



Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Instituto de Ciências Exatas e biológicas – ICEB
Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente – DEBIO
Programa de Pós-graduação em Ecologia de Biomas Tropicais



Dissertação de Mestrado

**Análise sobre a composição da microbiota cutânea de anfíbios
anuros em ambiente contaminado por arsênio**

Isabella Ferreira Cordeiro

Ouro Preto, fevereiro de 2017

Análise sobre a composição da microbiota cutânea de anfíbios anuros em ambiente contaminado por arsênio

Autor: Isabella Ferreira Cordeiro

Orientadora: Profa. Dra. Maria Rita Silvério Pires

Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Márcio Moreira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Biomas Tropicais, do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Ouro Preto, fevereiro de 2017

C794a

Cordeiro, Isabella Ferreira.

Análise sobre a composição da microbiota cutânea de anfíbios anuros em ambiente contaminado por arsênio [manuscrito] / Isabella Ferreira Cordeiro. - 2017.

50f.: il.: color; graf.; tabs; mapas.

Orientador: Prof. Dr. Maria Rita Silvério Pires.

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Márcio Moreira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente. Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Biomas Tropicais. Área de Concentração: Evolução e Funcionamento de Ecossistemas.

I. anuros. 2. Arsênio. 3. Ecossistema - Microorganismos - Microbiota. I. Pires, Maria Rita Silvério. II. Moreira, Leandro Márcio. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 574

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



UFOP
Universidade Federal
de Ouro Preto

Ministério da Educação
Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-graduação em Ecologia de Biomas Tropicais
ICEB - Campus – Morro do Cruzeiro
Ouro Preto – MG – CEP 35.400-000
Fone: (031)3559-1747
E-mail: biomas@iceb.ufop.br

**“Análise da composição da microbiota cutânea de anfíbios
anuros em ambiente contaminado por arsênio”.**

Autora: Isabella Ferreira Cordeiro

Dissertação defendida e aprovada, em 20 de fevereiro de 2017, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Professora Dra. Maria Rita Silvério Pires
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Renato Neves Feio
Universidade Federal de Viçosa

Professor Dr. Sérgio Pontes Ribeiro
Universidade Federal de Ouro Preto

"A natureza deve ser considerada como um todo,
mas deve ser estudada em detalhe."

(Mário Bunge)

Agradecimentos

O trabalho aqui apresentado não poderia ter sido realizado sem a colaboração de diversas pessoas que contribuíram para o meu aprendizado e construção desta pesquisa.

Primeiramente agradeço a Deus por ter guiado meus caminhos, me abençoando sempre e colocando pessoas especiais em minha vida.

Agradeço aos meus pais e minhas irmãs (Rapha e Gabi) por todo o carinho e por sempre acreditarem nos meus propósitos e me ajudarem a concretizá-los. A minha mãe, Terezinha dos Santos Ferreira Cordeiro, agradeço em especial pelas orações, pelo carinho e preocupação principalmente com a minha alimentação. Ao meu pai, Joaquim José Cordeiro, agradeço por todo o apoio, pela participação ativa na pesquisa e ao incentivo. Mãe e pimpi vocês são a minha razão de viver!!!

À professora Maria Rita por todas as oportunidades concedidas, pelos ensinamentos, por aceitar desenvolver uma linha de pesquisa distinta, pelos conselhos e paciência.

Ao professor Leandro Moreira por confiar e acreditar no meu potencial, por compartilhar o conhecimento e, acima de tudo por apostar em mim para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À toda a equipe do LBBM, Érica, Natasha, Camila, Morghana, Izadora, Renatinha e Washington pela paciência, pelos conselhos e ajuda na realização das atividades do laboratório.

À Ceres por todo o ensinamento de coleta, pela ajuda com as licenças e por ser tão solícita em me ajudar sempre.

À Isabela e ao Diego (Cabeludo) pela amizade e por me acompanharem nas coletas.

Aos funcionários do transporte da UFOP por serem sempre solícitos. Em especial ao Nico.

Gostaria, também, de agradecer aos meus primos Josi e Vi por me receberem tão bem em sua casa e por me acompanharem nas coletas, vocês

são demais!!! E não poderia deixar de agradecer ao Miguel que com todo o seu entusiasmo me incentivou na captura dos anuros gritando: 'pega esse didinha'.

Aos meus sogros, Yvone e Toninho e a minha cunhada Victória por serem tão carinhosos em me receber, em especial, a Yvone por ser tão prestativa e eficiente em conseguir todas as áreas de coleta.

Sou imensamente grata ao amor da minha vida, Heitor Miranda Cavaglieri, por estar sempre presente, por sonhar junto, por acreditar na minha capacidade, por ter uma paciência infinita e por todo amor que tem por mim. Te amo!!!

Ao IEF e a Estação Ecológica do Tripuí por possibilitarem o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao programa de pós-graduação em Ecologia de Biomas Tropicais e seus professores pela oportunidade e ensinamentos. À UFOP pela estrutura oferecida e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos. E aos membros da banca pela disponibilidade, leitura e considerações sobre minha dissertação.

OBRIGADA!

Sumário

Resumo	1
Abstract	2
Introdução	3
Hipóteses	8
Objetivos	9
Objetivo Geral	9
Objetivos Específicos.....	9
Materiais e métodos	10
Espécies em estudo e suas respectivas histórias de vida	10
Família Brachycephalidae: <i>Ischnocnema izecksohni</i>	12
Família Hylidae: <i>Ololygon luizotavioi</i> e <i>Ololygon tripui</i>	12
Família Centrolenidae: <i>Vitreorana uranoscopa</i>	13
Família Bufonidae: <i>Rhinella marina</i> e <i>Rhinella schneideri</i>	14
Família Leptodactylidae: <i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	14
Áreas de estudo	14
Estação Ecológica do Tripuí – Ouro Preto, MG	14
Jardim Botânico de Brasília – Brasília, DF.....	16
Delineamento amostral	17
Coleta da microbiota	19
Cultivo de bactérias.....	20
Isolamento de bactérias	21
Preservação dos isolados	21
Transferência para placa de 96 poços	22
Ensaio de resistência ao arsênio	22
Análises comparativas	22

Resultados	24
Ensaio de resistência à arsênio	24
Análise entre microambientes.....	26
Discussão	29
Relação ambiente x composição da microbiota.....	29
Microambiente x resistência à arsênio.....	30
Conclusões	32
Perspectivas	33
Referências	34

Lista de tabelas

Tabela 1: Lista de espécies amostradas na EET e no JBB, quantidade de indivíduos capturados e de isolados correspondentes a cada espécie.....	18
Tabela 2: Lista de espécies amostradas, microambiente, quantidade de indivíduos capturados e quantidade de isolados correspondentes a cada espécie.....	19
Tabela 3: Dados gerados a partir do teste chi-quadrado para análise entre as áreas de estudo. Condição – concentrações de arsênio, df – graus de liberdade e p-value – demonstrando a significância das análises	25
Tabela 4: Tabela do crescimento dos isolados de cada espécie em intervalos de 48 horas.	26
Tabela 5: Número de isolados correspondentes a cada espécie e resistência destes às diferentes concentrações de As 3+.	27
Tabela 6: Dados gerados a partir do teste chi-quadrado para análise entre os microambientes. Condição – concentrações de arsênio, df – graus de liberdade e p-value – demonstrando a significância das análises	28

Lista de figuras

Figura 1: Área prioritária para conservação da Biodiversidade da Herpetofauna de Minas Gerais na região do QF. Em preto destacam-se os limites municipais onde o QF está inserido, representado pelo contorno vermelho. Em verde destaca-se toda a região que se apresenta como área prioritária de conservação da herpetofauna mineira. O círculo roxo destaca a inserção da EET neste contexto. 5

Figura 2: Espécies capturadas na Estação Ecológica do Tripuí. A- *Ischnocnema izecksohni*, B- *Ololygon luizotavioi*, C- *Ololygon tripuí*, D- *Vitreorana uranoscopa*. Fotos: Isabella Ferreira. 10

Figura 3: Espécies capturadas no Jardim botânico de Brasília. A- *Leptodactylus labyrinthicus*, B- *Rhinella marina* e C- *Rhinella schneideri*. Fotos: Isabella Ferreira. 11

Figura 4: Localização da Estação Ecológica do Tripuí, município de Ouro Preto, estado de Minas Gerais e os dois ambientes amostrados: córrego do Tripuí e lagoa dos Fortes. 15

Figura 5: Localização do Jardim Botânico de Brasília. 17

Figura 6: Porcentagem de isolados resistentes as diferentes concentrações em cada área de estudo, EET e JBB. 24

Figura 7: Resistência dos isolados entre espécies que ocupavam microambientes com maior contato com a água (A1) e espécies que ocupavam microambientes com menor contato com a água (A2). A1 - *Ololygon luizotavioi*, *Ololygon tripui*, A2- *Ischnocnema izecksohni* *Vitreorana uranoscopa*. 28

Resumo

Os microrganismos estão suscetíveis aos atributos químicos e físicos do substrato onde vivem, tais como temperatura, pH, disponibilidade de água, radiação, nutrientes, contaminantes e outros. Portanto, a microbiota presente na epiderme dos anuros expostos a estas variáveis pode ter sua composição modulada. O presente trabalho teve como objetivo analisar a composição da comunidade microbiana cultivável e sua resistência ao arsênio oriunda da pele de anfíbios da Estação Ecológica do Tripuí (EET – Ouro Preto, MG), na tentativa de compreender a importância deste fenômeno na relação e manutenção da sobrevivência do vertebrado associado. Para tanto, 214 isolados bacterianos foram obtidos a partir de 4 espécies capturadas em diferentes microambientes dentro da EET, um local naturalmente contaminado por esse elemento. Da mesma forma 68 isolados bacterianos foram obtidos a partir de 3 espécies de anuros da região do Jardim Botânico de Brasília (JBB), uma região controle, livre desta contaminação. Os resultados mostraram uma maior porcentagem de isolados resistentes a arsênio obtidos a partir de anuros da EET, além de apresentarem resistência a concentrações de 5 a 10 vezes maiores que isolados bacterianos obtidos a partir de anuros do JBB. Outro dado que chamou a atenção tem relação com a maior resistência associada a isolados obtidos a partir de anuros da EET que naturalmente estão mais expostos ao contato direto com a água, como é o caso de *Ololygon luizotavioi*, frente às espécies *Ischnocnema izecksohni* (arbustiva) e *Vitreorana uranoscopa* (arborícola). Este estudo piloto estabeleceu pela primeira vez uma relação direta entre a microbiota associada a pele de anfíbios e a resistência a metais pesados do meio, permitindo-se inferir que possam estar envolvidas com a manutenção da sobrevivência da espécie vertebrada, que classicamente é muito sensível a exposição a elementos tóxicos como o arsênio. Um provável fenômeno decorrente de coevolução entre as espécies que precisa ser melhor explorado e compreendido.

Palavras-chave: Anuros, arsênio, microbiota, Quadrilátero Ferrífero.

Abstract

Microorganisms are susceptible to the chemical and physical attributes of the substrate where they live, such as temperature, pH, water availability, radiation, nutrients, contaminants and others. Therefore, the microbiota present in the epidermis of the anurans exposed to these variables may change its composition. The objective of this study was to analyze the composition of the microbiota and its resistance to arsenic from the amphibian skin of the Tripuí Ecological Station (EET - Ouro Preto, MG), in attempt to understand the importance of this phenomenon in the relationship and maintenance of the vertebrate survival. For this, 214 bacterial isolates were obtained from 4 species captured in different microenvironments in TSE, a site naturally contaminated by this element. In the same way, 68 bacterial isolates were obtained from 3 species from the Jardim Botânico de Brasília (JBB), a control region free of this contamination. The results showed a higher percentage of arsenic resistant isolates obtained from TSE anurans, as well as resistance to concentrations of 5 to 10 times higher than bacterial isolates obtained from JBB anurans. Another data that called the attention is related to the higher resistance associated to isolates obtained from TSE anurans that are naturally more exposed to direct contact with water, such as *Oligophrynopus luizotavioi*, compared to the species *Ischnocnema izecksohni* and *Vitreorana uranoscopa* (arboreal). This pilot study established for the first time a direct relationship between the microbiota associated with amphibian skin and the resistance to heavy metals in the environment, making it possible to infer that they may be involved in maintaining the survival of the vertebrate species, which is classically very sensitive to the exposure to toxic elements such as arsenic. A probable phenomenon arising from co-evolution among species that needs to be better explored and understood.

Key words: Anurans, arsenic, microbiota, Quadrilátero Ferrífero

Introdução

A pele dos anuros exerce diversas funções dentre as quais proteção, respiração, osmorregulação e termorregulação (Duellman & Trueb, 1986). Desempenhando a função de proteção, a pele atua como defesa primária tendo como principais barreiras a comunidade microbiana associada a esse estrato e as glândulas dérmicas que secretam moléculas bioativas (Zasloff, 2002).

A presença de comunidades microbianas específicas sobre a pele dos anfíbios já foi constatada em estudos anteriores como sendo fator fundamental para a manutenção da sobrevivência destes vertebrados, sendo portanto modulada por fatores bióticos e abióticos (Harris *et al.*, 2006; Woodhams *et al.*, 2007). No entanto, os fatores que modulam os perfis dessas comunidades tem sido pouco investigados, e quase sempre estão relacionados a estudos de mudança do perfil da comunidade na presença de organismos patogênicos (Harris *et al.*, 2009; Jani & Briggs, 2014).

Os microrganismos são suscetíveis às variáveis químicas e físicas do substrato onde vivem, tais como temperatura, pH, disponibilidade de água, radiação, nutrientes, contaminantes e outros (Madigan *et al.*, 2004). Dentre os contaminantes que mais agridem estes microrganismos estão os xenobióticos e metais pesados (Giller *et al.*, 1998). Em ambos os casos, a exposição a estes compostos desencadeia uma série de mecanismos moleculares de indução de danos celulares que culminam, quando de maneira cumulativa, na morte da comunidade microbiana que acaba refletindo na morte do anfíbio (Hacioglu & Tosunoglu, 2014).

Apesar de todos os metais pesados serem danosos aos organismos vivos, estudos envolvendo mercúrio e arsênio tem se destacado (Baker *et al.*, 1983; Bertin *et al.*, 2011; Lomax *et al.*, 2012). O arsênio, em especial, é um metalóide de ampla distribuição geográfica, sendo encontrado no solo, na água e até, de maneira atípica, como constituinte de alguns organismos (Wang & Zhao, 2009). No ambiente é encontrado em quatro possíveis estados de oxidação, dependentes de pH, temperatura e outros constituintes associados:

arseneto As (-3), arsênio elementar As (0), arsenito As (+3) e arsenato As (+5), sendo estas duas últimas formas inorgânicas as mais comuns (Rosen, 2002).

O arsênio é liberado para o ambiente naturalmente, seja por erosão e ou intemperismo de solos e rochas. No entanto, são as atividades antropogênicas, tais como queima de combustíveis fósseis, indústria de fundição de metais, uso de pesticidas, preservantes de madeira, refinaria do petróleo e atividades de mineração, os fatores que mais amplificam a disposição deste metal nos ambientes (Dembitsky & Rekanza, 2003; Santos *et al.*, 2003). Daí a preocupação com o uso dos recursos naturais associados a ambientes previamente descritos como tendo em sua composição concentrações elevadas de arsênio.

Uma vez em contato com os organismos, o arsenito e o arsenato são capazes de promover efeitos diversos, sendo o arsenito considerado mais danoso que o arsenato. O arsenito é responsável por causar modificações estruturais em proteínas, além de ocasionar a inativação de algumas enzimas pela sua ligação aos grupos tióis dos resíduos de cisteína e ao nitrogênio imidazólico dos resíduos de histidinas (Barra *et al.*, 2000). Já, o arsenato compete com o fosfato pelo mesmo sítio de ligação afetando as atividades de fosforilação (Léonard & Lauwerys, 1980; Cervantes *et al.*, 1994).

No Brasil, os estudos referentes a contaminação por arsênio estão restritos a três principais regiões, onde o teor de contaminação está associado à atividade de mineração: Quadrilátero Ferrífero - Minas Gerais, Vale do Ribeira – entre Paraná e São Paulo, e na região de Santana - Amapá (Borba & Figueiredo, 2004). No Quadrilátero Ferrífero (QF) o arsênio encontra-se em associação com as rochas auríferas sulfetadas, principalmente a arsenopirita (FeAsS) (Borba, 2002). Especificamente em relação ao QF, a contaminação por arsênio destaca-se pelo fato de estar associada à intensa atividade de mineração e refino de metais, que fazem desta região um dos maiores pólos mundiais de obtenção de minérios (Santos *et al.*, 2003).

Paradoxalmente, o QR é definido como área de importância biológica especial devido à alta riqueza de vertebrados, por apresentar ambientes únicos considerado por alguns autores como potencial hotspot de diversidade como é

o caso dos campos ferruginosos (Jacobi *et al.*, 2015). Isto porque estas regiões já foram destacadas por apresentar elevado endemismo de plantas e anfíbios (Drummond, *et al.*, 2005). No caso dos anfíbios, objeto de estudo deste trabalho, a região do QF é quase toda demarcada como sendo uma área prioritária para conservação da Biodiversidade da Herpetofauna de Minas Gerais (Drummond, *et al.*, 2005). Como pode ser observado na figura 1.

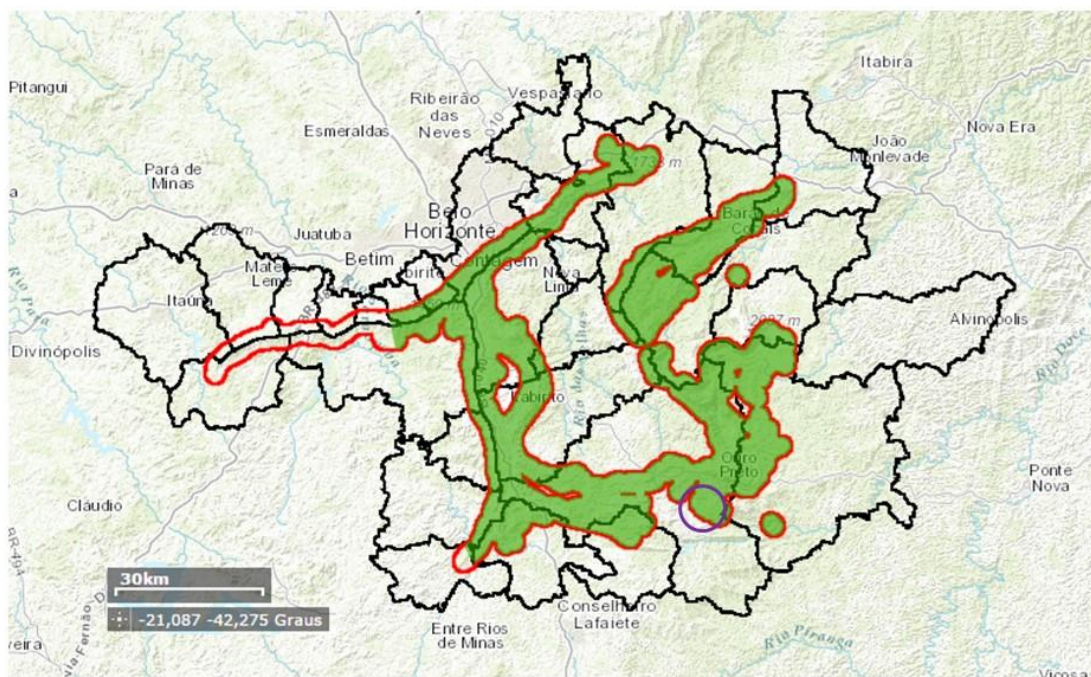


Figura 1: Área prioritária para conservação da Biodiversidade da Herpetofauna de Minas Gerais na região do QF. Em preto destacam-se os limites municipais onde o QF está inserido, representado pelo contorno vermelho. Em verde destaca-se toda a região que se apresenta como área prioritária de conservação da herpetofauna mineira. O círculo roxo destaca a inserção da EET neste contexto.

Toda esta contaminação ficou evidenciada no trabalho de Costa *et al.*, (2015) que analisaram a concentração de arsênio em águas superficiais e sedimentos de riachos no QF. Esses autores encontraram concentrações elevadas de arsênio, tanto em águas quanto nos sedimentos, de tal maneira que para contaminação das águas foram encontrados valores superiores a 57,70 µg/L nas três principais bacias que atravessam o QF: Rio das Velhas, Rio Doce e Rio Paraopeba. Colocando em atenção os níveis de concentração

deste metal nas águas que abastecem a região metropolitana de Belo Horizonte, antes do processo de tratamento. Ainda neste trabalho, ficou demonstrado que nos sedimentos de riachos, alguns dos pontos de amostragem apresentaram valores acima de 5,09 mg/kg. Segundo o Ministério da Saúde (2011), a concentração de As em água potável não deve exceder 10 µg/L. O Ministério do Meio Ambiente do Brasil (2005) também adotou esse valor para água superficial propícia a tratamento para consumo humano. Como não existem valores fixados para evitar danos gerados pelo arsênio em outros organismos, estes mesmos valores são extrapolados como referencial de contaminação, o que coloca os anfíbios e outros seres vivos da região do QF em uma suposta exposição letal.

Respostas fisiológicas de isolados retirados de anfíbios expostos à metais pesados já foram descritas na literatura. Hacioglu & Tosunoglu, (2014) relatam a resistência de isolados retirados de espécies de anfíbios a quatro metais pesados (zinco, cobre, cromo e manganês), correlacionando a associação entre a resistência dos isolados e a contaminação do meio por estes metais pesados provenientes de esgotos não tratados, resíduos industriais e atividades agrícolas. Como conclusão estes autores sugeriram que a contaminação atua como pressão seletiva do ambiente na seleção de microrganismos resistentes. O que nos leva a refletir numa possível coevolução destas espécies microbianas junto aos anfíbios, na manutenção da sobrevivência do vertebrado, assim como proposto por diversos autores (Ley *et al.*, 2008; Rawls *et al.*, 2004) que discutem a interação entre a comunidade microbiana e o vertebrado modulando a evolução desses.

Anfíbios anuros são encontrados nos mais diferenciados tipos de ambientes como riachos, lagoas, brejos, poças permanentes e temporárias ou na serapilheira no interior de florestas (Duellman & Trueb, 1986). Assim, características da história natural e o ambiente ocupado pelos anuros podem contribuir para a determinação dos perfis das comunidades microbianas da pele (Madigan *et al.*, 2004). A influência dos microambientes ocupados pelas espécies de anuros na composição da microbiota cutânea desses animais já foi observada em estudo sobre análise da microbiota cutânea de anfíbios em fragmentos de Floresta Atlântica realizado por Assis (2011).

Em geral, os anuros são estudados durante o período reprodutivo quando exibem uma grande diversidade de modos reprodutivos. Nesse período, os animais utilizam microambientes específicos, sendo bastante variável o contato e a dependência aos ambientes aquáticos (Haddad & Prado, 2005). Nesse cenário, espécies que utilizam microambientes mais expostos à água poderão apresentar microbiota cutânea mais especializada para contaminantes encontrados na água, tal como o arsênio.

Diante das perspectivas acima descritas, e levando em conta a vulnerabilidade dos microrganismos aos atributos do ambiente, é esperado que a composição da microbiota de anuros que se encontram expostos a estes metais pesados no QF apresente um conjunto de microrganismos com mecanismos moleculares que suportem à toxicidade do arsênio e que mantêm a sobrevivência dos anfíbios frente a essa toxicidade. Este trabalho procurou discutir o potencial de uma possível microbiota resistente a arsênio associada a pele de anfíbios anuros na manutenção da sobrevivência dos anuros em um ambiente com características físico-química hostis para uma série de organismos vivos, o QF.

Hipóteses

Frente ao referencial teórico apresentado na introdução, algumas hipóteses e premissas foram estabelecidas para que este trabalho viesse a ser encaminhado.

- Hipótese [1]: Anuros que vivem no QF apresentarão microbiota mais resistente ao arsênio do que anuros que vivem fora dessa área geográfica.

Premissa: As condições dos habitats ocupados por anfíbios afetam a composição da microbiota (Pelczar & Reid, 1981; Madigan *et al.*, 2004), devido a pele de anuros funcionar como um substrato para os microrganismos e, como tal, estar suscetível as características dos locais onde se encontram esses anfíbios (Assis, 2011).

- Hipótese [2]: Haverá diferença quanto a resistência ao arsênio entre os isolados de anuros que ocupam diferentes microambientes.

Premissa: Os microambientes ocupados por anuros contribuem para a modulação da microbiota cutânea (Assis, 2011).

Com base nestas hipótese e premissas, os objetivos do trabalho foram estabelecidos.

Objetivos

Objetivo Geral

Analisar a composição da comunidade microbiana cultivável e sua resistência ao arsênio oriunda da pele de anfíbios da Estação Ecológica do Tripuí.

Objetivos Específicos

- 1) Isolar e preservar o maior número de bactérias cultiváveis oriundas da pele dos anfíbios capturados.
- 2) Investigar a resistência destes isolados frente a concentrações crescentes de arsênio em meio de cultura.
- 3) Investigar a possível correlação entre nível de resistência dos isolados ao arsênio e microambiente de sobrevivência dos anuros.
- 4) Investigar a possível resistência ao arsênio em isolados bacterianos oriundos de anuros em uma zona livre de contaminação por este metal pesado.

Materiais e métodos

Espécies em estudo e suas respectivas histórias de vida

Sete espécies de anfíbios anuros adultos foram utilizados neste trabalho pertencentes a cinco famílias, Brachycephalidae, Bufonidae, Centrolenidae, Hylidae e Leptodactylidae. Hylidae foi representada pelas espécies *Ololygon luizotavioi* e *Ololygon tripuí*, Brachycephalidae foi representada pela espécie *Ischnocnema izecksohni* e Centrolenidae foi representada pela espécie *Vitreorana uranoscopa* (Figura 2). Esse grupo de espécies foi coletado na Estação Ecológica do Tripuí.



Figura 2: Espécies capturadas na Estação Ecológica do Tripuí. A- *Ischnocnema izecksohni*, B- *Ololygon luizotavioi*, C- *Ololygon tripuí*, D- *Vitreorana uranoscopa*. Fotos: Isabella Ferreira.

A família Bufonidae foi representada pelas espécies *Rhinella marina* e *Rhinella schneideri*, já a família Leptodactylidae foi representada pela espécie *Leptodactylus labyrinthicus* (Figura 3). Essas três espécies foram coletadas no Jardim Botânico de Brasília.

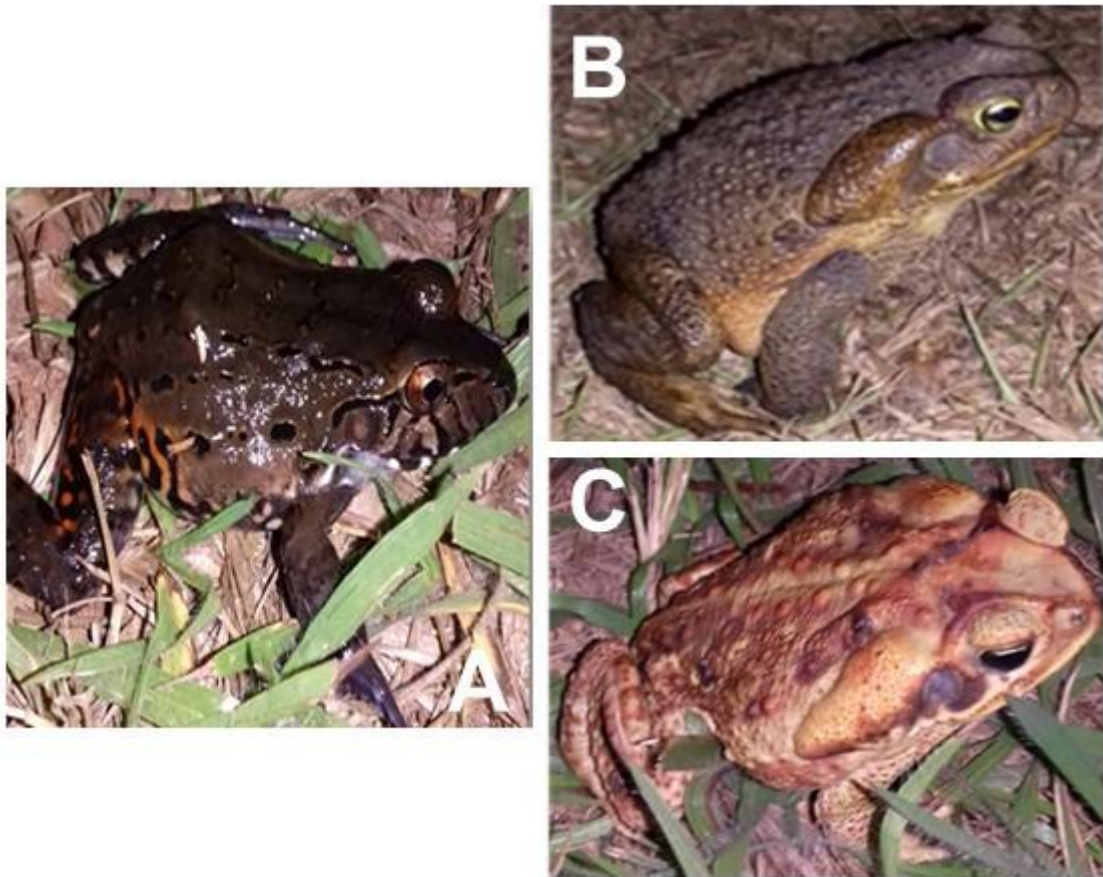


Figura 3: Espécies capturadas no Jardim botânico de Brasília. A- *Leptodactylus labyrinthicus*, B- *Rhinella marina* e C- *Rhinella schneideri*. Fotos: Isabella Ferreira

Nenhuma das espécies em estudo se encontra sob algum grau de ameaça segundo a Lista Brasileira de espécies ameaçadas de extinção (MMA, 2014).

Família Brachycephalidae: *Ischnocnema izecksohni*

A família Brachycephalidae é classificada no táxon novo Terrarana, que inclui espécies do Novo Mundo com reprodução terrestre, frequentemente em locais distantes de corpos d'água (Hedges *et al.*, 2008). A espécie *Ischnocnema izecksohni* (Caramaschi e Kisteumacher, 1989 “1988”) apresenta pequeno a médio porte, os machos medem aproximadamente 26,70 mm de comprimento e as fêmeas 33,87 mm (Taucce *et al.*, 2012). Esses animais ocupam a serapilheira e podem ser encontrados em vegetação arbórea e arbustiva (Taucce *et al.*, 2012). Depositam ovos sob folhas e troncos caídos no solo (IUCN, 2011). A espécie habita matas de galeria do Quadrilátero Ferrífero sendo considerada endêmica dessa região (Leite *et al.*, 2008).

Família Hylidae: *Ololygon luizotavioi* e *Ololygon tripui*

Ololygon luizotavioi (Caramaschi e Kisteumacher, 1989) e *O. tripui* (Lourenço, Nascimento e Pires, 2009) são anuros anteriormente considerados como pertencentes ao grupo *Scinax catharinae*. Atualmente, essas espécies foram incluídas no gênero *Ololygon*, que reúne as espécies da subfamília Scinaxinae que colocam ovos em riachos ou em bromélias terrestres (Duellman *et al.*, 2016). São animais comumente encontrados na vegetação marginal que limita os riachos (Lourenço *et al.*, 2009a; Lourenço *et al.*, 2009b; Pombal *et al.*, 2010). As espécies desse grupo estão distribuídas do nordeste ao sul do Brasil, nordeste da Argentina, sul do Paraguai e Uruguai (Faivovich, 2002; Pimenta *et al.*, 2007). A distribuição no Brasil está associada as galerias ao longo de riachos com elevação moderada a alta nas florestas da costa leste, as montanhas do sudeste e sul e também a região central do Brasil (Caramaschi & Kisteumacher, 1989; Pombal & Bastos, 1996) em áreas de vegetação de Mata atlântica, cerrado ou em áreas de transição conectando esses biomas (Faivovich, 2002; Araújo *et al.*, 2007; Pombal *et al.*, 2010). A espécie *O. luizotavioi* apresenta pequeno tamanho corporal, os machos medem cerca de 21,8 mm de comprimento, e fêmeas aproximadamente 27,5 mm (Caramaschi & Kisteumacher, 1989). Utilizam o estrato herbáceo para a vocalização e depositam os ovos em corpos d'água lóticos (Haddad & Prado, 2005). Esses

anuros apresentam vocalização noturna, enquanto se mantêm próximos ou até mesmo dentro d'água, sobre galhos e folhas de plantas ou pedras localizadas nas margens estando em contato constante com o fluxo d'água (Lourenço *et al.*, 2009a). Os indivíduos da espécie *O. tripui* apresentam pequeno porte, o comprimento do corpo varia entre 21,31 a 26,18 mm nos machos e entre 37,16 a 39,20 mm nas fêmeas (Lourenço *et al.*, 2009b). Como é típico para esse grupo de espécies, *O. tripui* e *O. luizotavioi* são encontrados principalmente na estação fria e seca, entre os meses de abril e setembro, período em que é observada vocalização dos machos (Lourenço *et al.*, 2009b). Os indivíduos são frequentemente observados sobre raízes expostas ou folhas de plantas nas bordas de córregos e diferem dos machos da espécie *O. luizotavioi* por manterem menor contato com a água no período reprodutivo (Lourenço *et al.*, 2009a). O modo reprodutivo dessas duas espécies é do tipo 2 segundo a classificação de Haddad & Prado (2005), ou seja, são liberados ovos e girinos exotróficos em corpos d'água lóticos.

Família Centrolenidae: *Vitreorana uranoscopa*

Vitreorana uranoscopa (Müller, 1924) é classificada como espécie arbórea de pequeno porte com tamanho aproximado de 25 mm de comprimento e comumente conhecida como rã-de-vidro, ou perereca-de-vidro, assim como outras espécies da família Centrolenidae (Izecksohn & Carvalho-e-Silva, 2001).

A distribuição da espécie *V. uranoscopa* abrange o Brasil, Argentina e Paraguai (Heyer, 1985; Stetson, 2001; Frost, 1985). No Brasil, é endêmica da mata atlântica abrangendo a região norte dos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e a região sul do Rio Grande do Sul (Izecksohn & Carvalho-e-Silva, 2001). Segundo Eterovick *et al.*, (2005), Lucas & Fortes, (2008) e Machado *et al.*, (2010) essa espécie é encontrada próxima a cursos de água limpa.

Durante a estação chuvosa, os machos de *V. uranoscopa* vocalizam na vegetação arbórea a uma altura superior a 1 metro acima do solo, os ovos são

depositados nas folhas e caem na água após o desenvolvimento (Cunha *et al.*, 2010).

Família Bufonidae: *Rhinella marina* e *Rhinella schneideri*

As espécies *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) e *Rhinella schneideri* (Werner, 1894) pertencem ao grupo *Rhinella marina* composto por mais 8 espécies (Maciel, 2008). Essas espécies de grande porte apresentam ampla distribuição, desde o Texas nos Estados Unidos, México e toda América do Sul até o Uruguai (Frost, 1985). Em geral, são animais de solo, os machos são encontrados próximos a corpos d'água vocalizando no período reprodutivo (Frost, 1985).

Família Leptodactylidae: *Leptodactylus labyrinthicus*

Leptodactylus labyrinthicus (Spix, 1824) ocorre no Paraguai, algumas regiões da Bolívia e nas regiões de Cerrado e Caatinga do Brasil (Frost, 1985). A espécie é considerada de grande porte, geralmente encontrada nas margens de brejos e locais de água corrente com formação de remanso com vegetação (Agostinho *et al.*, 2013). Deposita ovos em ninhos de espuma em bacias escavadas nas margens dos corpos d'água (França *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2005; Zina & Haddad, 2005).

Áreas de estudo

Estação Ecológica do Tripuí – Ouro Preto, MG

A Estação Ecológica do Tripuí (EET) (Figura 4) está localizada no município de Ouro Preto, Minas Gerais, no Quadrilátero Ferrífero. É uma região de transição entre os dois biomas brasileiros considerados “hotspots” mundiais para a conservação da biodiversidade, a Mata Atlântica e o Cerrado (Myers *et al.*, 2000). Compreende uma área de 337 ha, localizada na porção inferior da sub-bacia do córrego Botafogo, entre o meridiano 43° 34' 33" W e o paralelo 20° 23' 45" S (FEAM, 1995).

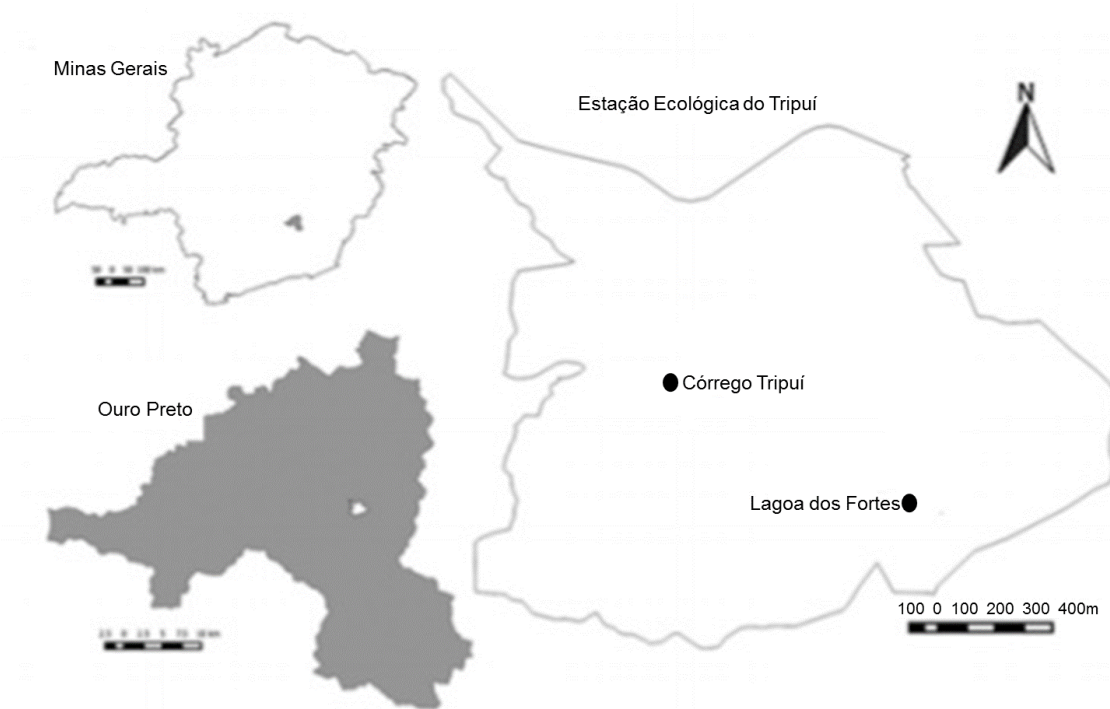


Figura 4: Localização da Estação Ecológica do Tripuí, município de Ouro Preto, estado de Minas Gerais e os dois ambientes amostrados: córrego do Tripuí e lagoa dos Fortes.

A Unidade de Conservação apresenta florestas estacionais semidecíduais, campo limpo e campo sujo de cerrado, áreas em sucessões secundárias em vários estágios de desenvolvimento, córregos e uma lagoa artificial (Pedralli *et al.*, 2000). Os níveis altimétricos variam entre 1.100 a 1.450 metros (Álvares *et al.*, 2013). A EET está inserida em região de domínio climático do tipo CWb segundo a classificação de Köppen, ou seja, clima temperado úmido com inverno seco e verão chuvoso, com precipitação pluviométrica média anual variando de 1400 a 2000 mm. A temperatura média anual oscila entre 14 e 19°C (Álvares *et al.*, 2013).

A região de estudo apresenta altas concentrações de elementos traços nas rochas, se destacando o arsênio já que sua origem é em parte geogênica (Costa *et al.*, 2015). As altas concentrações de arsênio, também podem ser atribuídas ao intemperismo em zonas mineralizadas, erosão e dissolução de pilhas de rejeito de minas e ao processo de escoamento que ocorre no solo (Borba, 2002). Cruz (2002) e Parra (2006) em estudos sobre análises

geoquímicas da água, solo e sedimentos da EET, encontraram teores de arsênio que variavam entre 0,53 µg/L e 22,8 µg/L na água e valores entre 3,85 mg/kg e 11,2 mg/kg no solo.

Foram amostrados dois diferentes ambientes na EET: um trecho ao longo do córrego Tripuí e a lagoa dos Fortes. Esse córrego é um tributário da margem esquerda do córrego Botafogo e do córrego Marzagão. Seu trajeto é sinuoso e de corrente rápida sendo o principal canal de drenagem da EET (FEAM, 1995). O trecho amostrado conta com áreas de remanso em suas margens e a vegetação do entorno é conservada e densa (FEAM, 1995). Já a Lagoa dos Fortes é um açude artificial localizado em meio a uma área florestada, o único ecossistema lacustre da EET (Magalhães, 2015).

Jardim Botânico de Brasília – Brasília, DF

A segunda área de coleta foi em pontos dentro dos limites do Jardim Botânico de Brasília (Figura 5), local com ecossistema predominado pelo Cerrado (Azevedo *et al.*, 1990). O Jardim Botânico de Brasília (JBB) está localizado no Lago Sul, Brasília – Distrito Federal. A região apresenta variações fitofisionômicas que incluem formações vegetacionais do tipo florestais, savânicas e campestres (Salles *et al.*, 2007). Abrange uma área de 5.000ha, situado nas coordenadas 15°50'-15°55'S, 47°49'-47°55'O, com altitude média de 1.056 m. O clima da região é do tipo Aw ou tropical chuvoso, de acordo com a classificação de Köppen, com invernos secos e verões chuvosos (Azevedo *et al.*, 1990).

As coletas foram realizadas em espelhos d'água artificiais presentes ao longo do JBB. A região é livre de contaminação por arsênio.

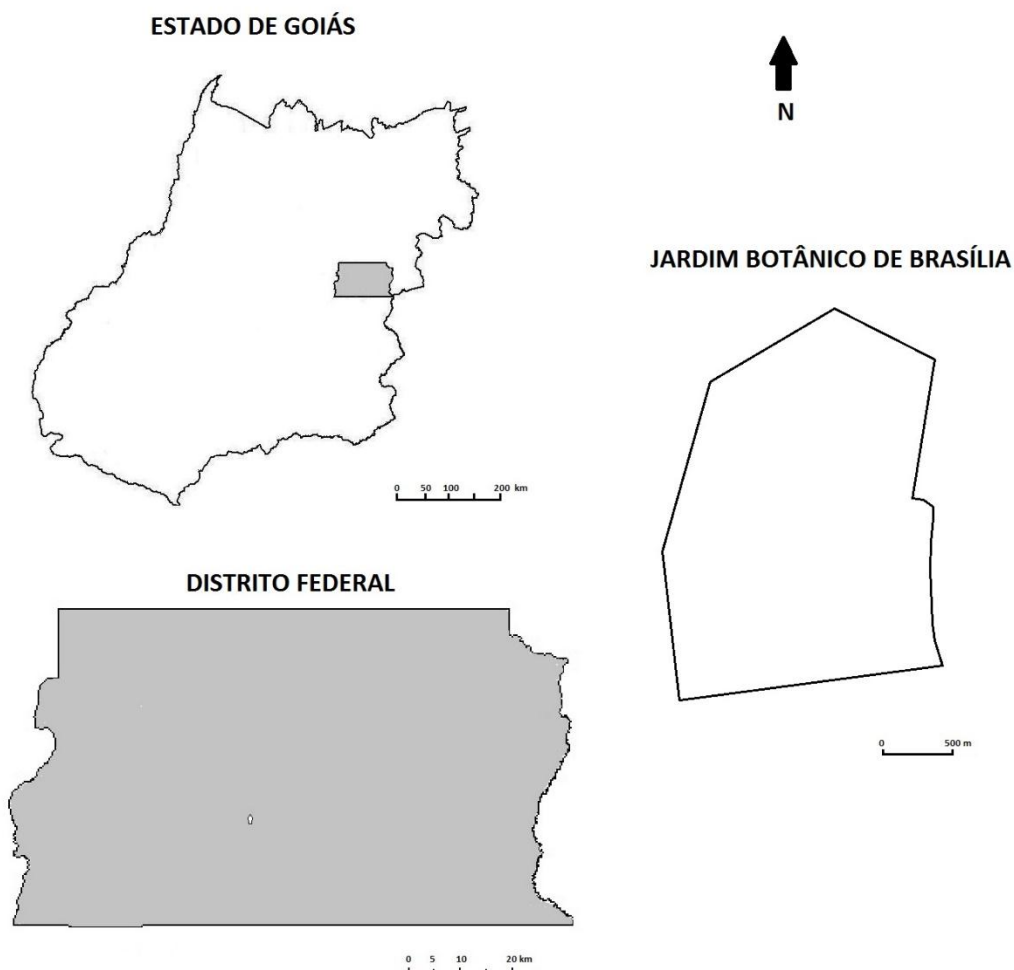


Figura 5: Localização do Jardim Botânico de Brasília.

Delineamento amostral

Para cada espécie foram amostrados 3 indivíduos. Assim, para análise da hipótese 1 foram amostrados na EET 9 indivíduos, pertencentes a 3 espécies, *O. luizotavioi* (3) e *O. tripui* (3) e *V. uranoscopa* (3) (Tabela 1). No JBB região controle, livre de contaminação, foram amostrados 9 indivíduos pertencentes a 3 espécies, *L. labyrinthicus* (3), *R. marina* (3) e *R. schneideri* (3) (Tabela 1). A quantidade total de isolados bacterianos obtidos foi de 182, sendo 74 para *O. luizotavioi*, 18 para *O. tripui* e 22 para *V. uranoscopa*, 16 para *L. labyrinthicus*, 14 para *R. marina* e 38 para *R. schneideri* (Tabela 1).

Tabela 1: Lista de espécies amostradas na EET e no JBB, quantidade de indivíduos capturados e de isolados correspondentes a cada espécie.

Localidade.	Espécie	Indivíduos	Isolados
EET	<i>O. luizotavioi</i>	3	74
	<i>O. tripui</i>	3	18
	<i>V. uranoscopa</i>	3	22
JBB	<i>L. labyrinthicus</i>	3	16
	<i>R. marina</i>	3	14
	<i>R. schneideri</i>	3	38

Para análise da hipótese 2, as espécies *I. izecksohni*, *O. luizotavioi*, *O. tripui* e *V. uranoscopa* foram amostradas do córrego Tripuí da EET, ocupando diferentemente o ambiente, quanto ao uso de substratos e quanto a estratificação vertical (Tabela 2). *Ololygon luizotavioi* e *O. tripui* foram encontradas mais próximas ao curso d'água. A primeira permanecendo a maior parte do tempo sobre pedras dentro d'água e sobre raízes e folhas da vegetação baixa, frequentemente em contato com a água. A segunda espécie foi também avistada sobre raízes, folhas, troncos e cipós, acima do nível d'água (Tabela 2). Já *I. izecksohni* e *V. uranoscopa* foram observadas mais distantes do curso d'água na vegetação marginal. Os machos adultos de *V. uranoscopa* foram observados vocalizando em alturas superiores a 1 metro do nível da água em folhas de árvores sobre o curso d'água e voltadas para ele. Os machos adultos de *I. izecksohni* foram registrados vocalizando no interior da mata marginal do córrego (Tabela 2).

Tabela 2: Lista de espécies amostradas, microambiente, quantidade de indivíduos capturados e quantidade de isolados correspondentes a cada espécie.

Espécie	Microambiente	Indivíduos	Isolados
<i>I. izecksohni</i>	Vegetação arbustiva e serapilheira	3	35
<i>O. luizotavioi</i>	Pedras e raízes de arbustos na margem do córrego, frequentemente submersos	3	74
<i>O. tripui</i>	Raízes, folhas e troncos à margem do córrego	3	18
<i>V. uranoscopa</i>	Vegetação arbórea	3	22

Coleta da microbiota

As visitas à área de estudo para coleta de dados ocorreram entre fevereiro e setembro de 2016 e a captura dos anfíbios anuros foi realizada mediante busca ativa noturna. Os indivíduos capturados foram marcados por meio do uso de implante visível de elastômero ou VIFE – Visible Implant Fluorescent Elastomer (Northwest Marine Technology – NMT). Método que consiste na injeção subcutânea de polímero colorido fluorescente em diferentes locais do corpo para cada indivíduo, criando marcas únicas que podem ser vistas externamente. O elastômero é biocompatível assim, não causa rejeição por parte dos animais (Hoffmann *et al.*, 2008). O material é preparado na forma de um líquido espesso que se transforma em um sólido maleável após a injeção com seringa hipodérmica. A marcação foi empregada para evitar que um mesmo animal fosse capturado mais de uma vez.

A microbiota cutânea foi coletada em campo, logo após a captura dos animais com o auxílio de um SWAB (hastes com extremidades de algodão estéril). O swab foi passado em toda a extensão do dorso, ventre e região lateral, exceto cabeça e região gular do animal, sendo em seguida condicionado em recipiente exclusivo. Para procedimento, a pesquisadora utilizou luvas e materiais estéreis que foram devidamente descartadas após o manuseio de cada indivíduo.

Cultivo de bactérias

Para o cultivo de bactérias utilizou-se meio Luria-Bertani (LB) sólido e líquido produzidos em laboratório. O meio LB sólido é composto de reagentes que permitem o crescimento bacteriano (Bacto-tryptone (peptona), Bacto-yeast extract (extrato de levedura) e NaCl) de água destilada, de Ágar para solidificação do meio e Viper reagente que inibe o crescimento de fungos.

O meio LB líquido é composto pelos mesmos reagentes do sólido, exceto o Viper e o Ágar. Ambos os meios são autoclavados após sua produção para garantir que estejam estéreis. O meio LB foi escolhido por ser um meio rico e possibilitar o crescimento de uma maior riqueza de bactérias (Bertani, 1951).

Cada swab impregnado com a comunidade microbiana obtida a partir de um único indivíduo foi depositado em um tubo falcon de 15 mL esterilizado contendo 3 mL de meio LB líquido, o qual, foi agitado durante 20 segundos para que a maior parte das células presas no cotonete passasse para a solução, além de garantir a homogeneização. A partir dessa primeira amostra denominada extrato bruto, foi transferido 1 mL para um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL. Em seguida, colocou-se 0,9 mL de meio LB líquido em outros tubos tipo eppendorfs de igual volume de capacidade (1,5 mL) e com o auxílio de uma pipeta com ponteira estéril, transferiu-se 100 µL do primeiro tubo para o segundo, correspondendo à diluição 10^{-1} , e do segundo tubo para o terceiro, correspondendo à diluição 10^{-2} , e assim por diante até a diluição 10^{-8} .

Todas estas diluições do lavado bacteriano foram aplicadas (100 uL) e espalhados em placas de Petri individuais contendo meio LB sólido, e mantidas em temperatura de 28°C por 4 dias. Após este período as placas foram observadas quanto ao número de colônias crescidas que pudessem ser isoladas em outra placa de cultivo. A diluição 10^{-8} foi escolhida para o cultivo em placa depois de experimentos pilotos, nos quais, verificou-se que essa diluição permitia o melhor isolamento de bactérias. Isto porque a partir de tubos com menores fatores de diluição foi impossível isolar as bactérias em detrimento do elevado número de colônias bacterianas sobrepostas após o período de cultivo.

Todos esses procedimentos foram realizados dentro da capela de fluxo esterilizado com luz UV ligada durante 15 minutos e próximo a uma chama de gás, seguindo os procedimentos padrões de esterilidade.

Isolamento de bactérias

O isolamento de bactérias foi realizado através dos diferentes morfotipos que foram transferidos obtidos após taxa de crescimento por 4 dias. Para isso palitos de dentes autoclavados foram utilizados, sendo padronizado o uso de palito para cada morfotipo a ser transferido. Após a seleção do morfotipo, a colônia foi espetada com o palito e em seguida estricada em placas de Petri com meio LB sólido divididas em quadrantes virtuais. Para cada quadrante foi inoculado um morfotipo de bactéria, restando um quadrante sem inoculação como sendo o controle negativo de crescimento. Denominam-se morfotipos as colônias com as mesmas características morfológicas.

Para caracterização dos morfotipos foram utilizadas variáveis como: cor, borda, tamanho, brilho, superfície (lisa ou rugosa) e outros aspectos que chamaram atenção. Após o isolamento, as placas foram incubadas por 48hrs a 28°C para o crescimento dos isolados que em seguida foram preservados.

Preservação dos isolados

Após isolamento, cada isolado foi transferido para um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL previamente identificado contendo meio LB líquido, mediante auxílio de um palito de dente autoclavado (um palito por isolado). Os tubos foram então incubados por 48 h a 28°C para o crescimento dos isolados. Um tubo tipo eppendorf nas mesmas condições das anteriores foi incubado contendo somente meio LB líquido (sem isolados), o qual foi denominado controle negativo para certificar que o meio estava estéril em cada etapa de preservação dos isolados. Após o crescimento dos isolados foi acrescido 0,5mL de glicerol 50% em cada tubo para que os isolados fossem preservados congelados.

Transferência para placa de 96 poços

Os isolados bacterianos previamente identificados e preservados foram transferidos para uma placa de 96 poços contendo 100 µL de meio LB líquido em cada poço. Cada isolado foi colocado em um poço. A placa foi Incubada por 48 h a 28°C para o crescimento dos isolados. Nessa placa, dois poços foram preenchidos apenas com meio líquido, sem nenhum isolado, representando o controle negativo para o teste. Ou seja, nas devidas posições destes poços não haverá crescimento e dois poços são preenchidos com um isolado que apresenta crescimento comprovado nas condições dos testes, representando o controle positivo.

Para cada placa os 96 poços são mapeados, de modo a permitir a identificação inequívoca do isolado que se encontra em cada poço, bem como a localização dos controles negativos e positivos.

Ensaio de resistência ao arsênio

Para análise da resistência ao arsênio, foram utilizadas placas de Petri com meio LB sólido em diferentes concentrações de As 3+ (1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM e 20 mM), além da placa controle contendo somente meio LB sólido.

Com o auxílio do replicador, os isolados presentes na placa de 96 poços foram transferidos para placas de Petri identificadas com as diferentes concentrações de arsenito e incubados a 28°C, fazendo uso de um multireplicador de 96 pontas.

Registros fotográficos foram realizados em intervalos de 48hrs ao longo de 12 dias para acompanhar o crescimento dos isolados. A resistência é comprovada pelo crescimento da colônia em cada concentração.

Análises comparativas

A partir dos resultados derivados dos ensaios de resistência foi realizada a análise dos isolados objetivando responder às perguntas formuladas nas

hipóteses que culminaram no desenvolvimento deste projeto, bem como uma análise estatística através do qui-quadrado.

Resultados

Ensaio de resistência à arsênio

Análise entre área contaminada (EET) e área não contaminada (JBB)

Os isolados bacterianos referentes as espécies amostradas na EET apresentaram resistência em pelo menos 3 diferentes concentrações de arsênio, sendo 71,05% dos isolados resistentes a 1mM, 47,36% dos isolados resistentes a 5mM e 21,92% dos isolados resistentes a 10 mM de As 3+. Não houve resistência de nenhum isolado nas concentrações de 15 mM e 20 mM de As 3+ (Figura 6).

Por outro lado, o conjunto dos isolados bacterianos referentes as espécies amostradas do JBB apresentaram resistência a somente 2 concentrações de As 3+, com porcentagem de resistência inferior aos mesmos ensaios com isolados da EET. Destes, 38,23% foram resistentes a 1mM e 13,25% dos isolados resistentes a 5mM de As 3+. Não houve resistência de nenhum dos isolados nas concentrações de 10mM, 15mM e 20mM de As 3+ (Figura 6).

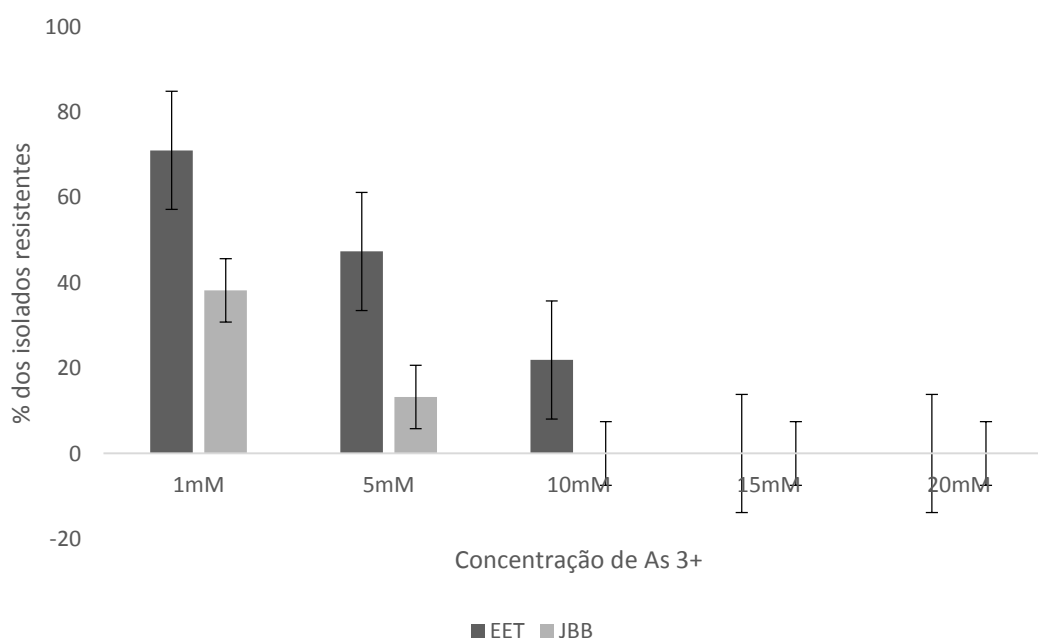


Figura 6: Porcentagem de isolados resistentes as diferentes concentrações em cada área de estudo, EET e JBB.

A análise estatística através do chi-quadrado demonstrou uma diferença significativa entre as áreas para as concentrações de 1mM, 5mM e 10mM (Tabela 3).

Tabela 3: Dados gerados a partir do teste qui-quadrado para análise entre as áreas de estudo. Condição – concentrações de arsênio, df – graus de liberdade e p-value – valor de p.

Condição	df	p-value
1mM	1	0.001493
5mM	1	1.179e-05
10mM	1	2.843e-06

Células cinzas: valores que apresentaram diferença significativa.

A comparação da curva de crescimento dos isolados entre as duas áreas de estudo apresentou diferença no intervalo de crescimento dos isolados. Isolados resistentes a arsênio amostrados a partir de indivíduos da EET apresentavam crescimento a partir de 48 h nas concentrações de 1 mM e 5 mM e em 96 h na concentração de 10mM de As 3+ (Tabela 4). Em contrapartida, os isolados obtidos a partir de indivíduos do JBB apresentaram crescimento na concentração de 1mM a partir de 96 h e apenas a partir de 144 h, para a concentração de 5mM de As 3+ (Tabela 4).

Tabela 3: Tabela do crescimento dos isolados de cada espécie em intervalos

Espécie	Condição	Tempo de crescimento					
		48hrs	96hrs	144hrs	192hrs	240hrs	288hrs
<i>Ololygon luizotavioi</i>	C	74	74	74	74	74	74
	1mM	51	51	51	51	51	51
	5mM	26	39	39	41	41	41
	10mM	0	5	24	24	25	25
<i>Ololygon tripui</i>	C	18	18	18	18	18	18
	1mM	12	13	13	13	13	13
	5mM	5	5	5	5	5	5
	10mM	0	0	0	0	0	0
<i>Vitreorana uranoscopa</i>	C	22	22	22	22	22	22
	1mM	15	17	17	17	17	17
	5mM	6	6	8	8	8	8
	10mM	0	0	0	0	0	0
<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	C	16	16	16	16	16	16
	1mM	0	2	5	6	6	6
	5mM	0	0	0	5	5	5
	10mM	0	0	0	0	0	0
<i>Rhinella marina</i>	C	14	14	14	14	14	14
	1mM	0	1	6	7	7	7
	5mM	0	0	0	1	1	1
	10mM	0	0	0	0	0	0
<i>Rhinella schneideri</i>	C	38	38	38	38	38	38
	1mM	0	6	10	13	13	13
	5mM	0	0	1	3	3	3
	10mM	0	0	0	0	0	0

de 48 horas.

Célula cinza - início do crescimento dos isolados nas condições investigadas.

Preto – nulidade de crescimento independentemente do tempo de crescimento.

Análise entre microambientes

Os isolados obtidos a partir das espécies *I. izecksohni*, *O. tripuí* e *V. uranoscopa* apresentaram resistência a 1 mM e 5 mM de As 3+. Por outro lado, os isolados obtidos a partir *O. luizotavioi* foram resistentes a 1 mM, 5 mM e 10 mM de As 3+. Não houve crescimento nas concentrações de 15 mM e 20 mM de As 3+ (Tabela 5).

Tabela 4: Número de isolados correspondentes a cada espécie e resistência destes às diferentes concentrações de As 3+.

Espécie	Isolados	1mM	5mM	10mM	15mM	20Mm
<i>I. izecksohni</i>	35	28	12	0	0	0
<i>Ololygon luizotavioi</i>	74	51	41	25	0	0
<i>Ololygon tripuí</i>	18	13	5	0	0	0
<i>Vitreorana uranoscopa</i>	22	17	8	0	0	0

Foi encontrado na análise entre isolados de anfíbios com maior contato com a água (*O. luizotavioi* e *O. tripuí*) e isolados de anfíbios com menor contato com a água (*I. izecksohni* e *V. uranoscopa*), uma porcentagem próxima de isolados resistentes às concentrações de 1mM e 5mM de As 3+. Contudo, na concentração de 10mM de As 3+, somente os isolados de indivíduos da espécie *O. luizotavioi* apresentaram resistência, justamente a espécie com maior contato com a água nos microambientes analisados (Figura 7),

Anuros com maior contato com a água (*O. luizotavioi*, *O. tripuí*) apresentaram 69,56% de isolados resistentes a 1 mM, 50% de isolados resistentes a 5 mM e 27,17% de isolados resistentes a 10 mM de As 3+. Já anuros com menor contato com a água (*I. izecksohni* e *V. uranoscopa*) apresentaram 78,94% de isolados resistentes a 1mM e 35,08% de isolados resistentes a 5mM de As 3+ (Figura 7).

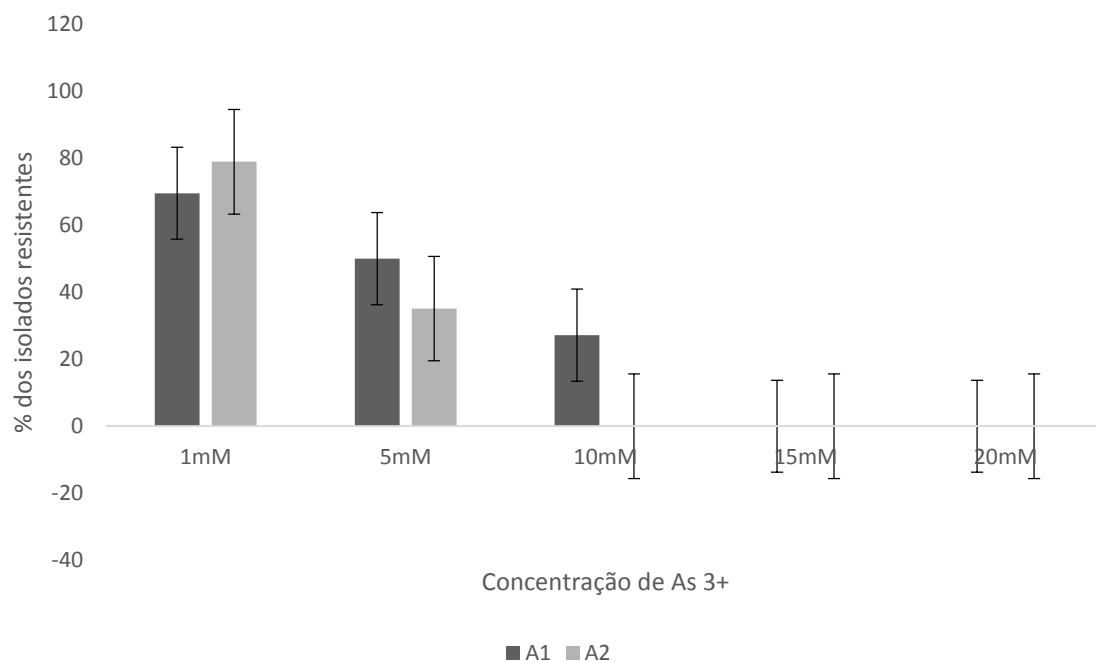


Figura 7: Resistência dos isolados entre espécies que ocupavam microambientes com maior contato com a água (A1) e espécies que ocupavam microambientes com menor contato com a água (A2). A1 - *Ololygon luizotavioi*, *Ololygon tripui*, A2- *Ischnocnema izecksohni* *Vitreorana uranoscopa*.

A análise estatística através do qui-quadrado demonstrou uma diferença significativa apenas na concentração de 10Mm entre anfíbios com maior e menor contato com a água, já as análises das concentrações de 5mM e 10Mm não apresentaram diferença significativa (Tabela 6).

Tabela 7: Dados gerados a partir do teste chi-quadrado para análise entre os microambientes. Condição – concentrações de arsênio, df – graus de liberdade e p-value – demonstrando a significância das análises

Condição	df	p-value
1mM	1	0.4415
5mM	1	0.1058
10mM	1	1.863e-07

Célula cinza: apresentou valor significativo.

Discussão

Relação ambiente x composição da microbiota

Embora não tenham sido amostradas as mesmas espécies nas duas localidades investigadas (EET e JBB), os resultados referentes as análises de resistência dos isolados amostrados indicaram que o ambiente se perfila como componente fundamental na determinação dos perfis da comunidade microbiana presente na pele de anfíbios anuros, assim como proposto por diversos estudos (Culp *et al.*, 2007, Pelczar & Reid, 1981, Madigan *et al.*, 2004). Isto corrobora nossa hipótese 1, estabelecida no início dos trabalhos.

Os isolados referentes a anfíbios coletados na EET, região contaminada por arsênio, apresentaram maior porcentagem de resistência e intervalos de crescimento menores quando comparados a isolados de anfíbios capturados no JBB, região controle livre de contaminação por arsênio. Esses resultados sugerem que a alta concentração de arsênio atua como pressão do ambiente na seleção de bactérias resistentes a toxicidade induzida por este metal. Desta forma, a alta concentração de arsênio, ao longo do tempo, deve ter determinado a seleção de bactérias resistentes a este metal capazes de colonizar o substrato cutâneo dos anfíbios, o que poderia explicar a sobrevivência destas espécies vertebradas em condições hostis quanto a presença destes metais.

Assim como os resultados do presente estudo que demonstram uma diferença na microbiota de anfíbios coletados em ambientes com características variadas, Assis (2011) encontrou mudanças entre a microbiota de anuros coletados em paisagens conservadas e fragmentadas e associou a diferença nos perfis bacterianos as alterações nas características entre esses ambientes. Dados estes que corroboram nossos achados.

Num contexto de ciência aplicada, tem sido amplamente demonstrado que os microrganismos resistentes à arsênio podem possuir mecanismos de detoxificação deste elemento (Ahmann *et al.*, 1994). Dessa forma, pode-se sugerir que a maior resistência ao contaminante pelos isolados provenientes de anfíbios capturados na EET possa estar associada a mecanismos moleculares elaborados que permitiram sobrevivência desses animais em ambientes como

o QF. Em outras palavras, é possível que a ocorrência da diversidade de anuros no Quadrilátero Ferrífero esteja relacionada a associação simbiótica com a microbiota, provavelmente fruto de um processo coevolutivo entre as espécies associadas.

Levando em conta o interesse destes organismos resistentes ao arsênio, tais organismos apresentam grande potencial biotecnológico. Inúmeros estudos investigam a utilização de bactérias como biorremediadoras em locais contaminados por arsênio (Guedes, 2011). Assim, as bactérias amostradas no presente estudo detêm potencial biotecnológico por apresentarem resistência a concentrações elevadas de As 3+, embora os mecanismos não sejam ainda conhecidos, uma vez que é notório o negligenciamento em estudos científicos envolvendo tais associações nos campos rupestres ferruginosos

Em um recente trabalho, Felestrino *et al.*, (2017) demonstrou exatamente estes potenciais estudando bactérias associadas a plantas holoparasitas da região do QF. Deixando evidente a importância de se estudar o local e as espécies que ali sobrevivem. Nosso trabalho corrobora estes apresentados por Felestrino, porém pela primeira vez relacionando a importância e potencial de bactérias associados a espécies animais do QF.

Microambiente x resistência à arsênio

Embora ocupassem microambientes distintos, os resultados de resistência dos isolados submetidos à concentrações de 1 e 5mM de As 3+ foram similares entre as quatro espécies de anuros capturadas na EET, esse dado sugere que a semelhança de resistência entre os isolados seja devido à similaridade na composição microbiana dessas espécies. Como partilham o mesmo ambiente e sendo a microbiota de alguns anfíbios composta por bactérias do ambiente (Culp *et al.*, 2007) podem apresentar entidades microbianas típicas entre elas. Culp *et al.*, (2007) encontraram entidades microbianas típicas de ambientes como componentes da microbiota cutânea de espécies de anfíbios, corroborando nossos resultados

No entanto, *Ololygon luizotavioi* foi a única espécie da qual foram amostrados isolados resistentes a 10mM de As 3+. Levando em conta que estudos mostraram que fontes de água corrente tendem a ter maior

concentração de arsênio em ambientes naturalmente contaminados (Costa *et al.*, 2015), decorrente de processos lixiviatórios, os resultados encontrados podem estar associados ao fato de os indivíduos de *O. luizotavioi* terem comportamento mais dependente do contato com a água. Logo, essa espécie deveria depender ainda mais de uma microbiota resistente, já que os indivíduos estão constantemente em contato com o estrato que apresenta maior teor de contaminação.

Para além disso, foi obtido maior número de isolados para *O. luizotavioi*, enquanto que as demais espécies apresentaram valores similares de isolados resistentes nas concentrações investigadas. Essa diferença entre as espécies pode ser explicada por fatores fisiológicos da pele e também pela história natural das espécies (Assis, 2011).

Em relação a estes fatores fisiológicos, existem diferenças interespecíficas relacionadas às secreções cutâneas das glândulas dérmicas dos anuros (Conlon *et al.*, 2004; Conlon *et al.*, 2007). Essa diferença é referente as moléculas componentes que podem funcionar como moléculas bioativas produzindo efeito antimicrobiano contra algumas espécies de bactérias (Rollins-Smith *et al.*, 2002). É razoável inferir, portanto, que as espécies de anuros que tenham como principal barreira de proteção as moléculas bioativas secretadas na pele terão uma menor quantidade de bactérias na pele, como previamente estabelecido por Assis, 2011. O fator história natural das espécies também pode ser um modulador da quantidade de bactérias residentes na pele dos anfíbios anuros (Assis, 2011). Como *O. luizotavioi* mantém constante contato com a água (Lourenço *et al.*, 2009a) está sujeita a um amplo mosaico de comunidades microbianas, quando comparado as demais espécies.

Conclusões

- Fatores associados ao ambiente e à história natural são determinantes na modulação da microbiota cutânea em anfíbios anuros, isso foi corroborado neste estudo com base na elevada resistência a metal pesado dos isolados obtidos a partir da pele dos anfíbios da EET.
- Esta resistência à arsênio dos isolados associados a espécies de anuros da EET podem modular a sobrevivência do vertebrado frente a exposição ao metal arsênio
- *Ololygon luizotavioi*, representando uma espécie que desenvolve suas atividades reprodutivas com seu corpo parcialmente submerso, foi a única espécie que apresentou isolados resistentes a 10 mM de As 3+, além de um maior número de isolados resistentes a este metal, o que pode ter direta relação aos altos níveis de contaminação da água do córrego.
- A microbiota cutânea resistente ao arsênio pode ter coevoluído com os anuros da EET permitindo a ocupação destes vertebrados nestas regiões contaminadas por este metal pesado.
- A resistência à As 3+ comprovada de bactérias isoladas da pele de anfíbios anuros demonstra um potencial biotecnológico negligenciado com possível uso para biorremediação e deve ser melhor estudado, caracterizando-se como um potencial hotspot de bioprospecção.

Perspectivas

Após todos esses resultados estabeleceu-se a meta de realizar outras análises tais como resistência a ferro e manganês com todos os isolados a fim de caracterizar a resistência à outros metais presentes na área de estudo, visando a publicação de um artigo. Isto porque, além do arsênio a região do QF apresenta elevadas concentrações destes outros metais.

Como prerrogativa de uma investigação em nível de mestrado, este projeto foi a base de elaboração de uma proposta de doutorado que será desenvolvida pela mesma autora do presente estudo dando continuidade à pesquisa. A proposta é obter em regiões fora do QF (não contaminadas por metais pesados), espécies iguais as capturadas no QF durante este trabalho, tendo como objetivos: 1) comparar a microbiota cutânea de espécies de anuros encontradas em dois ambientes distintos quanto a contaminação por arsênio (contaminado e não contaminado), bem como analisar se a microbiota auxilia na sobrevivência dessas espécies em locais contaminados por arsênio, 2) Estabelecer análise mediada por genômica comparativa de alguns destes isolados bacterianos resistentes à arsênio, 3) Analisar o potencial antagônico destes isolados bacterianos contra o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), e 4) Estabelecer análise de proteômica comparativa de uma das espécies bacterianas antagônica a Bd e buscar (se possível) a purificação/identificação das moléculas com esta ação inibitória.

Numa perspectiva pessoal este projeto foi de extrema importância para meu crescimento profissional e individual, pois cada etapa possibilitou o aprendizado em áreas que até então não possuía domínio, além de proporcionar uma interação entre laboratórios distintos com o propósito de somar nos resultados da pesquisa.

Referências

Agostinho, C. A., Foresti, F., Lima, S. L., & Jim, J. (2013). Reproduction and population size of *Leptodactylus labyrinthicus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Russian Journal of Herpetology*, 9(1), 15-20.

Ahmann, D., Roberts, A. L., Krumholz, L. R., & Morel, F. M. (1994). Microbe grows by reducing arsenic. *Nature*, 371(6500), 750.

Álvares, C. A., Stape, J. L., Sentelhas, P. C., Gonçalves, J. L. M., & Sparovek, G. (2013). Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22, 711-728.

Araújo, C. O., Condez, T.H., & Haddad, C. F. B. (2007). Amphibia, Anura, *Barycholos ternetzi*, *Chaunus rubescens*, and *Scinax canastrensis*: distribution extension, new state record. *Check List* 3,153-155.

Assis, A. B. (2011). Análise sobre a microbiota cutânea de anfíbios em fragmentos de floresta atlântica e sua eficácia contra agentes patogênicos. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 104p.

Azevedo, L. G., Ribeiro, J. R., Schiavini, I., & Oliveira, P. E. A. M. (1990). Levantamento da vegetação do Jardim Botânico de Brasília, DF. Fundação Zoobotânica do Distrito Federal, Brasília. 93p.

Baker, M. D., Inniss, W. E., Mayfield, C. I., Wong, P. T. S., & Chau, Y. K. (1983). Effect of pH on the methylation of mercury and arsenic by sediment microorganisms. *Environmental Technology*, 4(2), 89-100.

Barra, C. M., Santelli, R. E., Abrão, J. J., & Guardia, M. D. L. (2000). Arsenic speciation-A review. *Química Nova*, 23(1), 58-70.

Bertani, G. (1951). Studies on Lysogenesis I.: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62(3), 293–300.

Bertin, P. N., Heinrich-Salmeron, A., Pelletier, E., Goulhen-Chollet, F., Arsène-Ploetze, F., Gallien, S., & Bonnefoy, V. (2011). Metabolic diversity

among main microorganisms inside an arsenic-rich ecosystem revealed by meta-and proteo-genomics. *The ISME journal*, 5(11), 1735-1747.

Borba, R. P. (2002). Arsênio em ambiente superficial: processos geoquímicos naturais e antropogênico em uma área de mineração aurífera. Tese de doutorado, Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, 202p.

Borba, R.P., & Figueiredo, B. R. (2004). A influência das condições geoquímicas na oxidação da arsenopirita e na mobilidade do arsênio em ambientes superficiais tropicais. *Rev Bras Geociências* 34:489–500.

Caramaschi, U. & Kisteumacher, G. (1989). Duas novas espécies de *Oloolygon Fitzinger*, 1843, do Sudeste do Brasil (Amphibia, Anura, Hylidae). *Boletim do Museu Nacional, Nova Série, Zoologia*, 327:1-15.

Cervantes, C., Ji, G., Ramírez, J. L., & Silver, S. (1994). Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiology reviews*, 15(4), 355-367.

Conlon, J. M., Al-dhaheeri, A., Al-mutawa, E., Al-kharrge, R., Ahmed, E., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Nielsen, P. F., & Davidson, C. (2007). Peptide defenses of the Cascades frog *Rana cascadae*: implications for the evolutionary history of frogs of the *Amerana* species group. *Peptides*, 28(6), 1268-1274.

Conlon, J. M., Kolodziejek, J., & Nowotny, N. (2004). Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1696(1), 1-14.

Costa, R. D. V. F. D., Leite, M. G. P., Mendonça, F. P. C., & Nalini JR, H. A. (2015). Geochemical mapping of arsenic in surface waters and stream sediments of the Quadrilátero Ferrífero, Brazil. *Rem: Revista Escola de Minas*, 68(1), 43-51.

Cruz, L. V. (2002). Avaliação Geoquímica Ambiental da Estação Ecológica do Tripuí e Adjacências, Sudeste do Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais. Dissertação de Mestrado, Departamento de Geologia, Universidade Federal de Ouro Preto, 147p.

Culp, C. E., Falkinham, J. O., & Belden, L. K (2007). Identification of the natural bacterial microflora on the skin of eastern newts, bullfrog tadpoles, and redback salamanders. *Herpetologica*, 63:66–71.

Cunha, A. K., Oliveira, I. S. D., Hartmann, M. T. (2010): Anurofauna da Colônia Castelhanos, na Área de Proteção Ambiental de Guaratuba, Serra do Mar paranaense, Brasil. *Biotemas*, 23(2): 123–134.

Dembitsky, V. M., & Rekanza, T. (2003). Natural Occurrence of Arseno Compounds in Plants, Lichens, Fungi, Algal Species, and Microorganismos. *Plant Science*, 165, 1177-1192.

Drummond, G. M., Martins, C. S., Machado, A. B. M., Sebaio, F. A., Antonini, Y. (2005) Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para a sua conservação. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas. 222p.

Duellman, W. E. Marion, A. B., & Blair, H. S. (2016). Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa*, 4104 (1), 001–109.

Duellman, W. E., & Trueb, L. (1986). Biology of amphibians. McGraw-Hill Publishing Company, New York. 670p.

Eterovick, P. C., Carnaval, A. C. O. Q., Borges-nojosa, D. M., Silvano, D. L., Segalla, M. V., & Sazima, I. (2005). Amphibian declines in Brazil: an overview. *Biotropica* 37(2): 166-179.

Faivovich, J. (2002). A cladistic analysis of Scinax (Anura: Hylidae). *Cladistics*, 18(4), 367-393.

Felestrino, É. B., Santiago, I. F., Freitas, L. S., Rosa, L. H., Ribeiro, S. P., & Moreira, L. M. (2017) Plant Growth Promoting Bacteria Associated with *Langsdorffia hypogaea*-Rhizosphere-Host Biological Interface: A Neglected Model of Bacterial Prospection. *Frontiers in Microbiology*, 8, 172.

França, L., Facure, K., & Giaretta, A. (2004). Trophic and spatial niches of two large-sized species of *Leptodactylus* (Anura) in southeastern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 39(3), 243-248.

Frost, D. R. (1985). Amphibian species of the world. 732p.

Fundação Estadual do Meio Ambiente - FEAM. 1995. Plano de manejo da Estação Ecológica do Tripuí - Ouro Preto - M.G. Brasil.

Giller, K. E., Witter, E., & Mcgrath, S. P. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(10), 1389-1414.

Guedes, K. A. (2011) Prospecção de bactérias com potencial aplicação na biorremediação de efluentes industriais contendo arsênio. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, 102p.

Hacioglu, N., & Tosunoglu, M. (2014). Determination of antimicrobial and heavy metal resistance profiles of some bacteria isolated from aquatic amphibian and reptile species. *Environmental monitoring and assessment*, 186(1), 407-413.

Haddad, C. F. B., & Prado, C. P. A. (2005). Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience*, 55(3), 207-217.

Harris, R. N., Brucker, R. M., Walke, J. B., Becker, M. H., Schwantes, C. R., Flaherty, D. C., Lam, B. A., Woodhams, D. C., Briggs, C. J., Vredenburg V. T., & Minbiole, K. P. C. (2009) Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. *The ISME Journal*, 3, 818–824.

Harris, R. N., James, T.Y., Lauer, A., Simon, M.A., & Patel, A. (2006). Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. *EcoHealth*, 3, 53-56.

Hedges, S. B., Duellman, W.E., & Heinicke, M.P. (2008). NewWorld direct-developing frogs (Anura: Terrarana): molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa*, 1737:1-182.

Heyer, W. R. (1985). Taxonomic and natural history notes on frogs of the genus *Centrolenella* (Amphibia: Centrolenidae) from southeastern Brasil and adjacent Argentina. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 36(1): 1-21.

Hoffmann, K., Mcgarrity, M. E., & Johnson, S. A. (2008). Technology meets tradition: a combined VIE-C technique for individually marking anurans. *Applied Herpetology*, 5(3), 265-280.

International Union for Conservation of Nature – IUCN. Redlist 2011. Acessado em fevereiro de 2017.

Izecksohn, E., & Carvalho-e-Silva, S.P.D. (2001). Anfíbios da Floresta Nacional Mário Xavier, município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro, Brasil (Amphibia: Anura). *Contribuições Avulsas Sobre a História Natural do Brasil*, 39: 1–3.

Jacobi, C.M., Carmo, F. F., Carmo, F. F., & Campos, I. C. (2015). Iron geosystems: priority areas for conservation in Brazil. In: Tibbett, M. (Org.). *Mining in Ecologically Sensitive Landscapes*. 1ed. University of Western Australia: CSCIRO.

Jani, A. J., & Briggs, C. J. (2014). The pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* disturbs the frog skin microbiome during a natural epidemic and experimental infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(47).

Leite, F. S. F., Juncá, F.A., & Eterovick, P.C. (2008). Status do conhecimento, endemismo e conservação de anfíbios anuros da Serra do Espinhaço, Brasil. *Megadiversidade*, 4(2): 158-176.

Léonard, A., & Lauwerys, R. R. (1980). Carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity of arsenic. *Mutation Research*, 75: 49-62.

Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2008). Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 776-788.

Lomax, C., Liu, W. J., Wu, L., Xue, K., Xiong, J., Zhou, J., & Zhao, F. J. (2012). Methylated arsenic species in plants originate from soil microorganisms. *New Phytologist*, 193(3), 665-672.

Lourenço, A. C. C., Baêta, D. V., Monteiro, S., & Pires, M. R. S. (2009a.) O canto de anúncio de *Scinax luizotavioi* (Caramaschi & Kisteumacher, 1989) (Anura, Hylidae). *Arquivos do Museu Nacional*, 67(1-2), 73-79.

Lourenço, A. C. C., Nascimento, L. B. & Pires, M. R. S. (2009b). A new species of the *Scinax catharinae* species group (Anura: Hylidae) from Minas Gerais, southeastern Brazil. *Herpetologica*, 65, 468–479.

Lucas, E. M., & Fortes, V. B. (2008). Frog diversity in the Floresta Nacional de Chapecó, Atlantic Forest of southern Brazil. *Biota Neotropica* 8(3): 51-61.

Machado, I. F., Moreira, L. F. B., Silva, R. B., Becker, R. G., & Mesquita, A. S. O. (2010). Amphibia, Anura, Centrolenidae, *Vitreorana uranoscopa* (Müller, 1924): Distribution extension in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Check List*, 6(3): 409-411.

Maciel, N.M. (2008). Sistemática e Biogeografia do grupo *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) (Anura: Bufonidae). Tese de doutorado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 182p.

Madigan, M. T., Martinko, J.M. e Parker, J. (2004). *Microbiologia de Brock*. São Paulo: Prentice Hall, 10ª Ed. 624p.

Magalhães, A. C. F. (2015). Composição, distribuição espacial e sazonal da anurofauna de córrego e lagoa em uma região montana no sudeste do Brasil. Dissertação, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, 67p.

Ministério da Saúde – MS. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011

Ministério do Meio Ambiente – MMA. Portaria nº 357, de 17 de março de 2005.

Ministério do Meio Ambiente – MMA. Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014.

Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Fonseca G. A., & KENT, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.

Parra, R. R. (2006). Análise geoquímica de água e de sedimentos afetados por minerações na bacia hidrográfica do rio Conceição, Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais – Brasil. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, 113p.

Pedralli, G., Teixeira, M. D. C., Freitas, V. D. O., Meyer, S. T., & Nunes, Y. R. F. (2000). Florística e fitossociologia da Estação Ecológica do Tripuí, Ouro Preto, MG. *Ciências Agrotécnicas*, 24, 103-136.

Pelczar, M., & Reid, R. (1981) *Microbiologia Vol II*. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil. 517p.

Pimenta, B. V. S., Faivovich, J., & Pombal, J. P. JR. (2007) On the identity of *Hyla strigilata* Spix, 1824 (Anura: Hylidae): redescription and neotype designation for a “ghost” taxon. *Zootaxa*, 1441, 35–49.

Pombal JR., Carvalho JR, J. P., Canelas, M.A.S. & Bastos, R.P. (2010). A new *Scinax* of the *S. catharinae* species group from central Brazil (Amphibia, Anura, Hylidae). *Zoologia*, 27, 795–802.

Pombal JR., J.P., & Bastos, R.P. (1996) Nova espécie de *Scinax* Wagler, 1830 do Brasil Central (Amphibia, Anura, Hylidae). *Boletim do Museu Nacional, Nova Série, Zoologia*, 371, 1–11.

Rawls, J. F., Samuel, B. S., & Gordon, J. I. (2004). Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(13), 4596-4601.

Rollins-smith, L. A., Carey, C., Longcore, J., Doersam, J. K., Boutte, A., Bruzgal, J. E., & Conlon, J. M. (2002). Activity of antimicrobial skin peptides from ranid frogs against *Batrachochytrium dendrobatidis*, the chytrid fungus associated with global amphibian declines. *Developmental & Comparative Immunology*, 26(5), 471-479.

Rosen, B. P. (2002). Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Letters*, 2; 529 (1):8692.

Salles, A. E. H. (2007). Jardim Botânico de Brasília: diversidade e conservação. *Sociedade Amigos do Jardim Botânico de Brasília*, 355p.

Santos, E. C. O., Jesus, I. M., Brabo, E. S., Fayal, K. F., Sá Filho, G. C., & Lima, M. O. (2003). Exposição ao mercúrio e ao arsênio em Estados da Amazônia: síntese dos estudos do Instituto Evandro Chagas/FUNASA. *Rev Bras Epidemiol*, 6(2):171-85.

Silva, W. R. DA, Giaretta, A. A., & Facure, K. G. (2005). On the natural history of the South America pepper frog, *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824) (Anura: Leptodactylidae). *J. Nat. Hist*, 39(7):555-566.

Stetson, R.E. (2001). Distribución geográfica de *Hyalinobatrachium uranoscopum* (Ruiz Carranza & Lynch, 1993) (Anura: Centrolenidae). Geographical distribution of *Hyalinobatrachium uranoscopum* (Ruiz Carranza & Lynch, 1993) (Anura: Centrolenidae). *Cuadernos de Herpetología*, 14(1): 167.

Taucce, P. P., Leite, F. S., Santos, P. S., Feio, R. N., & Garcia, P. C. (2012). The advertisement call, color patterns and distribution of *Ischnocnema izecksohni* (Caramaschi and Kisteumacher, 1989) (Anura, Brachycephalidae). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 52 (9), 112-120.

Wang, S., & Zhao, X. (2009). On potential of biological treatment for arsenic contaminated soils and groundwater. *Journal Environmental Manage*, 90(8):2367-76.

Woodhams, D. C., Vredenburg, V. T., Simon, M. A., Bilheimer, D. B., Shakhtour, B. S., Shyr, Y., Briggs, C. J., Rollins-Smith, L. A. e Harris, R.N. (2007). Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana mucosa*. *Biological Conservation*, 138, 390-398.

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415, 389-395.

Zina, J., & Haddad, C. F. B. (2005). Reproductive activity and vocalizations of *Leptodactylus labyrinthicus* (Anura: Leptodactylidae) in Southeastern Brazil. *Biota Neotropica*, 5(2).