.11014>
- Matos, C., 2017. Movement of pond-breeding amphibians in fragmented landscapes: Responses of Great Crested Newt (*Triturus cristatus*) to road mitigation (Phd thesis). The University of Hull.
- Matos, C., Sillero, N., Argaña, E., 2012. Spatial analysis of amphibian road mortality levels in northern Portugal country roads. *Amphibia-Reptilia* 33, 469–483. <https://doi.org/10.1163/15685381-00002850>
- Mayer, M., Lyons, J., Shine, R., Natusch, D., 2018. Air-pressure waves generated by vehicles do not imperil road-crossing amphibians. *Salamandra* 54, 80–82.
- Mazerolle, M., 2004. Amphibian road mortality in response to nightly variations in traffic intensity. *Herpetologica* 60, 45–53.
- Mazerolle, M., Huot, M., Gravel, M., 2005. Behavior of amphibians on the road in response to car traffic. *Herpetologica* 61, 380–388. <https://doi.org/10.1655/04-79.1>
- Mestre, F., Lopes, H., Pinto, T., Sousa, L., Mira, A., Santos, S., 2019. Bad moon rising? The influence of the lunar cycle on amphibian roadkills. *European Journal of Wildlife Research* 65, 12. <https://doi.org/10.1007/s10344-019-1285-3>
- Millennium Ecosystem Assessment (Ed.), 2005. *Ecosystems and human well-being: health synthesis, Millennium ecosystem assessment*. Island Press, Washington, D.C., USA.
- OECD, 2015. *Environment at a Glance 2015: OECD Indicators, Environment at a Glance*. OECD Publishing, Paris, France. <https://doi.org/10.1787/9789264235199-en>
- Orłowski, G., 2007. Spatial distribution and seasonal pattern in road mortality of the common toad *Bufo bufo* in an agricultural landscape of south-western Poland. *Amphibia-Reptilia* 28, 25–31. <https://doi.org/10.1163/156853807779799045>
- Pittman, S.E., Osbourn, M.S., Semlitsch, R.D., 2014. Movement ecology of amphibians: A missing component for understanding population declines. *Biological Conservation* 169, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2013.10.020>
- Puky, M., 2005. Amphibian road kills: a global perspective, in: Irwin, C., Garrett, P., McDermott, K. (Eds.), *Proceedings of the 2005 International Conference on Ecology and Transportation*. Center for Transportation and the Environment, North Carolina State University, Raleigh, North Caroline, USA, pp. 325–338.
- Ramos, A., Pereira, M., Soares, A., Rosário, L., Matos, P., Nunes, A., Branquinho, C., Pinho, P., 2015. Seasonal patterns of Mediterranean evergreen woodlands (Montado) are explained by long-term precipitation. *Agricultural and Forest Meteorology* 202, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2014.11.021>
- Rittenhouse, T.A.G., Semlitsch, R.D., 2007. Distribution of amphibians in terrestrial habitat surrounding wetlands. *Wetlands* 27, 153–161. [https://doi.org/10.1672/0277-5212\(2007\)27\[153:DOAITH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1672/0277-5212(2007)27[153:DOAITH]2.0.CO;2)
- Rivas-Martínez, S., 2008. *Global bioclimatics (Clasificación Bioclimática de la Tierra)* [WWW Document]. URL http://www.globalbioclimatics.org/book/bioc/bioc_2008_01.pdf (accessed 11.2.20).

- Russell, A., Bauer, A., Johnson, M., 2005. Migration in amphibians and reptiles: An overview of patterns and orientation mechanisms in relation to life history strategies, in: Elewa, A. (Ed.), *Migration of Organisms: Climate, Geography, Ecology*. Springer, Berlin ; New York.
- Rytwinski, T., Fahrig, L., 2015. The impacts of roads and traffic on terrestrial animal populations, in: van der Ree, R., Smith, D., Grilo, C. (Eds.), *Handbook of Road Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, UK.
- Rytwinski, T., Soanes, K., Jaeger, J., Fahrig, L., Findlay, C., Houlahan, J., van der Ree, R., van der Grift, E., 2016. How Effective Is Road Mitigation at Reducing Road-Kill? A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 11, e0166941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166941>
- Santos, R., Santos, S., Santos-Reis, M., Picanço de Figueiredo, A., Bager, A., Aguiar, L., Ascensão, F., 2016. Carcass Persistence and Detectability: Reducing the Uncertainty Surrounding Wildlife-Vehicle Collision Surveys. *PLOS ONE* 11, e0165608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165608>
- Santos, S., Carvalho, F., Mira, A., 2011. How Long Do the Dead Survive on the Road? Carcass Persistence Probability and Implications for Road-Kill Monitoring Surveys. *PLoS ONE* 6, e25383. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025383>
- Schmidt, B., Zumbach, S., 2008. Amphibian Road Mortality and How to Prevent It: A Review, in: Mitchell, J., Brown, R., Bartolomew, B. (Eds.), *Urban Herpetology, Herpetological Conservation*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, St. Louis, Missouri, USA.
- Semlitsch, R., 2008. Differentiating Migration and Dispersal Processes for Pond-Breeding Amphibians. *Journal of Wildlife Management* 72, 260–267. <https://doi.org/10.2193/2007-082>
- Seo, C., Thorne, J., Choi, T., Kwon, H., Park, C.-H., 2015. Disentangling roadkill: the influence of landscape and season on cumulative vertebrate mortality in South Korea. *Landscape and Ecological Engineering* 11, 87–99. <https://doi.org/10.1007/s11355-013-0239-2>
- Sequeira, F., Bessa-Silva, A., Tarroso, P., Sousa-Neves, T., Vallinoto, M., Gonçalves, H., Martínez-Solano, I., 2020. Discordant patterns of introgression across a narrow hybrid zone between two cryptic lineages of an Iberian endemic newt. *Journal of Evolutionary Biology* 33, 202–216. <https://doi.org/10.1111/jeb.13562>
- Sillero, N., 2008. Amphibian mortality levels on Spanish country roads: descriptive and spatial analysis. *Amphibia-Reptilia* 29, 337–347. <https://doi.org/10.1163/156853808785112066>
- Sinsch, U., 2014. Movement ecology of amphibians: from individual migratory behaviour to spatially structured populations in heterogeneous landscapes. *Canadian Journal of Zoology* 92, 491–502. <https://doi.org/10.1139/cjz-2013-0028>
- Sinsch, U., 1990. Migration and orientation in anuran amphibians. *Ethology Ecology & Evolution* 2, 65–79. <https://doi.org/10.1080/08927014.1990.9525494>
- Smith, D., van der Ree, R., 2015. Field methods to evaluate the impacts of roads on wildlife, in: van der Ree, R., Smith, D., Grilo, C. (Eds.), *Handbook of Road Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, UK.
- Smith, J., Barnes, W., Downie, J., Ruxton, G., 2006. Structural correlates of increased adhesive efficiency with adult size in the toe pads of hylid tree frogs. *Journal of Comparative Physiology A* 192, 1193–1204. <https://doi.org/10.1007/s00359-006-0151-4>
- Speybroeck, J., Beukema, W., Dufresnes, C., Fritz, U., Jablonski, D., Lymberakis, P., Martínez-Solano, I., Razzetti, E., Vamberger, M., Vences, M., Vörös, J., Crochet, P.-A., 2020. Species list of the European herpetofauna – 2020 update by the Taxonomic Committee of the Societas Europaea Herpetologica. *Amphibia-Reptilia* 41, 139–189. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10010>
- Stuart, S., Chanson, J.S., Cox, N., Young, B., Rodrigues, A., Fischman, D., Waller, R., 2004. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science* 306, 1783–1786. <https://doi.org/10.1126/science.1103538>
- Testud, G., Fauconnier, C., Labarraque, D., Lengagne, T., Lepetitcorps, Q., Picard, D., Miaud, C., 2020. Acoustic enrichment in wildlife passages under railways improves their use by amphibians. *Global Ecology and Conservation*. <https://doi.org/e01252>
- Thompson, M., Russell, A., 2005. Glacial Retreat and its Influence on Migration of Mitochondrial Genes in the Long-toed Salamander (*Ambystoma macrodactylum*) in Western North America, in: Elewa, A.M.T. (Ed.), *Migration of Organisms: Climate, Geography, Ecology*. Springer, Berlin ; New York.

- Trochet, A., Moulherat, S., Calvez, O., Stevens, V., Clobert, J., Schmeller, D., 2014. A database of life-history traits of European amphibians. *Biodiversity Data Journal* 2, e4123.
<https://doi.org/10.3897/BDJ.2.e4123>
- van der Grift, E., van der Ree, R., Jaeger, J., 2015. Guidelines for evaluating the effectiveness of road mitigation measures, in: van der Ree, R., Smith, D., Grilo, C. (Eds.), *Handbook of Road Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, UK.
- van der Ree, R., Gagnon, J., Smith, D., 2015b. Fencing: a valuable tool for reducing wildlife-vehicle collisions and funneling fauna to crossing structures, in: van der Ree, R., Smith, D., Grilo, C. (Eds.), *Handbook of Road Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, UK.
- van der Ree, R., Jaeger, J., Rytwinski, T., van der Grift, E., 2015c. Good science and experimentation are needed in road ecology, in: van der Ree, R., Smith, D., Grilo, C. (Eds.), *Handbook of Road Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, UK.
- van der Ree, R., Smith, D., Grilo, C., 2015a. The ecological effects of linear infrastructure and traffic: challenges and opportunities of rapid global growth, in: van der Ree, R., Smith, D., Grilo, C. (Eds.), *Handbook of Road Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, UK.
- Vitt, L., Caldwell, J., 2014. *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles*, Fourth edition. ed. Elsevier, AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, Amsterdam ; Boston.
- Woltz, H., Gibbs, J., Ducey, P., 2008. Road crossing structures for amphibians and reptiles: Informing design through behavioral analysis. *Biological Conservation* 141, 2745–2750.
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.08.010>

Dados suplementares

Tabela I- resultado da análise do GLM. Controlo refere-se ao setor sem influencia de nenhuma barreira; Permanente- Setor com a abarreira permanente; Lona- Setor com a barreira de lona; Aus- período onde a barreira estava ausente; Pres1- presença da barreira no Outono e Inverno; Pres2- presença da barreira na Primavera e Verão. O * indica os p-values significativos.

Comparação	Variável	Estimativa	Z	P-Value
Permanente versus Controlo	Setor			0,03118*
	Controlo	0		
	Permanente	1,8101	4,196	2,72E-05*
	Tratamento			8,63E-09*
	Aus	0		
	Pres1	2,8894	7,262	3,80E-13*
	Pres2	1,1578	2,604	0,00923*
	Setor-Tratamento			1,61E-06*
	Controlo-Aus	0		
	Permanente-Aus	0		
	Controlo-Pres1	0		
	Permanente-Pres1	-2,7103	-5,186	2,14E-07*
	Controlo-Pres2	0		
	Permanente-Pres2	-1,757	-2,978	0,0029*
Lona versus Controlo	Setor			0,00322*
	Controlo	0		
	Lona	-0,8971	-2,097	0,03603*
	Tratamento			2,542E-05*
	Aus	0		
	Pres1	-0,4618	-1,096	0,27293
	Pres2	-1,4701	-3,146	0,00166*
	Setor-Tratamento			0.45863
	Controlo-Aus	0		
	Lona-Aus	0		
	Controlo-Pres1	0		
	Lona-Pres1	0,3978	0,66	0,50897
	Controlo-Pres2	0		
	Lona-Pres2	-0,4712	-0,67	0,50288

Tabela II- resultado da análise do GLM. Controlo refere-se ao setor sem influencia de nenhuma barreira; P_1 e P_2- setores adjacentes a barreira permanente; Aus- período onde a barreira estava ausente; Pres1- presença da barreira no Outono e Inverno; Pres2- presença da barreira na Primavera e Verão. O * indica os p-values significativos.

Comparação	Variável	Estimativa	Z	P-Value
P_1 versus Controlo	Setor			0,0008024*
	Controlo	0		
	P_1	0,2007	0,408	6,83E-01*
	Tratamento			<2,2E-16*
	Aus	0		
	Pres1	2,8894	6,915	4,67E-12*
	Pres2	1,1578	2,481	0,0131*
	Setor-Tratamento			8,72E-02
	Controlo-Aus	0		
	P_1-Aus	0		
	Controlo-Pres1	0		
	P_1-Pres1	-0,9311	-1,594	1,11E-01
	Controlo-Pres2	0		
	P_1-Pres2	-1,5	-2,179	0,0294*
P_2 versus Controlo	Setor			0,10784
	Controlo	0		
	P_2	0,8708	1,758	0,07875
	Tratamento			7,944E-16
	Aus	0		
	Pres1	2,8894	6,532	6,49E-11*
	Pres2	1,1578	2,345	0,1903
	Setor-Tratamento			0,02424*
	Controlo-Aus	0		
	P_2-Aus	0		
	Controlo-Pres1	0		
	P_2-Pres1	-1,2793	-2,132	0,033*
	Controlo-Pres2	0		
	P_2-Pres2	-1,8336	-2,634	0,00844*

Tabela III- resultado da análise do GLM. Controlo refere-se ao setor sem influencia de nenhuma barreira; L_1 e L_2- setores adjacentes a barreira de lona; Aus- período onde a barreira estava ausente; Pres1- presença da barreira no Outono e Inverno; Pres2- presença da barreira na Primavera e Verão. O * indica os p-values significativos.

Comparação	Variável	Estimativa	Z	P-Value
L_1 versus Controlo	Setor			1,59E-08*
	Controlo	0		
	L_1	0,2007	0,408	1,56E-05*
	Tratamento			2,60E-08*
	Aus	0		
	Pres1	2,8894	6,915	3,27E-01
	Pres2	1,1578	2,481	0,00467*
	Setor-Tratamento			2,14E-02*
	Controlo-Aus	0		
	L_1-Aus	0		
	Controlo-Pres1	0		
	L_1-Pres1	-0,9311	-1,594	1,59E-01
	Controlo-Pres2	0		
	L_1-Pres2	-1,5	-2,179	0,00484*
L_2 versus Controlo	Setor			0,01938*
	Controlo	0		
	L_2	0,8708	1,758	0,07875
	Tratamento			3,67E-06*
	Aus	0		
	Pres1	2,8894	6,532	2,75E-01
	Pres2	1,1578	2,345	0,24292
	Setor-Tratamento			0,77057
	Controlo-Aus	0		
	L_2-Aus	0		
	Controlo-Pres1	0		
	L_2-Pres1	-1,2793	-2,132	0,603715
	Controlo-Pres2	0		
	L_2-Pres2		-1,8336	-2,634