

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
FACULDADE DE EDUCAÇÃO E ARTES
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Caracterização da microbiota cutânea de *Brachycephalus ephippium* e
Aplastodiscus leucopygius do Parque Natural Municipal Augusto Ruschi**

Laryssa Nolasco

São José dos Campos - SP

2016

Universidade do Vale do Paraíba
Faculdade de Educação e Artes

Curso de Ciências Biológicas
Da Faculdade de Educação e Artes

TRABALHO DE GRADUAÇÃO

Caracterização da microbiota cutânea de *Brachycephalus ephippium* e
Aplastodiscus leucopygius do Parque Natural Municipal Augusto Ruschi

Laryssa Nolasco

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristina Pacheco Soares

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Flavia Vilaça Moraes

Banca Examinadora:

Prof^a. Me. Karla A. Ruiz Lopes

Prof^a. Dr^a. Maricilia Silva Costa

Nota do Trabalho:

São José dos Campos - SP

2016

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
FACULDADE DE EDUCAÇÃO E ARTES

TRABALHO DE GRADUAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA CUTÂNEA DE *Brachycephalus ephippium* E
Aplastodiscus leucopygius DO PARQUE NATURAL MUNICIPAL AUGUSTO RUSCHI**

LARYSSA NOLASCO

Relatório do Trabalho de Graduação apresentado à Banca Avaliadora da Faculdade de Educação e Artes do Vale do Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cristina Pacheco Soares

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Flavia Villaça Morais

São José dos Campos - SP

2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus que me deu vida, a minha mãe Jucely Nolasco que me incentivou dando a força necessária para prosseguir, mesmo nos piores momentos, sem ela eu certamente não chegaria tão longe, a Marcelo Moreno sem o qual minha graduação não seria possível e a toda minha família e amigos, e a minha pequena Victória, sempre companheira, por diversas vezes me buscava junto a minha mãe quando eu chegava tarde da noite da faculdade, sinto muito sua falta.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, que se mostrou tão presente em momentos difíceis, graças ao Senhor eu nunca estive sozinha.

Agradeço a minha mãe Jucely Nolasco, que participou ativamente deste trabalho, além de me dar o suporte necessário durante todo o período de faculdade.

Agradeço minha vó Margarida Nolasco, minha madrinha Zilma de Almeida, ao amigo Marcelo Moreno e toda a minha família e amigos que se fizeram tão presentes quando mais precisei.

Agradeço aos colegas Mariana Serafim, Claudinéia Araújo, Vivian Dias, Carlos Dailton, Jaíne Ribeiro, Ana Valéria Moraes, Paloma Oliveira e toda a equipe do laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares e do laboratório de Biologia Celular e Tecidual, por me prestarem todo auxílio necessário para a realização deste trabalho.

Agradeço a Prefeitura da Cidade de São José dos Campos/SP e a Secretaria do Meio Ambiente que abriu as portas do Parque Natural Municipal Augusto Ruschi, local de realização do trabalho, e as minhas orientadoras Cristina Pacheco Soares e Flavia Villaça Moraes pela paciência e assistência que me prestaram.

Enfim, agradeço a todos que fizeram parte desta etapa em minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1. Parque Natural Municipal Augusto Ruschi	10
2.2. <i>Aplastodiscus leucopygius</i>	11
2.3. <i>Brachycephalus ephippium</i>	12
2.4. Microbiota.....	13
2.5. Microbiota anuro.....	13
2.6. Relações entre Microbiota e Sistema imune.....	14
3. OBJETIVOS GERAIS	16
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
5. METODOLOGIA	17
5.1. Local da pesquisa.....	17
5.2. Captura e identificação dos animais	17
5.3. Coleta das amostras biológicas	18
5.4. Análise microbiológica das amostras	18
5.5. Antibiograma	19
5.6. Coloração de Gram	19
6. RESULTADOS	21
6.1. Cultivo de microrganismos	21
6.2. Antibiograma	23
6.3. Coloração de Gram	25
7. DISCUSSÃO.....	27
8. CONCLUSÃO	29
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
10. ANEXO I.....	34
11. ANEXO II.....	37

RESUMO

O crescente declínio da população de anfíbios devido a doenças infecciosas tem motivado diversas pesquisas referentes a microbiologia desses animais. Em estudos recentes foram verificados que alterações na temperatura, pH, umidade, concentração de produtos químicos externos e fatores abióticos podem influenciar na microbiota de anuros que está relacionada ao sistema imune. Por esse motivo, o presente estudo teve como objetivo analisar e caracterizar a microbiota de duas espécies de anuros encontrados no Parque Natural Municipal Augusto Ruschi, Unidade de Conservação de Proteção Integral da cidade de São José do Campos no estado de São Paulo. Para isso, com a utilização de swabs estéreis, foram coletadas e analisadas, amostras biológicas da microbiota cutânea, de espécimes de *Aplastodiscus leucopygius* e *Brachycephalus ephippium*, anuros endêmicos do Brasil. Dentre os microrganismos encontrados estão fungos do gênero *Penicillium*, e bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* e enterobactérias, que se demonstraram resistentes à amoxicilina, estreptomicina, cloranfenicol e tobramicina, antibióticos utilizados no tratamento de infecções de amplo espectro.

ABSTRACT

The growing decline of the amphibian population due to infectious diseases has motivated several studies regarding the microbiology of these animals. In recent studies it was verified that changes in temperature, pH, humidity, concentration of external chemicals and abiotic factors may influence the anhydrous microbiota that is related to the immune system. For this reason, the present study aimed to analyze and characterize the microbiota of two species of anurans found in the Augusto Ruschi Municipal Natural Park, Integral Protection Conservation Unit of the city of São José do Campos in the state of São Paulo. For this, using sterile swabs, biological specimens of the cutaneous microbiota were collected and analyzed from specimens of *Aplastodiscus leucopygius* and *Brachycephalus ephippium*, anurans endemic to Brazil. Among the microorganisms found are fungi of the genus *Penicillium*, and bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* and enterobacteria, which have been shown to be resistant to amoxicillin, streptomycin, chloramphenicol and tobramycin, antibiotics used in the treatment of broad spectrum infections.

1. INTRODUÇÃO

A queda da biodiversidade tem se tornado um fator preocupante. É crescente o número de espécies extintas e estima-se que esta é umas das maiores perdas conhecidas nos últimos 100.000 anos. Nas últimas décadas, os anfíbios vem sofrendo o maior declínio dentro do grupo de vertebrados em escala global. Os anfíbios de modo geral são considerados como bioindicadores, por serem sensíveis a perturbações ambientais. As doenças infecciosas tem sido a principal causa do declínio na população de anfíbios, desta forma se faz necessário o estudo da microbiota desses animais. A microbiota compreende um conjunto de microrganismos que habitam órgãos e tecidos, geralmente em relação de homeostase. Esta comunidade microbiana auxilia na ação do sistema imune, portanto distúrbios na mesma podem causar doenças, conforme estudos realizados com animais isentos de microbiota, que demonstraram claramente a importância da mesma em seu desenvolvimento, saúde, entre outras funções com o hospedeiro. Estudos recentes revelam que o sistema imune também desempenha um papel fundamental na formação e composição da microbiota, portanto fica claro que o sistema imune têm se desenvolvido e coevoluído de maneira eficiente para controlar e coexistir com a microbiota a qual está associado. O presente estudo apresenta a caracterização da microbiota cutânea de *Brachycephalus ephippium* e *Aplastodiscus leucopygius*, espécies de anuros endêmicas de florestas de mata atlântica do Brasil, tendo como objetivo a obtenção de maiores detalhes sobre a comunidade microbiana desses animais, e conseqüentemente, a conservação das espécies.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Parque Natural Municipal Augusto Ruschi

O Parque Natural Municipal Augusto Ruschi (PNMAR) foi a primeira Unidade de Conservação de Proteção Integral da cidade de São José do Campos no estado de São Paulo. Criado em 17 de setembro de 2010 pela Lei Municipal nº 8.195, o PNMAR faz parte do APA Federal Mananciais do Rio Paraíba do Sul e possui uma área de 200 hectares de Mata Atlântica, sendo um dos principais fragmentos florestais do município, localizado na Estrada Municipal Antônio Ferreira da Silva nº 798, bairro do Costinha, zona norte de São José dos Campos/SP (PMSJC, 2016).

Segundo informações do Plano de Manejo, cerca de 90% da área total do PNMAR ocorre sobre relevo de serras alongadas, restando 10% sobre relevo de morros paralelos. A região possui clima tropical de altitudes com estações caracterizadas por chuvas intensas de verão e seca moderada no inverno. A Unidade de Conservação abriga diversas espécies de flora e fauna silvestres como Mamíferos (lobo-guará), Aves (gavião-pega-macaco) ameaçada de extinção, Répteis - serpentes (Jararaca-da-mata) e anfíbios tais como os anuros *Brachycephalus ephippium* e *Aplastodiscus leucopygius*, espécies alvo deste estudo (IPLAN, 2014).

Figura 1 – Parque Natural Municipal Augusto Ruschi.



Fonte: PMSJC (2014)

2.2. *Aplastodiscus leucopygius*

Aplastodiscus leucopygius (figura 2), é uma perereca de porte mediano, podendo atingir de 35 a 45 mm, pertencente à família Hylidae. Possui coloração dorsal verde com pintas brancas e marrons e vocalização semelhante ao som de uma flauta, motivos pelos quais é popularmente conhecida como "perereca verde" e "perereca flautinha" (RIBEIRO; EGITO; HADDAD 2005; SERAFIM et al., 2008). Esta espécie de vida arbórea possui hábitos noturnos, vocaliza paralelamente ao solo em folhas de árvores ou arbustos localizados às margens de corpos d'água durante todo o ano com um pico de atividade nas estações chuvosas e pode ser encontrada em áreas de Mata Atlântica do planalto e serras do Mar e da Mantiqueira nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro (VERDADE; RODRIGUES; PAVAN, 2009; RAMOS, 2006).

Figura 2 – Espécime de *Aplastodiscus leucopygius*.



Fonte: Nolasco (2016)

2.3. *Brachycephalus ephippium*

Brachycephalus ephippium (figura 3), é um sapo pertencente à família Brachycephalidae, popularmente conhecido como pingo-de-ouro por possuir coloração laranja-amarelo e por atingir cerca de 18 mm de tamanho corporal. Esta espécie é endêmica do Brasil e pode ser encontrada em áreas florestais da Serra da Mantiqueira, Serra do Mar e Mata Atlântica, estendendo-se da Bahia até o Paraná (SLUYS; ROCHA, 2010). O *B. ephippium* possui hábitos diurnos, podendo ser avistado sob troncos podres, raízes e serrapilheira durante manhãs ensolaradas, após a ocorrência de chuvas e no entardecer, geralmente no verão. (POMBAL JR; SAZIMA; HADDAD, 1994). A espécie é considerada como indicador ambiental e é estudada por possuir glândulas dérmicas que produzem uma substância tóxica semelhante a Tetrodotoxina (TTX), possivelmente para defesa contra predadores, porém não há estudos referentes a caracterização da microbiota de sua epiderme (POLETTINI NETO, 2013; SLUYS; ROCHA, 2010; OLIVEIRA, 2013).

Figura 3 - Espécime de *Brachycephalus ephippium*.



Fonte: Nolasco (2016)

2.4. Microbiota

A microbiota se refere a um conjunto de microrganismos que habita determinado órgão ou tecido no hospedeiro (THOMAS; GREER, 2010).

Esses microrganismos desempenham um papel fundamental, desde a construção da Terra até a evolução da vida e habitam todas as partes da biosfera com uma excelente organização. Seres procariontes como as bactérias são as formas de vida mais antigas e têm coevoluído com os vertebrados por milhares de anos, essas bactérias desenvolvem um relacionamento com o hospedeiro sendo beneficiadas pela obtenção de um ambiente estável com nutrientes e propiciam ao hospedeiro habilidades de metabolização, digestão e o desenvolvimento do sistema imune, assim como, proteção contra patógenos (VIEIRA, 2011).

Nas últimas décadas vem sendo descritas em maiores detalhes interações existentes entre a microbiota e o hospedeiro. Uma grande quantidade de bactérias estão presentes no corpo humano e distúrbios na mesma podem causar doenças. Sabe-se que essas muitas espécies de microrganismos habitam intestino, pele, boca, entre outras partes do corpo dos vertebrados. Dentre os gêneros de bactérias mais comuns encontradas na pele estão *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium spp.*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas*, atuando como fonte de antígenos e estimulando a resposta do sistema imune. (ANTUNES, 2014; VIEIRA, 2011; MALOZI, 2012).

2.5. Microbiota anuro

Segundo Assis (2012), estudos sobre a microbiota de anuros revelaram que o habitat é um componente importante na colonização e composição da comunidade microbiana presente na pele desses animais. Alterações na temperatura, tipo de radiação solar, pH, umidade, concentração de produtos químicos externos e, até mesmo, fatores abióticos podem contribuir para a microbiota do hospedeiro, e quando se trata da temperatura o efeito pode ser maior por favorecer a proliferação de patógenos. Desta forma se faz necessário maiores estudos referentes a microbiota desses animais.

A fauna de anuros conhecida no Brasil compreende 988 espécies, representando 19 famílias e 87 gêneros. Estes animais possuem pele permeável, permitindo trocas gasosas, são

ectodérmicos e em sua maioria tem o ciclo de vida dependente da água (SEGALLA et al., 2014; PAULA, 2011).

Nas últimas décadas os anfíbios vêm sofrendo o maior declínio dentro do grupo de vertebrados em uma escala global, enquanto no Brasil os maiores relatos sobre esse declínio trata de espécies da Mata Atlântica. Os anfíbios, de modo geral, são considerados como bioindicadores, por serem sensíveis a perturbações ambientais, além de fazerem parte da cadeia alimentar. Doenças infecciosas tem sido a principal causa do declínio na população de anfíbios, dentre elas estão as doenças bacterianas, geralmente observada em animais de cativeiro e associadas com a queda do sistema imune, e doenças fúngicas como a quitridiomiose causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (PAULA, 2011).

2.6. Relações entre Microbiota e Sistema imune

“O sistema imunológico é uma organização de células e moléculas com funções especializadas na defesa contra infecções” (DELVES; ROITT, 2000, p.37). Estudos recentes demonstram que o sistema imune desempenha um papel central na formação da composição da microbiota, ao mesmo tempo a microbiota tem um importante papel no desenvolvimento do sistema imune (HOOPER; LITTMAN; MACPHERSON, 2012; ANTUNES, 2014).

O sistema imune apresenta dois tipos de resposta contra microrganismos invasores: resposta inata, tipo de resposta natural que nasce com o indivíduo, e a resposta adquirida que é produzida após o contato com agentes invasores. Os anfíbios apresentam respostas imunológicas inatas da pele, uma vez que, microrganismos patogênicos costumam infectá-los pela pele, sendo esta a primeira barreira contra a infecção. A comunidade microbiana associada a pele dos anfíbios é considerada uma extensão do sistema imune inato (VAZ, 2016).

Animais isentos de microbiota demonstram claramente a importância da mesma em seu desenvolvimento, saúde, entre outras funções com o hospedeiro. A falta da colonização microbiana causou inúmeros defeitos nesses animais, sendo a maioria desses defeitos relacionados ao desenvolvimento e função do sistema imune. Desta forma, fica claro que o sistema imune tem se desenvolvido e coevoluído de maneira eficiente para controlar e coexistir com a microbiota a qual está associado. (VIEIRA, 2011).

Segundo Hooper, Littman e Macpherson (2012), o sistema imunológico apresenta a necessidade de manter uma relação de homeostase com a microbiota, controlando a comunicação dos microrganismos com tecidos do hospedeiro. Atualmente os maiores conhecimentos com relação as interações da microbiota com o sistema imune são proveniente dos estudos sobre a presença de bactérias no trato gastrointestinal que demonstram a importância de bactérias comensais na ativação de respostas do sistema imune.

3. OBJETIVOS GERAIS

Descrever a comunidade microbiana de *Brachycephalus ephippium* e *Aplastodiscus leucopygius* do Parque Natural Municipal Augusto Ruschi.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar a microbiota de *Brachycephalus ephippium* e *Aplastodiscus leucopygius*.

Identificar, através de testes bioquímicos os principais microrganismos presentes na microbiota.

Verificar a sensibilidade e resistência da microbiota aos principais antibióticos utilizados no tratamentos de infecções em geral.

5. METODOLOGIA

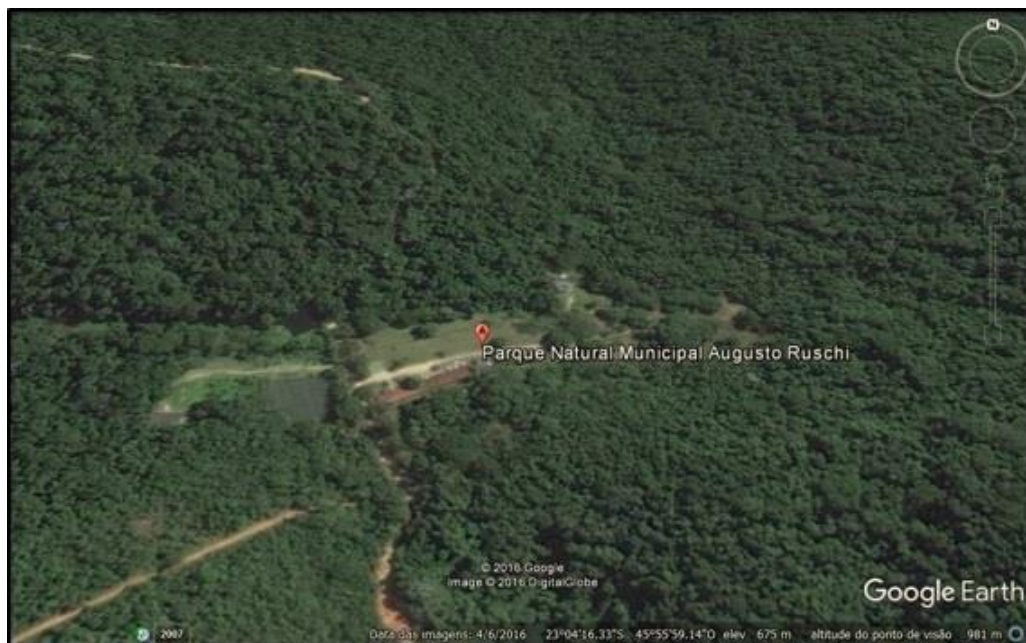
5.1. Local da pesquisa

Parque Municipal Natural Augusto Ruschi (PNMAR)

Localização: R. Antônio Ferreira da Silva, 798 - Costinha, São José dos Campos - São Paulo – Brasil.

Coordenadas: 23° 04'16.33"S 45°55'59.14"O

Figura 4 – Imagem de satélite do PNMAR



Fonte: Google Earth (2016).

5.2. Captura e identificação dos animais

SISBIO - Autorização para atividades com finalidade científica - Número: 48620-3.

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais - Número: 05/CEUA/2014.

Foram capturados cinco espécimes de *B. ephippium* e cinco de *A. leucopygius* por meio de busca ativa, utilizando luvas previamente desinfetadas por álcool 70%. Para cada espécime utilizou-se uma luva que em seguida foi descartada. Todos os espécimes capturados foram identificados taxonomicamente segundo os autores Egito, Haddad e Ribeiro (2005), e

fotodocumentados. Após a coleta do material biológico os animais foram soltos novamente no mesmo lugar em que foram capturados, sendo a retenção desses, a mínima possível.

5.3. Coleta das amostras biológicas

A coleta de material biológico seguiu o protocolo sugerido por Hyatt et al. (2007) e Lambertini et al. (2013). Foi realizada a aplicação de um swab estéril na superfície epidérmica, dorsal, ventral, de dedos e membranas interdigitais de cada espécime coletado, ao todo foram coletados cinco espécimes de *A. Leucopygius* e *B. ephippium*, totalizando assim, cinco amostras de cada espécie. Os swabs foram acondicionados em tubos estéreis contendo meio Stuart.

Figura 5 - Captura e coleta de material biológico. (a) Coleta de amostras biológicas de *B. ephippium*; (b) Captura de espécime de *A. leucopygius*.



Fonte: Nolasco (2016).

5.4. Análise microbiológica das amostras

A análise microbiológica das amostras coletadas foi realizada no laboratório de Biologia Celular e Tecidual do IP&D (Univap), por meio de semeadura em diferentes meios de cultivo: BHI (Brain Heart Infusion Broth - Difco), GBS (Gelose GRANADA Broth - NewProv), MacConkey Agar - Difco, Mannitol Salt Agar - Difco, TSI (Triple Sugar Iron Agar - NewProv), Rugai and Lysine - NewProv, Löwenstein Jensen - NewProv, Mueller-Hinton Agar - Difco, e Sabouraud Agar/Chloramphenicol - NewProv, cada um com sua especificidade (quadro 1). As culturas foram incubadas a 37°C e, posteriormente, os microrganismos resultantes foram transferidos para cultivo em sólido, com exceção do meio Sabouraud Agar

com Chloramphenicol que foi incubado a 26°C para cultura de possíveis fungos existentes nas amostras. Todos os testes sofreram três repetições.

Quadro 1 – Seletividade dos meios de cultura utilizados no cultivo de microrganismos.

BHI (Broth)	Meio não seletivo
GBS (Broth)	Seletivo para <i>Streptococcus agalactiae</i>
MacConkey Agar	Seletivo para bactérias Gram negativas e indicador de fermentação de lactose
Mannitol Salt Agar	Seletivo para <i>Staphylococcus sp.</i>
TSI Agar	Utilizado para diferenciação de Enterobacteriaceae
Löwenstein Jensen	Seletivo para crescimento de micobactérias
Rugai and Lysine	Diferencial destinado à triagem (identificação presuntiva) de enterobactérias oxidase negativas
Mueller-Hinton Agar	Meio de cultura recomendado para a realização de antibiograma
Sabouraud Agar/Chloramphenicol	Favorece o crescimento dos fungos e dificulta o desenvolvimento de bactérias

Fonte: MBIolog Diagnósticos (2016).

5.5. Antibiograma

O antibiograma foi realizado pelo método Kirby & Bauer (1966), por difusão em disco. Foi preparada uma suspensão de bactérias das amostras de *A. Leucopygius* e *B. ephippium* em BHI Broth (meio não seletivo), incubadas de 18 a 24 horas a 37°C. Em seguida, 10 µl desta suspensão foi semeada e igualmente espalhada com o auxílio de uma alça de drigalski na superfície de uma placa contendo meio Mueller Hinton. Cinco discos de papel impregnados com os antimicrobianos CLO-Cloranfenicol (30µg); EST-Estreptomicina (10µg); TOB-Tobramicina (10µg); GEN-Gentamicina (120µg) e AMC-Amoxicilina (30µg), foram adicionados na superfície de forma equidistante. A cultura foi incubada a 37°C por 24 horas e, posteriormente, analisada pela presença ou ausência de halos de inibição mensurados em milímetros.

5.6. Coloração de Gram

Os microrganismos presentes na amostras foram identificados como sendo pertencentes ou não a classe de Gram positivos ou negativos por meio da coloração de Gram das culturas

mantidas nos meios sólidos MacConkey, Mannitol Salt e Mueller-Hinton. Foi preparado um esfregaço bacteriano, que foi fixado na lâmina pelo calor, em seguida, a lâmina foi coberta com solução cristal violeta, por um minuto, e lavada rapidamente com água destilada, então foi coberta novamente com solução de lugol por um minuto, e lavada em água destilada. Por um período de 15 segundos gotejou-se álcool absoluto na lâmina inclinada, e lavada rapidamente em água corrente, em seguida a lâmina foi coberta com fucsina de Gram por um período de 30 segundos. Por fim a lâmina foi lavada em água destilada e após a secagem foi observada em objetiva de imersão.

6. RESULTADOS

6.1. Cultivo de microrganismos

Os resultados do cultivo das amostras biológicas de *A. Leucopygius* e *B. ephippium* (quadro 2) apresentaram semelhanças como a presença de cocos em meio BHI (Broth), *Streptococcus agalactiae* em meio GBS (Broth), e *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* em meio Mannitol Salt Agar, além de apresentarem fungos do gênero *Penicillium* em Sabouraud Agar/ Chloramphenicol (figura 6 e 7), fermentação de glicose e/ou sacarose e produção de gás em meio TSI, e micobactérias em meio Löwenstein Jensen. Porém, algumas diferenças foram notadas em meio MacConkey Agar, onde *A. leucopygius* não apresentou fermentação de lactose (Lac⁻), diferentemente de *B. ephippium* que apresentou fermentação de lactose (Lac⁺). *A. leucopygius* apresentou enterobactérias produtoras de gás em meio Rugai and Lysine (quadro 3), enquanto *B. ephippium* apresentou neste mesmo meio uréase e sacarose positivas (quadro 4).

Quadro 2 – Resultados obtidos por meio do cultivo das amostras em diferentes meios de cultura. Os destaques em vermelho indicam resultados diferentes entre as espécies estudadas.

Meios de Cultura	Resultados do cultivo de amostras biológicas	
	<i>Aplastodiscus leucopygius</i>	<i>Brachycephalus ephippium</i>
BHI (Broth)	Positivo para cocos	Positivo para cocos
GBS (Broth)	Positivo para <i>Streptococcus agalactiae</i>	Positivo para <i>Streptococcus agalactiae</i>
MacConkey Agar	Presença de bactérias não fermentadoras de lactose	Presença de bactérias fermentadoras de lactose
Mannitol Salt Agar	Positivo para <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Positivo para <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i>
Triple Sugar Iron Agar (TSI)	Positivo para fermentação de glicose e/ou sacarose + produção de gás	Positivo para fermentação de glicose e/ou sacarose + produção de gás
Löwenstein Jensen	Positivo para o crescimento de micobactérias	Positivo para o crescimento de micobactérias
Rugai and Lysine	Presença de enterobactérias produtoras de gás	Urease e sacarose positiva
Sabouraud Agar/Chloramphenicol	Presença de fungos do gênero <i>Penicillium</i>	Presença de fungos do gênero <i>Penicillium</i>

Quadro 3 - Resultados em meio Rugai com Lisina para as amostras biológicas dos espécimes de *A. leucopygius*.

Amostras Biológicas de <i>A. leucopygius</i>	Glicose	Lisina	Movimento	Gás
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	-	+	+	-
4	-	+	+	-
5	+	-	+	+

(+) Positivo; (-) Negativo

Quadro 4 - Resultados em meio Rugai com Lisina para as amostras biológicas dos espécimes *B. ephippium*.

Amostras Biológicas de <i>B. ephippium</i>	Glicose	Lisina	Movimento	Gás
1	+	-	+	+
2	+	+	-	-
3	-	+	+	+
4	-	+	-	-
5	+	-	+	+

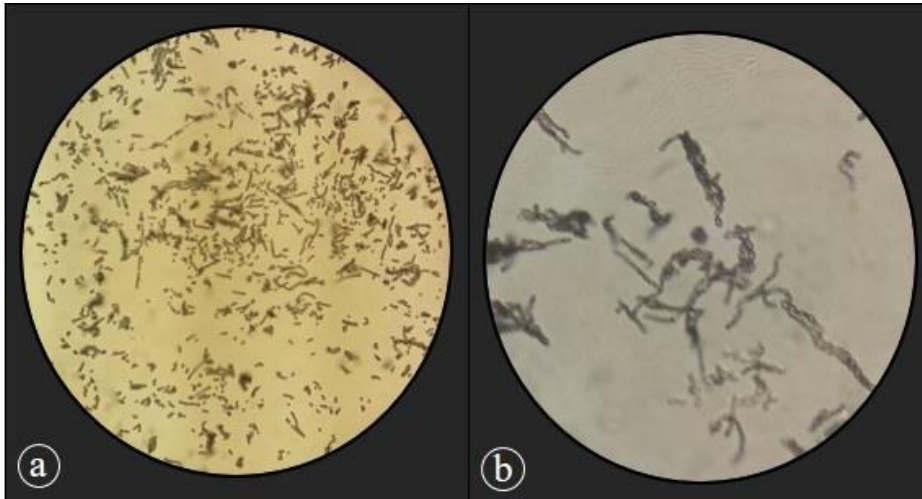
(+) Positivo; (-) Negativo

Figura 6 – Cultivo dos fungos do gênero *Penicillium* em meio Sabouraud Agar/ Chloramphenicol.



Fonte: Nolasco (2016)

Figura 7 – Microscopia dos fungos do gênero *penicillium* encontrados em *A. leucopygius* e *B. ephippium*.
a) Fungo não germinado; b) Fungo germinado (Aumento de 650x).



Fonte: Nolasco (2016)

6.2. Antibiograma

Os testes de antibiograma realizados com amostras biológicas de *A. leucopygius* apresentaram 100% de sensibilidade na presença de tobramicina e gentamicina, 40% na presença de cloranfenicol e 20% na presença de estreptomicina. Todas as amostras apresentaram resistência a amoxicilina (quadro 5).

Quadro 5 - Valores de halos inibitórios (mm) das amostras biológicas testadas dos espécimes de *A. leucopygius*.

Amostras Biológicas de <i>A. leucopygius</i>	Antibióticos				
	CLO (30µg)	EST (10µg)	TOB (10µg)	GEN (120µg)	AMO (30µg)
1	R	R	(11mm)	(22mm)	R
2	R	R	(12mm)	(22mm)	R
3	(20mm)	(15mm)	(18mm)	(23mm)	R
4	(11mm)	R	(11mm)	(25mm)	R
5	R	R	(22mm)	(31mm)	R

R = Resistente; CLO = Cloranfenicol; EST = Estreptomicina; TOB = Tobramicina; GEN = Gentamicina; AMC = Amoxicilina.

As amostras de *B. ephippium* apresentaram 100% de sensibilidade na presença de gentamicina, 80% na presença de cloranfenicol, 60% na presença estreptomicina e 40% na presença de tobramicina e amoxicilina (quadro 6).

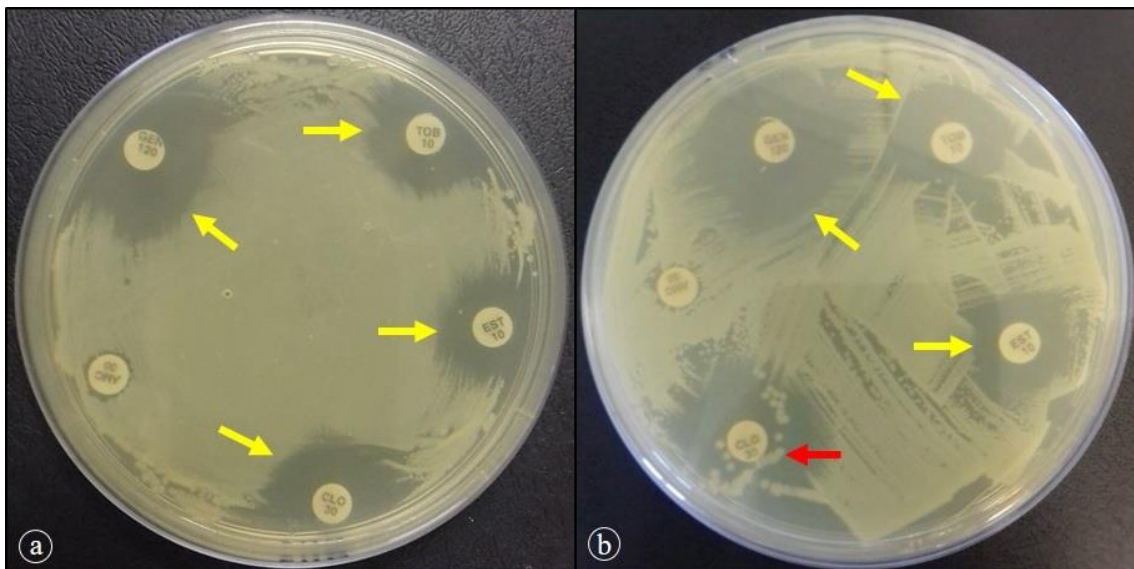
Quadro 6 - Valores de halos inibitórios (mm) das amostras biológicas testadas dos espécimes de *B. ephippium*.

Amostras Biológicas de <i>B. ephippium</i>	Antibióticos				
	CLO (30µg)	EST (10µg)	TOB (10µg)	GEN (120µg)	AMO (30µg)
1	(20mm)	R	R	(25mm)	R
2	(18mm)	(12mm)	(18mm)	(28mm)	(15mm)
3	(17mm)	R	R	(25mm)	R
4	(29mm)	(14mm)	R	(23mm)	(23mm)
5	R	(14mm)	(19mm)	(22mm)	R

R = Resistente; CLO = Cloranfenicol; EST = Estreptomicina; TOB = Tobramicina; GEN = Gentamicina; AMC = Amoxicilina.

As placas de antibiograma de *A. leucopygius* apresentaram halos de inibição bem delimitados (figura 8-a), o mesmo ocorreu nas amostras de *B. ephippium*, com exceção de algumas colônias resistentes que invadiram o halo de inibição de Cloranfenicol (figura 8-b), fato observado na amostra biológica do espécime 5.

Figura 8 – Antibiograma. (a) As setas amarelas indicam os halos de inibição ao redor dos discos de antibiótico nas amostras biológicas de *A. leucopygius*; (b) A seta vermelha indica algumas colônias resistentes à cloranfenicol nas amostras de *B. ephippium*.

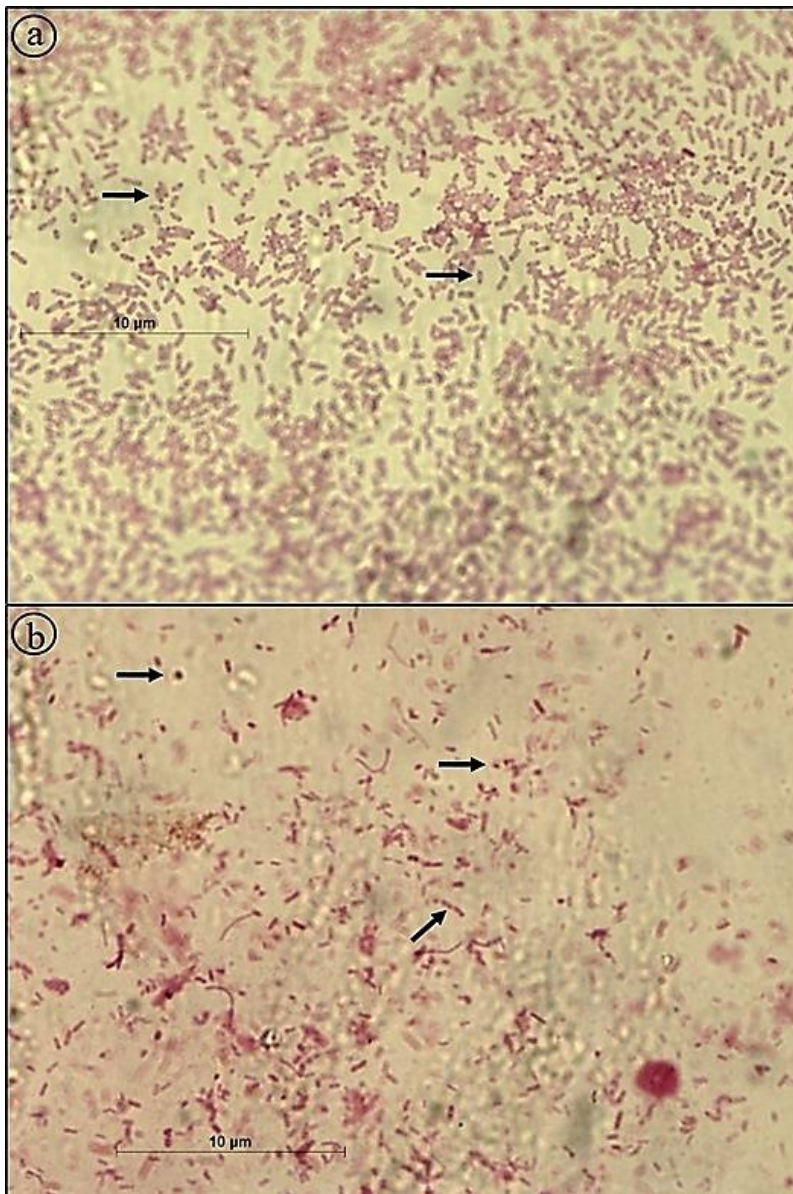


Fonte: Nolasco (2016)

6.3. Coloração de Gram

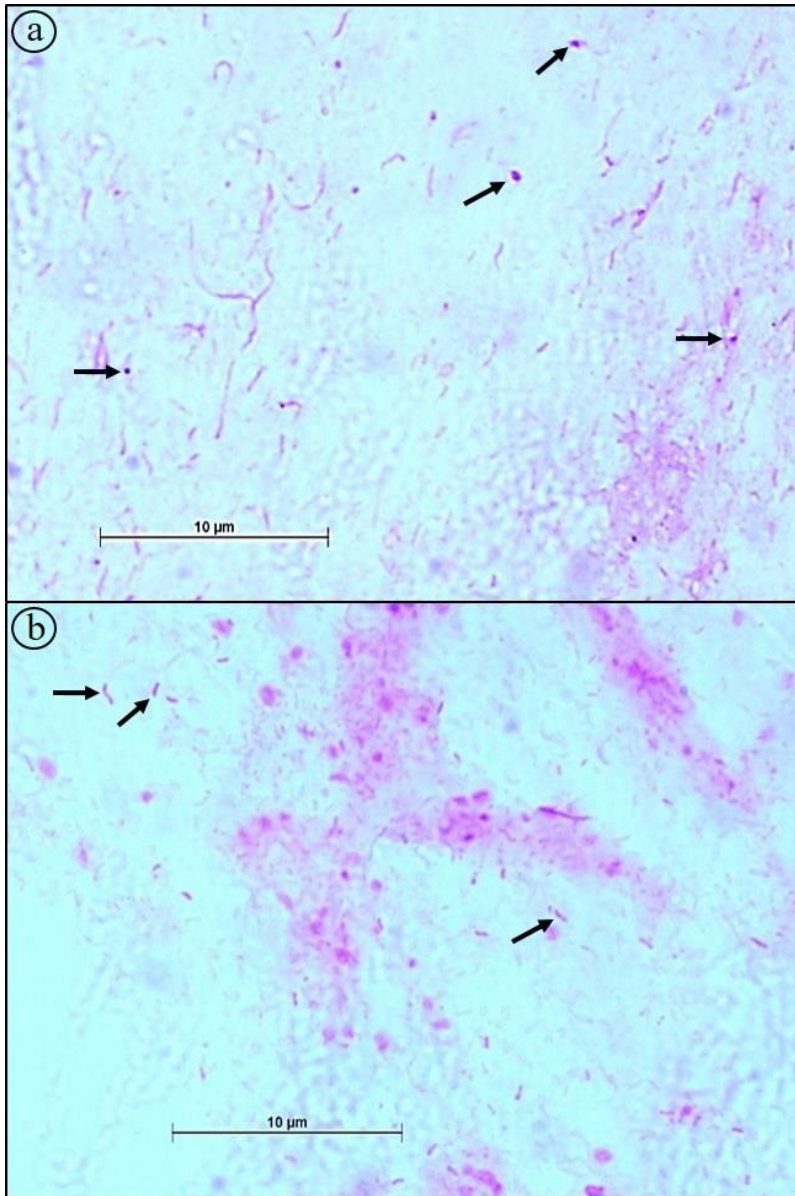
Os resultados obtidos por meio da coloração de Gram de amostras de *A. leucopygius* apresentaram predominância de bastonetes Gram negativos (figura 9 - a), seguido de cocos Gram positivos (figura 9 - b), diferentemente das amostras de *B. ephippium* onde houve a predominância de cocos Gram positivos (figura 10 - a), seguido de bastonetes Gram negativos (figura 10 - b).

Figura 9 - Coloração de Gram de *A. leucopygius*. (a) Setas indicando a presença de bactérias Gram negativas (bastonetes); (b) Setas indicando a presença de bactérias Gram positivas (cocos).



Fonte: Nolasco (2016)

Figura 10 - Coloração de Gram de *B. ehippium*. (a) Setas indicando a presença de bactérias Gram positivas (cocos); (b) Setas indicando a presença de bactérias Gram negativas (bastonetes).



Fonte: Nolasco (2016)

7. DISCUSSÃO

Segundo Assis (2011), existem comunidades microbianas características em espécies de anuros como *A. leucopygius*, que se mostrou positiva para bactérias do gênero *Streptococcus*, *Staphylococcus* e da família Enterobacteriaceae, porém não há trabalhos referentes a caracterização da microbiota de *B. ephippium*, desta forma podemos inferir que existe uma característica microbiana para anuros em geral, pois no presente estudo foram encontradas em ambas as espécies, bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus agalactiae*, que são bactérias pertencentes ao grupo dos cocos Gram-positivos, e embora façam parte da microbiota humana são causadoras de diversos tipos de infecções, geralmente associadas com a queda do sistema imune, o mesmo foi observado em anuros cativos. (SANTOS et al., 2007; VUONG; OTTO, 2002; BORGER et al., 2005; PAULA, 2011).

Nos estudos realizados por Salazar (1974), *S. epidermidis* demonstrou sensibilidade à gentamicina e tobramicina, enquanto Narder Filho et al. (2007), comprovaram a sensibilidade de *S. aureus* à gentamicina e estreptomicina, ambos foram evidenciados nos testes de antibiograma realizados com as amostras biológicas de *A. leucopygius* e *B. ephippium*, com exceção da estreptomicina que apresentou apenas 20% de inibição no crescimento bacteriano das amostras de *A. leucopygius*, e tobramicina com 40% de inibição do crescimento nas amostras de *B. ephippium*, o que pode ser explicado por Araújo (1998), que verificou a resistência de algumas cepas de *S. aureus* à estreptomicina e cloranfenicol. Em *B. ephippium* observa-se amostras resistentes à tobramicina, conforme o observado por Cuevas et al. (2008), ao pesquisarem o aumento na resistência de *S. aureus* frente à tobramicina e cloranfenicol. A resistência à amoxicilina pode ser observada tanto nas amostras de *A. leucopygius* quanto nas amostras de *B. ephippium*, fato evidenciado por Polleto e Reis (2005), e Santos et al. (2007). Os microrganismos que demonstraram resistência à antibióticos são pertencentes ao grupo dos cocos Gram-negativos, Saunders et al. (2005) evidenciaram o aumento progressivo da resistência de cocos gram-positivos à antibióticos, conforme o observado no presente estudo.

Medonza et al. (2012), citam a presença de fungos do gênero *Penicillium* na pele de anuros como oportunista e possivelmente parasita, mas também pode ser um indicativo da ação conjunta da microbiota com o sistema imune desses animais, impedindo a ação de fungos patogênicos, uma vez que, fungos desse gênero são abundantes no solo, desta forma podemos

inferir que o sistema imune de *A. leucopygius* e *B. ephippium* está adaptado ao convívio com alguns tipos de fungos presentes no habitat.

8. CONCLUSÃO

O presente estudo obteve sucesso ao caracterizar a microbiota de *Aplastodiscus leucopygius* e *Brachycephalus ephippium* encontradas no Parque Natural Municipal Augusto Ruschi, embora *B. ephippium* possua como característica produção de toxina, a mesma não interfere ou inibe a presença das espécies microbianas encontradas. No que se refere as duas espécies de anuros analisadas neste estudo, podemos concluir que a comunidade microbiana está correlacionada ao habitat onde reside o animal. Vale ressaltar o fato do aumento da resistência de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Streptococcus agalactiae* à antibióticos como amoxicilina, frequentemente utilizados no tratamento de infecções de amplo espectro. São necessários estudos mais aprofundados a respeito desses e outros microrganismos presentes na pele de anuros, e conseqüentemente as possíveis doenças que estes podem causar, uma vez que, isto pode ser um indicativo de mudanças no sistema imune desses animais.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, L. C. M. A microbiota. **Revista Ciência Hoje**, v. 53. p. 26-29, 2014.
- ARAÚJO, W. P. Fagotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, isoladas de leite. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v. 35, n. 4, p. 161-5, 1998.
- ASSIS, A. B. Microbiota, secreções cutâneas e microclima: consequências para os anfíbios. **Revista da Biologia**, v. 8. p. 45-48, 2012.
- BERGER, L., SPEARE, R., DASZAK, P., GREEN, D. E., CUNNINGHAM, A. A., GOGGIN, C. L., SLOCOMBR, R., RAGAN, M. A., HYATI, A. D., MCDONALD, K. R., HINES, H. B., LIPS, K. R., MARANTELLI, G., PARKES, H. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. **Population Biology**, v. 95. p. 9031-9036, 1998.
- BLAUSTEIN A. R., ROMANSIC, J. M., SCHEESSELE, E. A., HAN, B. A., PESSIER, A. P., LONGCORE, J. E. Interspecific Variation in Susceptibility of Frog Tadpoles to the Pathogenic Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Conservation Biology**, v. 19, n. 5, p. 1460-1468, 2005.
- BORGER, I. L., D'OIIVEIRA, R. E. C., CASTRO, A. C. D. D., & MONDINO, S. S. B. D. *Streptococcus agalactiae* em gestantes: prevalência de colonização e avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 27, n. 10, p. 575-9, 2005.
- CUEVAS, Ó., CERCENADO, E., GOYANES, M. J., VINDEL, A., TRINCADO, P., BOQUETE, T., MARÍN, M. & BOUZA, E. *Staphylococcus* spp. en España: situación actual y evolución de la resistencia a antimicrobianos (1986-2006). **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 26, n. 5, p. 269-277, 2008.
- DELVES, P. J., ROITT, I. M. R. The immune system. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 1, p. 37-49, 2000.
- HOOPER, L. V., LITTMAN, D. R., MACPHERSON, A. J. Interactions between the microbiota and the immune system. **Revista Science**, v.336, n.6086, p. 1268-1273, 2012.
- HYATT, A. D., BOYLE, D. G., OLSEN, V., BOYLE, D. B., BERGER, L., OBENDORF, D., DALTON, A., KRIGER K., HERO, M., HINE, H., PHILLOTT, R., CAMPBELL, R., MARANTELLI, G., GLEASON, F., COLLING, A. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of aquatic organisms**, v. 73, n. 3, p. 175-192, 2007.

IPLAN - **Plano de Manejo do Parque Natural Municipal Augusto Ruschi (PNMAR)**. Disponível em: <<http://www.ipplan.org.br/o-que-fazemos/projeto/8/plano-de-manejo-do-parque-natural-municipal-augusto-ruschi-pnmar>> Acesso em: 17 de outubro de 2016.

LAMBERTINI, C., RODRIGUEZ, D., BRITO, F. B., LEITE, D. S., TOLEDO, L. F. Diagnóstico do fungo Quitridíio: Batrachochytrium dendrobatidis. **Herpetol Bras**, v. 2, p. 12-17, 2013.

MALOZI, M. C. A. importância da microbiota no sistema imunológico. **Pediatr. mod**, v. 48, n. 10, 2012.

MENDOZA, Á. M., AGUIRRE-ROJAS, L., SARRIA, M., & GIRALDO, A. HONGOS DÉRMICO SAPRÓFITOS DE DENDROPSOPHUS COLUMBIANUS (HYLIDAE) EN CALOTO, COLOMBIA. **Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural**, v. 16, n. 1, p. 33-40, 2012.

NADER FILHO, A., FERREIRA, L. M., AMARAL, L. A., ROSSI JÚNIOR, O. D., & OLIVEIRA, R. P. Sensibilidade antimicrobiana dos Staphylococcus aureus isolados no leite de vacas com mastite. **Arq. Inst. Biol**, v. 74, n. 1, p. 1-4, 2007.

OLIVEIRA, E., G., D. História natural de Brachycephalus pitanga (Anura: Brachycephalidae) no Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, estado de São Paulo, 2013.

PARHAM, P. **O Sistema Imune-3**. AMGH Editora, 2011.

PAULA, C. D. D. **Patologia comparada de infecções selecionadas de anfíbios anuros de vida livre do bioma da Mata Atlântica: estudo prospectivo**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2011.

PLANO DE MANEJO PARQUE NATURAL MUNICIPAL AUGUSTO RUSCHI - SÍNTESE. Prefeitura Municipal de São José dos Campos - PMSJC; Instituto de Pesquisa, Administração e Planejamento - IPLAN; Institutos de Pesquisas Ecológicas - IPÊ. Outubro de 2014. Disponível em: <http://www.ipplan.org.br/files/media/originals/plano_de_manejo.pdf> Acesso em: 17 de outubro de 2016.

PMSJC - Prefeitura Municipal de São José dos Campos - Parque Natural Municipal Augusto Ruschi. Disponível em: <http://www.sjc.sp.gov.br/secretarias/meio_ambiente/parque_augusto_ruschi.aspx> Acesso em: 21/08/2016.

POLETTINI NETO, A. A influência de variáveis ambientais na distribuição e abundância de Brachycephalus ephippium na Serra do Japi, Jundiá, São Paulo. 2013.

POLETTI, K. Q., & REIS, C. Suscetibilidade antimicrobiana de uropatógenos em pacientes ambulatoriais na Cidade de Goiânia, GO. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 416-420, 2005.

POMBAL JR, J. P., SAZIMA, I., & HADDAD, C. F. Breeding behavior of the pumpkin toadlet, *Brachycephalus ephippium* (Brachycephalidae). **Journal of Herpetology**, p. 516-519, 1994.

RAMOS, J. Z. P. Ecologia e biologia reprodutiva de duas espécies simpátricas do gênero *Aplastodiscus* na Serra do Japi, município de Jundiá, Estado de São Paulo. 2006.

RIBEIRO, R. S; EGITO, G. T. B. T; HADDAD, C. F. P. Chave de identificação: anfíbios anuros da vertente de Jundiá da Serra do Japi, Estado de São Paulo. **Biota Neotrop**, vol.5 no.2 Campinas, 2005.

SALAZAR H. Estudo sobre a atividade "in vitro" de um novo antibiótico, a Tobramicina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 8, n. 3, p. 185-189, 1974.

SANTOS, A. L; SANTOS, D. O; FREITAS, C. C; FERREIRA, B. L. A; AFONSO, L. F; RODRIGUES, C. R; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SAUNDERS, T., QUEIROZ, L., BENÍCIO, L., CORDEIRO, L. N., DE SOUZA, L. B. S., SANTANA, W. J., & COUTINHO, H. D. M. Bactérias gram-positivas resistentes a antibióticos. **Rev Bras Med**, v. 62, n. 1/2, p. 23-6, 2005.

SEGALLA, M. V., CARAMASCHI, U., CRUZ, C. A. G., GRANT, T., HADDAD, C. F. B., LANGONE, J. A., CRISTIANO, P., GARCIA, A. Brazilian Amphibians: List of Species. **Herpetologia Brasileira**, v. 3. n. 2, 2014.

SERAFIM, H., CICCHI, P.J.P., IENNE, S. & JIM, J. 2008. Anurans of remnants of Atlantic forest of São José do Barreiro municipality, São Paulo State, Brazil. **Biota Neotrop**, v. 8, n. 2, 2008.

SLUYS, M. V., ROCHA, C. F. *Brachycephalus ephippium*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T54453A11149233. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-2.RLTS.T54453A11149233.en>> Acesso em: 03 de novembro de 2016.

THOMAS, D. W., GREER, F. R. American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition: American Academy of Pediatrics Section on Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. **Probiotics and prebiotics in pediatrics**. **Pediatrics**, v. 126. p. 1217-31, 2010.

VAZ, R. I. **Efeitos de ambientes artificiais no perfil da comunidade microbiana cutânea de *Scinax alcatraz* (Anura: Hylidae)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2016.

VERDADE, V. K; RODRIGUES, T. R; PAVAN, D. Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba: a antiga Estação Biológica do Alto da Serra / Márcia Inês Martin Silveira Lopes, Mizué Kirizawa, Maria Margarida da Rocha Fiuza de Melo – São Paulo: Instituto de Botânica, cap26 ao 36.indd 590, 2009.

VIEIRA, A. T. Microbiota, Microbiota, dieta e sistema imune: um diálogo constante via ativação do receptor acoplado à proteína-G 43 (Gpr43), 2011.

VUONG, C., & OTTO M. Staphylococcus epidermidis infections. **Microbes and infection**, v. 4, n. 4, p. 481-489, 2002.

10. ANEXO I



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 48620-3	Data da Emissão: 31/05/2016 15:27	Data para Revalidação*: 30/06/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cristina Pacheco Soares	CPF: 661.472.209-34
Título do Projeto: Avaliação da provável ocorrência do fungo Quiritidio em anuros em fragmento de Mata Atlântica na região do Vale Paraíba	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO VALEPARAIBANA DE ENSINO	CNPJ: 60.191.244/0003-92

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Levantamento e coleta de fungo quitridio	09/2015	09/2016

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	1)Nesta terceira RENOVAÇÃO foi incluído novo pesquisador à equipe de participantes, a saber a pesquisadora Laryssa Nolasco Fernandes; 2)Para a eutanásia dos indivíduos, a serem coletados, a proponente e equipe deverão aplicar método ético, devidamente preconizado em protocolo oficial, como por exemplo a Resolução CFBio 301/2012.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Newton Soares da Silva	colaborador	614.680.379-00	60965749 SSP-PR-PR	Brasileira
2	IBERÉ FARINA MACHADO	pesquisador	278.666.918-94	7119976681 SSP-RS	Brasileira
3	Laryssa Nolasco Fernandes	Pesquisador colaborador	379.259.348-32	399197692 ssp-SP	Brasileira
4	Matheus de Toledo Moroti	pesquisador	429.462.608-95	364175576 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
---	-----------	----	--------------------	------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 99671299





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 48620-3	Data da Emissão: 31/05/2016 15:27	Data para Revalidação*: 30/06/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cristina Pacheco Soares	CPF: 661.472.209-34
Título do Projeto: Avaliação da provável ocorrência do fungo Quítridio em anuros em fragmento de Mata Atlântica na região do Vale Paraíba	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO VALEPARAIBANA DE ENSINO	CNPJ: 60.191.244/0003-92

1	SP	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DA BACIA DO RIO PARAÍBA DO SUL	UC Federal
---	----	---	------------

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Anura
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Anura
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Anura (*Qtde. 30)
4	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Fungi
5	Observação e gravação de imagem ou som de taxon em UC federal	Anura

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Outras amostras biológicas(SWAB DA PELE, amostras de fã-gado e musculatura)
2	Amostras biológicas (Fungos)	Outras amostras biológicas(SWAB)
3	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Puçá, Bioacústica, Captura manual, Outros métodos de captura/coleta(serÁ; manual através de busca ativa)
4	Método de captura/coleta (Fungos)	Coleta manual

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA	coleção
2	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	coleção
3	FUNDAÇÃO VALEPARAIBANA DE ENSINO	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 99671299





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 48620-3	Data da Emissão: 31/05/2016 15:27	Data para Revalidação*: 30/06/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cristina Pacheco Soares	CPF: 661.472.209-34
Título do Projeto: Avaliação da provável ocorrência do fungo Quitridio em anuros em fragmento de Mata Atlântica na região do Vale Paraíba	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO VALEPARAIBANA DE ENSINO	CNPJ: 60.191.244/0003-92

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 99671299



11. ANEXO II



Instituto de Pesquisa e
Desenvolvimento

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO IP&D

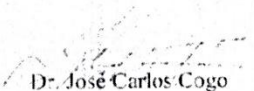
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo n. 05/CEUA/2014, sobre COMPOSIÇÃO E DISTRIBUIÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DE ANUROS DO PARQUE NATURAL MUNICIPAL ALCUSTO RUSCHI AVALIANDO A PROVÁVEL OCORRÊNCIA DO FUNGO QUITRIDIO, sob a responsabilidade do Dra. Cristina Pacheco Soares está de acordo com a LEI 11.794/2008, que Regula o inciso VII do 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais, sendo considerado APROVADO por esta Comissão.

Informamos que o pesquisador (a) responsável por este protocolo deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório parcial após 12 meses e um relatório final no prazo de 24 meses a contar da data de emissão deste certificado.

Atenção: O Pesquisador principal responsável pelo projeto deverá entrar em contato com o Médico Veterinário João Francisco de Azevedo (email: savematos@gmail.com) para agendar o acompanhamento da anestesia e cirurgia.

São José dos Campos, 08 de setembro de 2014.


Dr. José Carlos Cogo
Coordenador CEUA/UNIVAP

Prof. Dr. José Carlos Cogo
CRBio 014.968