



Universidade Paulista

Julieta Catarina Burke

Presença de *Batrachochytrium dendrobatidis* em anuros de vida livre, sem lesões aparentes, do município de Boracéia – SP

São Paulo
2011

Julieta Catarina Burke

Presença de *Batrachochytrium dendrobatidis* em anuros de vida livre, sem lesões aparentes, do município de Boracéia – SP

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Paulista – UNIP para obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof. Dra. Selene Dall'Acqua Coutinho

São Paulo
2011

Burke, Julieta Catarina.

Presença de *Batrachochytrium dendrobatidis* em anuros de vida livre, sem lesões aparentes, do município de Boracéia-SP./ Julieta Catarina Burke. – São Paulo, 2011.

49 f. il. Color.

Dissertação (mestrado) – Apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Paulista, São Paulo, 2011.

Área de Concentração: Imunopatologia veterinária.
"Orientação: Profª Drª Selene Dall'Acqua Coutinho.

Julieta Catarina Burke

Presença de *Batrachochytrium dendrobatidis* em anuros de vida livre, sem lesões aparentes, do município de Boracéia – SP

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Paulista – UNIP para obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____/____/____
José Luiz Catão Dias
Universidade de São Paulo – USP

_____/____/____
Vania Maria de Carvalho
Universidade Paulista – UNIP

_____/____/____
Selene Dall'Acqua Coutinho
Universidade Paulista - UNIP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os colaboradores que tornaram possível a realização desse trabalho.

Muito obrigado pela atenção, carinho, paciência e toda colaboração ao longo desses dois anos a minha orientadora Profa. Dra. Selene Dall'Acqua.

Obrigado a Lika pela ajuda no Biomol.

Agradeço ao Prof. Dr. José Luiz Catão Dias, Msc. Catia Dejuste de Paula e a equipe do Prof. Dr. Miguel Trefaut Urbano Rodrigues, Mauro Teixeira Junior, Renato Recorder, Marco Aurélio de Sena pela ajuda na colheita, identificação e transporte dos animais.

Não poderia deixar de agradecer a duas pessoas que abraçaram essa idéia do mestrado em São Paulo, Antônio Graziosi e Cesare Graziosi, pelo incentivo e ajuda.

E como sempre a minha família que mesmo a distância acompanhou minha luta.

"Não viva no passado, não sonhe
com o futuro, concentre a mente no
momento presente". (Sakyamuni)

RESUMO

Atualmente existem 44 Famílias de anuros contendo 5679 espécies; no Brasil há 877 espécies de anfíbios conhecidas. Frente a essa biodiversidade, o país ocupa a primeira colocação em relação àqueles com maior riqueza de espécies de anfíbios. Vários patógenos (vírus, bactérias e parasitas) podem ocasionar enfermidades nesses animais, dentre essas doenças, a chytridiomicose vem ganhando importância, desde a sua descrição em 1998. Essa micose é causada pelo *Batrachochytrium dendrobatidis*, da classe Chytridiomycetes, ordem Rhizophydiales. Devido ao crescimento ocorrer no interior de células queratinizadas, em anfíbios causa uma micose cutânea que, posteriormente, pode levar o animal à morte, pois a pele tem como funções a respiração, osmorregulação e defesa. Diversos estudos têm associado o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* ao declínio de populações de anfíbios ao redor do mundo. No Brasil, a presença desse fungo foi relatada, pela primeira vez em 2005, em anuros da Mata Atlântica, porém de acordo com a OIE (World Organisation for Animal Health) não existe registro natural da doença no país. Este trabalho teve como objetivo a detecção de *B. dendrobatidis* em anuros adultos da Mata Atlântica, do município de Boracéia - São Paulo. Foram colhidos swabs de pele de 78 animais sem lesões macroscópicas, mantidos em álcool etílico P.A., e processados no Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade Paulista, para extração do rDNA fúngico. A identificação de *B. dendrobatidis* foi realizada pela técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), com limite de detecção ao redor de 10 zoósporos, utilizando-se iniciadores com sequências específicas. O fungo foi detectado em 16/78 (20,5%) das amostras pesquisadas. A alta prevalência observada confirma que o fungo está presente em anuros de vida livre, sem lesões aparentes, caracterizando o estado de portador assintomático e a técnica de PCR foi adequada para sua detecção.

Palavras-chave: *Batrachochytrium dendrobatidis*, anuros, Boracéia, PCR, portador assintomático

ABSTRACT

There are, in the whole world, 44 families of frogs containing 5679 species; in Brazil are known 877 species of amphibians. With such biodiversity, our country is the first in richness of amphibian species. Many pathogens (viruses, bacteria and parasites) cause diseases in amphibians and chytridiomycosis is one of the most important, since its description in 1998. This mycosis is caused by *Batrachochytrium dendrobatidis*, Chytridiomycetes Class, Rhizophydiales Order. This fungus grows within keratinized cells, and diseased animals can die, because all of the skin functions, such as, respiration, osmoregulation and immune defense, can be damaged. Many researchers have noticed that *Batrachochytrium dendrobatidis* infection is related to the decline of amphibian populations around the world. In Brazil, this fungus was first reported in frogs in 2005, although according to OIE (World Organisation for Animal Health) there is no record of the natural disease in the country. The aim of this study was to detect *B. dendrobatidis* in adult frogs of the Atlantic forest, in Boracéia - São Paulo. Swabs were taken from skin of 78 animals, without macroscopic lesions. They were kept in ethanol PA and processed at Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade Paulista, for extracting fungal rDNA. Identification of *B. dendrobatidis* was done using PCR (polymerase chain reaction) technique, and specific primers sequences, with about 10 zoospores detection. The fungus was detected in 16/78 (20.5%) samples. This high prevalence confirms that this fungus occurs in free-living frogs, with no macroscopic lesions, characterizing the state of asymptomatic carrier, and that PCR technique is suitable for its detection.

Keywords: *Batrachochytrium dendrobatidis*, frogs Boracéia, PCR, asymptomatic carrier

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 Sapo-comum (<i>Bufo ictericus</i>).....	10
FIGURA 2 Rã-marrom (<i>Leptodactylus flavopictus</i>)	10
FIGURA 3 Detalhe da pata dianteira da Perereca-catarinense (<i>Scinax catharinae</i>) .	11
FIGURA 4 Perereca do litoral (<i>Scinax alter</i>).....	11
FIGURA 5 Esquema do ciclo de vida de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	13
FIGURA 6 Distribuição mundial de chytridiomicose em anfíbios.....	16
FIGURA 7 Transporte dos animais em sacos plásticos individuais.....	20
FIGURA 8 Colheita das amostras clínicas	20
FIGURA 9 Extração do DNA	21
FIGURA 10 Eletroforese em gel de agarose	24

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT	6
1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 ANIMAIS	19
3.2 COLHEITA E TRANSPORTE DE AMOSTRAS CLÍNICAS.....	19
3.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	21
3.3.1EXTRAÇÃO DE DNA	21
3.3.2 IDENTIFICAÇÃO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR	22
4 RESULTADOS	23
5 DISCUSSÃO	25
6 CONCLUSÃO.....	30
7 REFERÊNCIAS.....	31
8 ANEXOS	36

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, existem 44 famílias de anuros contendo 5679 espécies, ocorrem em todo o mundo, exceto na Antártida (Frost, 2009); no Brasil, há 877 espécies de anfíbios conhecidas. Frente a essa biodiversidade, o país ocupa a primeira colocação em relação àqueles com maior riqueza de espécies, seguido pela Colômbia e Equador (Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2011).

Os anuros são morfologicamente distintos, sendo sua classificação relacionada às características anatômicas no animal adulto e a especialização para o salto é a característica esquelética mais evidente (Schmidt-Nielsen, 2002). As especializações do sistema locomotor são usadas para diferenciar os tipos de anuros: os terrestres de grande porte, que saltam curtas distâncias são denominados sapos (Figura 1), estes possuem cabeça áspera, pernas relativamente curtas e membranas interdigitais pouco desenvolvidas; os anuros arborícolas denominados rãs, usualmente têm a cabeça e olhos grandes, cintura fina e pernas longas, caminham e escalam, além de saltarem (Figura 2); e aqueles que possuem discos digitais aumentados (Figura 3), para que ocorra melhor adesão, são as pererecas (Figura 4) (Orr, 1986; Pough et al., 2008).

De acordo com a *Global Amphibian Assessment*, cerca de um terço das espécies (1856) de anuros está classificada como “ameaçada de extinção”, sendo os vertebrados em maior situação de risco no planeta (www.globalamphibians.org).

Os anfíbios são afetados por uma grande variedade de patógenos, dentre eles fungos, vírus, bactérias e parasitas. As doenças bacterianas, causadas pelas bactérias Gram negativas, são causa de morbidade e mortalidade em anuros, principalmente de cativeiro (Taylor et al., 2001). Esses animais ainda hospedam diversos tipos de parasitas, como trematóides, nematóides, protozoários, oligoquetas e ectoparasitas, que normalmente causam apenas deformidades nos membros (Well, 2007; Collins & Crump, 2009). As viroses, como a ranavirose, também podem levar à morte (Taylor et al., 2001; Collins & Crump, 2009).

Figura 1. Sapo-comum (*Bufo ictericus*)



Fonte: Instituto rã bugio para conservação da biodiversidade, 2011

Figura 2. Rã-marrom (*Leptodactylus flavopictus*)



Fonte: Instituto rã bugio para conservação da biodiversidade, 2011

Figura 3. Detalhe da pata dianteira da Perereca-catarinense (*Scinax catharinae*): pontas dos dedos permitem adesão e escalada em árvores e outras superfícies



Fonte: Instituto rã bugio para conservação da biodiversidade, 2011

Figura 4. Perereca do litoral (*Scinax alter*)



Fonte: Instituto rã bugio para conservação da biodiversidade, 2011

Além disso, os anfíbios são acometidos por doenças fúngicas, sendo a principal delas a chytridiomicose, causada pelo *Batrachochytrium dendrobatidis*, da Classe Chytridiomycetes, Ordem Rhizophydiales (Langcore et al., 1999; James et al., 2000; de Hoog et al., 2004a).

Esse fungo vive em água doce, com produção de hifas, que degradam celulose e queratina (de Hoog et al., 2004a; Symonds, 2005). A forma infectante do *B. dendrobatidis* é o zoósporo e a transmissão da doença requer a presença de água, porque o zoósporo é flagelado e sensível à desidratação (de Hoog et al., 2004a; Johnson et al., 2003).

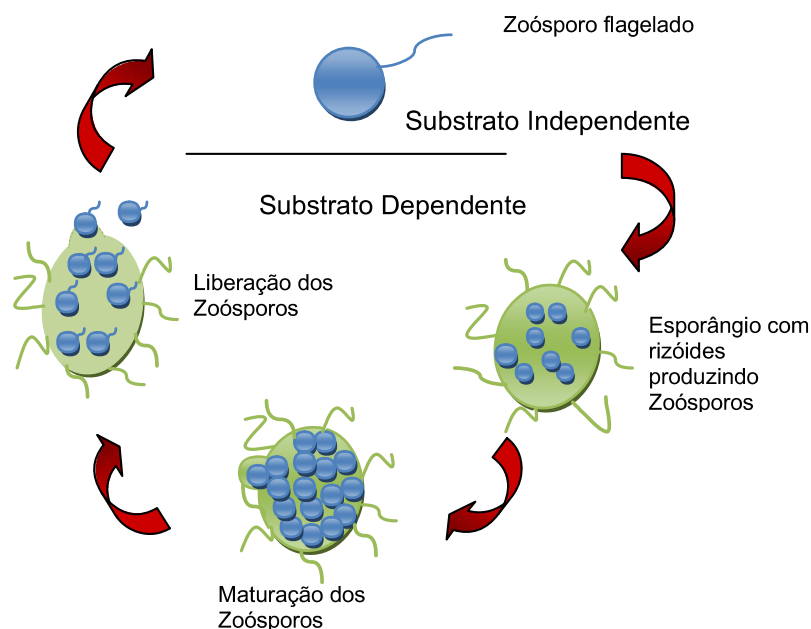
Entretanto, a habilidade do fungo para sobreviver no ambiente, na ausência de anfíbios, não é perfeitamente conhecida. Estudos demonstram que em água corrente e deionizada *B. dendrobatidis* pode sobreviver por três a quatro semanas; em águas de lagos, os zoósporos mantêm a viabilidade por períodos muito mais longos, provavelmente devido a um maior nível de nutrientes e substratos orgânicos (Johnson & Spare, 2003).

Durante o ciclo de vida, o zoósporo flagelado adere-se e degrada um substrato, geralmente queratina ou celulose, absorve os nutrientes e forma uma estrutura maior e fechada, que é o esporângio, este pode desenvolver rizóides, que auxiliarão em sua fixação, e no seu interior, após amadurecimento, serão encontrados os novos zoósporos formados. A liberação desses últimos se dará através de papilas, que se abrem na parede do esporângio (Langcore et al., 1999). Os zoósporos liberados voltam à água e iniciam o ciclo em outro substrato disponível (James & Vilgalys, 2006) (Figura 5).

Embora não haja consenso sobre a dose infectante para os anfíbios, sabe-se que a presença de um único zoósporo pode ser potencialmente considerada para instalação e multiplicação do fungo (Kriger et al., 2007), e infecções com pequeno inóculo, como 100 zoósporos, podem causar a morte (Berger et al., 1999; Daszak et al., 1999; Berger et al., 2005; Symonds, 2005).

A chytridiomicose é uma doença fatal e altamente contagiosa, que se propagou no mundo (Symonds, 2005; OIE, 2011). A OIE (World Organisation for Animal Health) adicionou a chytridiomicose e a ranavirose na relação de doenças de importância e de notificação compulsória (OIE, 2011).

Figura 5. Esquema do ciclo de vida de *B. dendrobatidis* (baseado em Langcore et al., 1999)



A pele dos anuros está ativamente envolvida na troca de gases respiratórios, água e eletrólitos, sendo imprescindível à sua homeostase hídrica e gasosa, e ainda, à sua defesa imune (Orr, 1986; Voyles et al., 2009).

Quando *B. dendrobatidis* invade as células da epiderme, o patógeno fica restrito às camadas superficiais, os extratos córneo e granuloso, onde serão formados os esporângios e liberados os novos zoósporos (Langcore et al., 1999; Hyatt et al., 2007; OIE, 2011). Macroscopicamente, pode-se observar descamação, como “flocos” na pele dos animais afetados (Barrionuevo & Mangione, 2006; Hyatt et al., 2007; OIE, 2011). Em cortes histológicos, verifica-se espessamento do extrato córneo e a presença de esporângios, e com o progresso da infecção, hiperqueratose e alterações na arquitetura normal da epiderme (Langcore et al., 1999; Barrionuevo & Mangione, 2006; Hyatt et al., 2007; OIE, 2011).

Devido ao papel da pele desses animais na manutenção do equilíbrio osmótico, estudos têm sugerido que a infecção por *B. dendrobatidis* possa afetar a osmorregulação cutânea, uma vez que as alterações promovidas pelo fungo inibem a absorção de sódio, comprometendo o transporte de água e eletrólitos, e as funções osmorregulatórias como um todo (Voyles et al., 2009). Apesar dos anfíbios

tolerarem flutuações maiores nos níveis plasmáticos de eletrólitos do que outros vertebrados terrestres, sugere-se que a depleção, especialmente de potássio, seja importante na fisiopatologia da chytridiomicose (Voyles et al., 2009). Verificou-se que as concentrações de sódio plasmático e potássio foram significativamente reduzidas como resultado da doença (Voyles et al., 2009). Algumas horas antes da morte, a atividade elétrica cardíaca dos sapos severamente afetados, lembrava padrões associados com parada cardíaca, também conhecida como assistolia cardíaca ou bradiassistolia (Voyles et al., 2009). Assim, mudanças nos níveis de eletrólitos e/ou acidose metabólica parecem ser causas prováveis da morte em assistolia cardíaca. Animais acometidos pela doença apresentam anorexia, letargia, excessiva descamação da pele, posição anormal quando sentados, com abdução dos membros posteriores, e a morte pode ocorrer em 12 a 24 horas (Mazzoni et al., 2003; Berger et al., 2005; Kriger et al., 2007).

Geralmente, os girinos não apresentam sinais clínicos, nem ocorre aumento em sua taxa de mortalidade (Mazzoni et al., 2003), possivelmente porque ainda respiram através de brânquias (Pough et al., 2008).

Nos anos de 1993–1994 e 1996–1997 constatou-se declínio em populações de anfíbios, respectivamente na Austrália e Panamá (Berger et al., 1998). Foram observadas alterações na pele de animais mortos e doentes, e a análise dos espécimes colhidos nesses locais, permitiu associar-se, pela primeira vez, o parasitismo de um animal vertebrado, com um fungo Chytridiomycota, através de exames histopatológicos e sequenciamento genético (Berger et al., 1998).

De 1996 a 1998, sapos morreram no Parque Zoológico Nacional, em Washington (EUA), devido a problemas associados a um organismo eucariótico esférico na epiderme. A microscopia eletrônica detectou zoósporo característico de membro da família dos Chytridiomycota (Pessier et al., 1999).

Em 1999, Langcore e colaboradores, através de material colhido em necrópsia de um espécime de *Dendrobates azureus*, realizaram exames histopatológicos, isolamento e cultura, e análise ultraestrutural do fungo causador da doença, concluindo que se tratava de um organismo taxonomicamente distinto e o denominaram de *Batrachochytrium dendrobatidis*. Do grego, *batracho* é sapo e *chytr* é pote feito de barro; a denominação da espécie provém do gênero *Dendrobates*.

Estudo retrospectivo em anfíbios de coleções de museus da África do Sul comprovou a existência do fungo em espécimes colhidos em 1938 e 1943 (Weldon

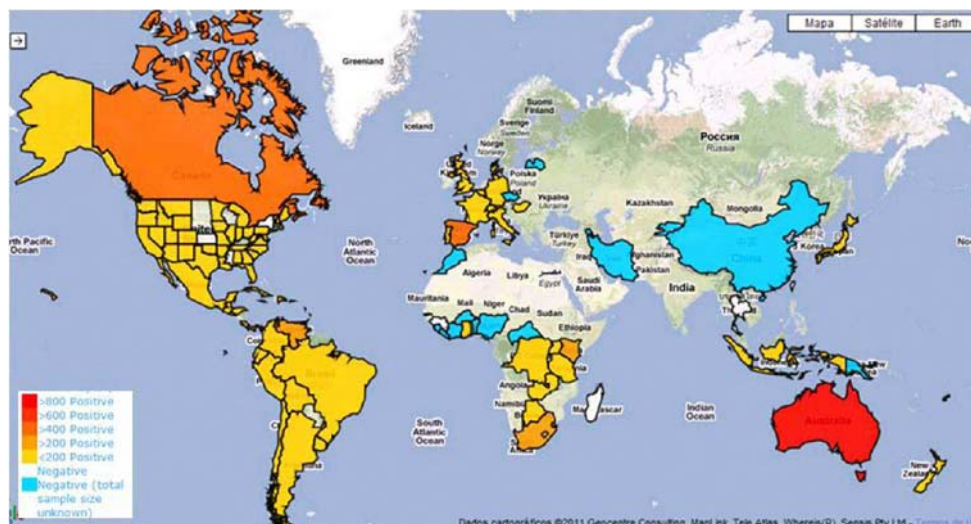
et al., 2004). Entretanto, a emergência do *B. dendrobatidis* como causa do declínio drástico de populações de anfíbios ocorreu há pouco mais de uma década (Blaustein & Dobson, 2006). Desde então, diversos estudos têm associado esse declínio à chytridiomicose (Daszak et al., 1999; Lips, 1999; Lips et al., 2005; Symonds, 2005; Voyles et al., 2009).

Atualmente, a doença está disseminada, ocorrendo em todo o mundo, Oceania, África, Europa e Américas (Berger et al., 1998; Lips et al., 1999; Daszak et al., 1999; Bosch et al., 2001; Ron, 2005; Symonds, 2005). Os pesquisadores vêm tentando concentrar as informações *online* no “*B. dendrobatidis* Global Mapping Project”, com a finalidade de que se faça um quadro real e atualizado de sua ocorrência (Figura 6) (*B. dendrobatidis* Global Mapping Project, 2011).

Acredita-se que a chytridiomicose seja problema deste século e final do século XX, relacionada ao impacto humano (Berger et al., 1998; Daszak et al., 1999; Fisher et al., 2009).

Duas hipóteses são aventadas para justificar a disseminação da doença. A primeira postula que a chytridiomicose originou-se em uma área geográfica determinada e o fungo alcançou outras regiões do mundo através de comércio, transporte e movimento de animais (Weldon et al., 2004). A segunda sustenta que o fungo seria sapróbio e ubíquo, e alterações na relação parasita-hospedeiro levariam ao aumento na incidência da doença (Langcore et al., 1999; Rachowicz et al., 2005). Fatores como alterações climáticas, poluição, desmatamento e ampliação de áreas cultiváveis devem se somar e agir em cascata, na transmissão e na ocorrência de surtos (Daszak et al., 1999; Blaustein & Dobson, 2006; Rachowicz et al., 2005; Fisher et al., 2009).

Figura 6. Distribuição mundial de chytridiomicose em anfíbios.



Fonte: *B. dendrobatidis* Global Mapping Project, 2011

O diagnóstico de anfíbios infectados é um aspecto importante que visa monitoração de áreas contaminadas, assim como levantamentos que possibilitem o conhecimento sobre as taxas de infecção em populações selvagens ou criatórios (Boyle et al., 2004; Symonds, 2005; Hyatt et al., 2007).

Os testes de diagnóstico para identificação do fungo empregam métodos histológicos e de biologia molecular, particularmente a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (Pessier et al., 1999; Berger et al., 1999; Annis et al., 2004; Retallich et al., 2006; Hyatt et al., 2007; Kirshtein et al., 2007).

Embora também seja possível a realização do diagnóstico através da análise ultraestrutural do fungo em microscopia eletrônica (Berger et al., 1998; Longcore et al., 1999; James et al., 2000) e isolamento em meios de cultivo de laboratório, não são usuais (Langcore et al., 1999; Hyatt et al., 2007).

Recentemente, a presença do fungo foi constatada pela primeira vez no Brasil, em girinos da Mata Atlântica que apresentavam deformidades bucais (Carnaval et al., 2005; Toledo et al., 2006 a).

No ano de 2006, Carnaval e colaboradores, realizaram levantamento epidemiológico, utilizando 96 anfíbios preservados de coleções herpetológicas dos Estados de Espírito Santo, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro e São Paulo,

verificando, através de análise histopatológica, a presença de *B. dendrobatidis* em seis dos animais estudados, um deles colhido em 1981 (Carnaval et al., 2006).

No mesmo ano, de 41 girinos que apresentavam lesões nos discos bucais, colhidos de 1964 a 2005, pertencentes a arquivos de coleções, constatou-se 20 amostras positivas para *B. dendrobatidis*, através de exame histopatológico e morfológico do fungo (Toledo et al., 2006b).

Esses relatos foram referentes a animais de vida livre, e em 2010, pela primeira vez, se descreveu a ocorrência de chytridiomicose em anfíbios de cativeiro no país (de Paula et al., 2010). O fungo foi observado em cortes histológicos de 20 animais da espécie *Dendrobates tinctorius*, pertencentes a um parque zoológico particular (de Paula et al., 2010).

Essas são descrições comprovadas da presença de *Batrachochytrium dendrobatidis* no Brasil (Figura 6), entretanto, de acordo com o *status* internacional da OIE (2011), não há registro de doença natural ou surtos em nosso país (OIE, 2011).

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo detectar *B. dendrobatidis*, através da técnica de PCR, em anuros adultos de vida livre, em região de Mata Atlântica do município de Boracéia – SP.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 78 anfíbios adultos de vida livre, sem lesões macroscópicas, das famílias Brachycephatidae, Hylidae, Hylodidae, Leiuperidae e Leptodactylidae, colhidos na Mata Atlântica no Estado de São Paulo, município de Boracéia (Anexo A).

Os animais foram classificados pelo Laboratório do Prof. Dr. Miguel Trefaut Rodrigues, Departamento de Zoologia do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo.

3.2 Colheita e transporte de amostras clínicas

Os animais foram capturados manualmente na reserva florestal de Mata Atlântica, no município de Boracéia, Estado de São Paulo (Anexo B - IBAMA). Foram transportados em sacos individuais, contendo oxigênio (Figura 7), até o Laboratório de Patologia Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, aonde foram contidos fisicamente para colheita de amostras.

Um *swab* estéril foi friccionado em todas as regiões do corpo (Figura 8A), sendo, em seguida, acondicionado em tubo individual contendo álcool etílico P.A. (Figura 8B), e conservado sob refrigeração (Hyatt et al., 2007). O material foi enviado ao Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade Paulista (UNIP), onde foi processado. Todo o procedimento foi realizado utilizando-se luvas descartáveis e individuais.

Figura 7. Transporte dos animais em sacos plásticos individuais (A); detalhe em B

A



B



Figura 8. Colheita das amostras clínicas, fricção de swab estéril na pele do animal (A), acondicionamento do swab em tubo contendo álcool etílico P.A. (B)

B

A

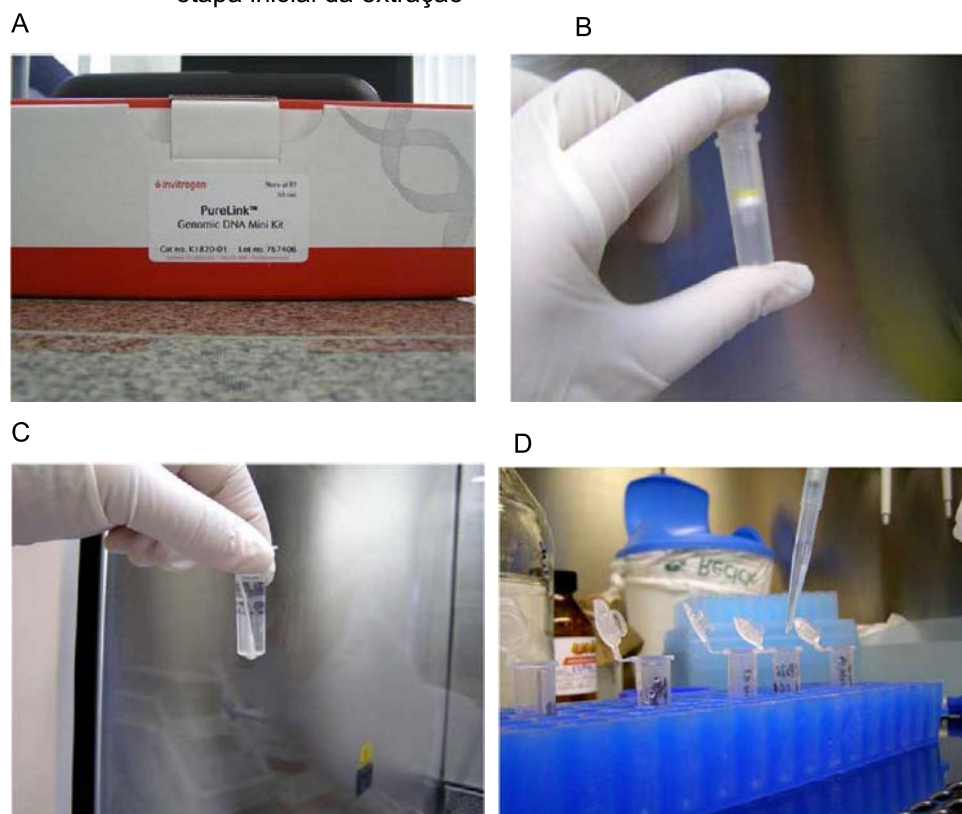


3.3 Identificação Molecular

3.3.1 Extração de DNA

A extração do rDNA fúngico ocorreu através do *Genomic DNA Mini kit* (Invitrogen), e o protocolo utilizado seguiu as normas do fabricante (Figura 9: A, B, C e D).

Figura 9. Extração do DNA: A – *Kit* utilizado na extração; B – *Spin Column PureLink Collection Tube*; C – *ependorf* contendo o material que será extraído; D – etapa inicial da extração



3.3.2 Identificação através da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

A identificação de *B. dendrobatidis* foi realizada pela técnica de PCR, conforme metodologia descrita por Annis e colaboradores (2004), com limite de detecção ao redor de 10 zoósporos do fungo, utilizando-se iniciadores que amplificam uma sequência específica de rDNA de *B. dendrobatidis* (Quadro1). Cada amostra foi testada em reações de 25µL contendo 1µL de DNA extraído, 12,5µL de *Taq Green master mix Promega*, 1,0µL de iniciador, 1,0µL de iniciador reverso e 9,5µL de água livre de nucleases. As reações foram submetidas ao ciclo de amplificação em termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient*, sendo inicialmente aquecidas a 93°C por 10 minutos e, em seguida, sofreram 30 ciclos: desnaturação a 93°C por 45 segundos, 45 segundos a 60°C para anelamento, extensão a 72°C por 1 minuto e um ciclo de extensão final de 10 minutos.

Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%), coradas em brometo de etídio, visualizadas em transiluminador UV e fotografadas pelo sistema *Gel Logic 200, Kodak*.

Utilizou-se como padrão positivo DNA de *B. dendrobatidis*, cedido pelo *Amphibian Disease Laboratory* do *San Diego Zoo*, California, EUA.

Quadro 1. Iniciadores para identificação de *Batrachochytrium dendrobatidis*, que amplificam uma sequência específica de rDNA

Iniciador	Sequência	Tamanho do amplificado (pb)
Bd1a	5' CAGTGTGCCATATGTCACG 3'	300
Bd2a	5' CATGGTTCATATCTGTCCAG 3'	

Annis et al., 2004

4 RESULTADOS

Detectou-se *B. dendrobatidis* em 16/78 (20,5%) dos animais estudados (Tabela 1 e Figura 10).

Foram positivos para a presença de *B. dendrobatidis* espécimes pertencentes às Famílias Hylidae, Hylodidae e Brachycephatidae, dentre as cinco pesquisadas (Tabela 1); sendo a frequência verificada na Família Hylidae, que alberga o maior número de anuros testados, de 21,1% (12/52) (Tabela 1).

No anexo A, são discriminadas a caracterização taxonômica e presença de *B. dendrobatidis* em cada uma das amostras clínicas analisadas.

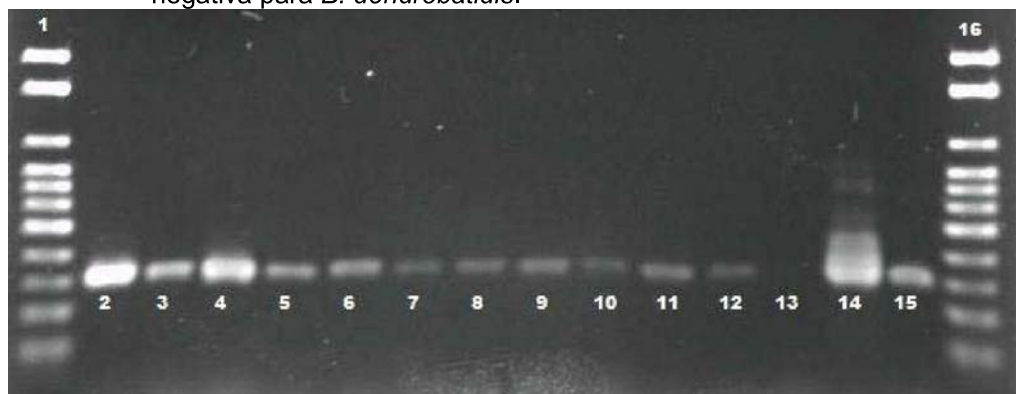
Tabela 1. Presença de *B. dendrobatidis* em anuros da Mata Atlântica do município de Boracéia – SP.

FÁMILIA	GÊNERO	ESPÉCIE	NÚMERO DE ESPÉCIMES	POSITIVO PARA <i>B. dendrobatidis</i>	
				Número Absoluto	Porcentagem (%)
Hylidae	<i>Hypsiboas</i>		52	12	23,1
			22	7	31,8
		1 <i>H. polytaenius</i>	10	2	20,0
		2 <i>H. bischoffi</i>	9	2	22,2
		3. <i>H. faber</i>	3	3	100,0
	<i>Scinax</i>		14	2	14,3
		1 <i>S. alter</i>	6	2	33,3
		2 <i>S. hayii</i>	3	0	0
		3 <i>S.</i>			
		<i>crospedophilus</i>	5	0	0
	<i>Bokermannohyla</i>		6	0	0
		1 <i>B. astartea</i>	5	0	0
		2 <i>B. circumdata</i>	1	0	0
	<i>Aplastodiscus</i>		5	2	40,0
		1 <i>A. arildae</i>	3	1	33,3
		2 <i>A. albosignatus</i>	1	0	0
		3 <i>A. leucopygius</i>	1	1	100,0
	<i>Dendropsophus</i>		5	1	20,0
		1 <i>D. minutus</i>	5	1	20,0
Hylodidae	<i>Hylodes</i>		11	2	18,2
			11	2	18,2
		1 <i>H. asper</i>	11	2	18,2

Continua

Continuação				
Brachycephatidae		7	2	28,6
	1 <i>Ischnocnema</i> sp	1	1	100,0
	2 <i>I. guentheri</i>	1	0	0
	3 <i>I. juipoca</i>	3	0	0
	4 <i>I. parva</i>	1	0	0
	5 <i>I. randorum</i>	1	1	100,0
Leiuperidae		4	0	0
	<i>Adenomera</i>	2	0	0
	1 <i>A. marmorata</i>	2	0	0
	<i>Physalaemus</i>	1	0	0
	1 <i>P. cardosi</i>	1	0	0
	<i>Paratelmatobius</i>	1	0	0
	1 <i>P. cuvieri</i>	1	0	0
Leptodactylidae		4	0	0
	<i>Leptodactylus</i>	4	0	0
	1 <i>L. latrans</i>	4	0	0
TOTAL DE ANIMAIS		78	16	20,5

Figura 10: Eletroforese em gel de agarose de sequência específica de rDNA de *B. dendrobatidis*, após amplificação pela técnica de PCR. Números 1 e 16: padrão de peso molecular (100pb); número 2 padrão positivo para *B. dendrobatidis*; números 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,14 e 15: amostras testadas e positivas para *B. dendrobatidis*; número 13 amostra testada e negativa para *B. dendrobatidis*.



5 DISCUSSÃO

A metodologia utilizada foi adequada para a proposta do projeto. As técnicas de colheita, transporte, e o *kit* empregado possibilitaram a extração do rDNA do fungo, assim como, os iniciadores utilizados permitiram a identificação de *B. dendrobatidis*, obtendo-se amplificados com 300pb, como referido na literatura (Annis et al., 2004)

Outras técnicas de diagnóstico disponíveis são o exame histopatológico e o cultivo do fungo (Berger et al., 1998; Langcore et al., 1999; Hyatt et al., 2007). Em relação à histopatologia, esse teste geralmente é empregado em fragmentos de tecidos colhidos em necrópsia, sendo de pouca utilidade em pesquisas do fungo em animais vivos (Kriger et al., 2007), além de apresentar sensibilidade bem menor que as técnicas moleculares (Hyatt et al., 2007). O isolamento em meios de cultura é de difícil obtenção; a ocorrência de micro-organismos contaminantes é frequente, devido o tipo de material semeado, e, muitas vezes quando se obtém o fungo isolado, os esporângios não liberam novos zoósporos ou cessam o seu desenvolvimento (Longcore et al., 1999).

Essas são as principais razões de se recomendar, atualmente, as técnicas moleculares: são rápidas, podem ser utilizadas em animais vivos, em levantamentos de campo e sua sensibilidade e especificidade são maiores do que quaisquer outros métodos de diagnóstico disponíveis (Hyatt et al., 2007).

A alta positividade de *Batrachochytrium dendrobatidis* verificada neste projeto em animais de vida livre, sem lesões aparentes, vai ao encontro da recomendação feita por outros pesquisadores, de adotar-se a técnica de PCR para detecção do fungo (Annis et al., 2004; Boyle et al., 2004; Hyatt et al., 2007; Kirshtein et al., 2007; Kriger et al., 2007).

Embora ainda não estejam bem estabelecidos seus padrões de resistência e sensibilidade, sabe-se que o fungo vive naturalmente no ambiente, utilizando plantas aquáticas, protistas, animais invertebrados e vertebrados como parte do ciclo de vida (Johnson & Speare, 2003; de Hoog et al., 2004a) e os anfíbios se infectam através de contato direto com a pele de um animal infectado com o zoósporo do fungo ou com reservatório no ambiente (de Hoog et al., 2004a).

A presença do fungo em praticamente todo o mundo e a ocorrência da doença em ampla gama de hospedeiros (Berger et al., 1998; Daszak et al., 1999; Lips et al., 2005; Ron, 2005) têm levado os pesquisadores a tentar compreender a origem e a forma de disseminação da chytridiomicose.

Os baixos índices de variabilidade genética verificados, através de sequenciamento de DNA, em cepas de *B. dendrobatidis*, provenientes da América do Norte, América Central, Austrália e África suportam a hipótese da existência de um genótipo e reprodução clonal (Morehouse et al., 2003; Fisher et al., 2009). De acordo com Weldon et al., 2004, o fungo teria se originado na África e a sua dispersão ocorrido através do comércio global e transporte de anfíbios. Espécies do gênero *Xenopus*, originárias da África, foram exportadas aos milhares no século XX, para serem utilizadas em testes de confirmação de gravidez humana (Shapiro & Zwarenstein, 1934 apud Weldon et al., 2004) e como modelos experimentais em imunologia e embriologia. *B. dendrobatidis* apresenta algumas características condizentes com esse tipo de disseminação, baixa especificidade de hospedeiros e alta taxa de mortalidade (Daszak et al., 1999; Retallick et al., 2004).

Nas últimas décadas, o comércio mundial de rãs touro gigante também se expandiu, para suprir criatórios em diversas partes, já que são utilizadas na alimentação humana (Willians et al., 2002; Cunningham et al., 2003). Esses animais também são acometidos pela chytridiomicose e descreveu-se um surto no Uruguai, em que morreram cerca de 25.000 animais adultos no período de um mês (Mazzoni et al., 2003). Cabe ressaltar que as matrizes haviam sido importadas do Brasil, embora não se tenha estabelecido que essas fossem as fontes de infecção do surto (Mazzoni et al., 2003).

Conquanto não sejam observadas grandes diferenças genéticas em *B. dendrobatidis*, provenientes de diferentes regiões do mundo (Morehouse et al., 2003), verificaram-se alterações em sua virulência em infecções experimentais realizadas com três cepas do fungo (Berger et al., 2005). Entretanto, não se sabe que ordem de pressão seletiva essas cepas sofreram para expressar seus diferentes genes (Berger et al., 2005).

É possível que os anfíbios alberguem *B. dendrobatidis* em sua pele e o fungo só consiga penetrar e multiplicar-se nos tecidos cutâneos em situações de desequilíbrio, à semelhança do que ocorre com outros fungos oportunistas (de Hoog et al., 2004b), porque todos os animais analisados nesta pesquisa eram adultos, de

vida livre e não possuíam lesões aparentes, constituindo-se em portadores assintomáticos e sendo fontes de infecção para outros animais.

Nos poucos levantamentos epidemiológicos realizados no Brasil, verificou-se ampla ocorrência do fungo, em mata Atlântica, em diversos Estados brasileiros, alcançando distribuição em 2400 Km (Carnaval et al., 2006; Toledo et al., 2006b). Essa dispersão, associada ao estado de portador assintomático, observada nesta pesquisa, não sugerem que a introdução do fungo em nosso país, tenha acontecido através de uma espécie exótica de anfíbios.

A própria habilidade do fungo em crescer em meios de cultura com ausência de células vivas, reforça a hipótese de sua natureza sapróbia (Langcore et al., 1999). Provavelmente, *B. dendrobatidis* é capaz de viver saprofiticamente em queratina na natureza, se outros componentes do ecossistema limitarem o crescimento de bactérias e ficomicetos (Langcore et al., 1999).

São diversas as alterações que podem ocorrer no ecossistema onde os animais vivem e acabam por promover quebra em sua homeostasia (Blaustein & Kiesecker, 2002) e declínio das populações, desde fatores próprios do micro-organismo, como virulência e dose infectante (Langcore et al., 1999; Kriger et al., 2007), até a destruição de seu habitat.

Desmatamento de florestas, drenagem de terras alagadiças, ampliação de áreas cultiváveis podem afetar diretamente os anfíbios (Blaustein & Kiercecher, 2002); alterações climáticas globais, com variação de índices pluviométricos e temperatura, também são apontadas como fatores de desequilíbrio para as populações (Blaustein & Kiercecher, 2002; Willians et al., 2002; Fisher et al., 2009); ainda, aumento de radiação ultravioleta B, devido à diminuição da camada de ozônio e uma vasta gama de substâncias tóxicas, como pesticidas, herbicidas, fungicidas, fertilizantes e poluentes em geral, interferem com a sanidade, equilíbrio e manutenção das populações de anfíbios (Blaustein & Kiercecher, 2002; Johnson et al., 2003). As substâncias tóxicas podem afetar o comportamento, reduzir as taxas de natalidade, desregular o sistema endócrino, promover imunossupressão e mesmo, levar à morte (Blaustein & Kiercecher, 2002; Willians et al., 2002). A introdução de novas espécies no ambiente também afeta potencialmente os animais, tanto pela competição com os anfíbios nativos, como pela introdução de novas doenças (Berger et al., 1998; Berger et al., 2004; Blaustein & Dobson, 2006).

Nos últimos anos, tem-se relacionado o aquecimento global ao declínio brusco de populações de anfíbios, decorrente de infecções causadas por *B. dendrobatidis* (Berger et al., 2004). Verificou-se alto grau de confiança (> 99%), quando se cruzou a extinção de duas espécies de anfíbios, que habitaram as montanhas da Costa Rica, com o aumento da temperatura atmosférica e dos oceanos (Pounds et al., 2006). Além das alterações ecológicas que ocorreriam no meio, ter-se-ia diminuição da ação dos antimicrobianos da pele dos anfíbios, pelo aumento da temperatura ambiente (Rollins-Smith et al., 2002). Sabe-se que os anfíbios possuem em sua pele peptídeos antimicrobianos, que promovem proteção natural contra infecções, porém esses peptídeos têm maior eficácia em temperaturas mais baixas (Rollins-Smith et al., 2002).

Entretanto, vários dos surtos de chytridiomicose relatados ocorreram em regiões montanhosas e de baixas temperaturas (Berger et al., 1998; Lips et al., 2005), demonstrando a complexidade dessas relações biológicas (Fisher et al., 2009).

Possivelmente, o declínio das populações de anfíbios é contexto-dependente e seus efeitos acontecem em cascata, com o fungo interagindo com ambos, os anfíbios e o meio ambiente, numa relação extremamente difícil de prever (Blaustein & Dobson, 2006; Morehouse et al., 2003; Fisher et al., 2009).

Acredita-se que esse seja o ângulo pelo qual os resultados desta pesquisa devam ser analisados. Detectou-se *B. dendrobatidis* em alta porcentagem dos animais estudados (20,5%), os quais eram aparentemente saudáveis, não apresentavam lesões macroscópicas, nem sinais clínicos de doença, portanto, é factível se aventar que os anfíbios da população pesquisada se submetidos a alguns dos fatores desencadeantes descritos, poderão desenvolver chytridiomicose, inclusive na forma de surtos.

Há cerca de 20 anos, verificou-se que algumas espécies da Subfamília Hylodinae haviam desaparecido de região da Mata Atlântica no Espírito do Santo (Weygoldt, 1989). Também se relatou declínio da população de anuros na região de Boracéia-SP (Bertoluci & Heyer, 1995); entretanto, em nenhum dos eventos, as causas foram determinadas. Em anos mais recentes, pesquisadores alertaram que está ocorrendo diminuição na população de anfíbios em outras regiões do Brasil (Silvano & Segalla, 2005). A redução do número de espécies de anfíbios no país pode ser decorrente de infecção por *B. dendrobatidis* (Toledo et al., 2006a).

No Brasil, nos dois levantamentos realizados com anuros pertencentes a coleções, *B. dendrobatidis* foi detectado respectivamente em 6,3 % (Carnaval et al., 2006) e 48,8% (Toledo et al., 2006b) das amostras estudadas. Em ambos trabalhos foram utilizados anuros adultos e girinos de áreas geográficas que apresentavam declínio de população e/ou lesões sugestivas da doença (Carnaval et al., 2006; Toledo et al., 2006b). Na descrição de chytridiomicose em anfíbios de cativeiro no país, novamente verificou-se alta frequência do fungo nos animais (40%) (de Paula et al., 2010). Entretanto, o que surpreende no estudo ora relatado, é a alta ocorrência de *B. dendrobatidis* em animais de vida livre, aparentemente saudáveis. Essa observação abre a possibilidade de que a doença esteja ocorrendo no Brasil, ou possa vir a ocorrer de uma forma disseminada.

Em vista do exposto, recomenda-se ampliação dos levantamentos epidemiológicos sobre a presença de *B. dendrobatidis*, inclusive em outros biomas, como cerrado e Pantanal, com a finalidade de se obter um panorama real e adotar-se medidas preventivas, visando a conservação dos anfíbios no país.

6 CONCLUSÕES

Batrachochytrium dendrobatidis está presente em anuros de vida livre, sem lesões macroscópicas, da Mata Atlântica, caracterizando o estado de portador assintomático.

A técnica de PCR se mostrou de fácil execução, reprodutível e adequada para detecção de *B. dendrobatidis*, a partir de amostras de pele colhidas com auxílio de *swabs*.

7 REFERÊNCIAS

ANNIS, S. L.; DASTOOR, F. P.; ZIEL, H.; DASZAK, P.; LONGCORE, J. E. A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 40, p. 420 - 428, 2004.

BARRIONUEVO, S.; MANGIONES, S. Chytridiomycosis in two species of *Telmatobius* (Anura: *Leptodactylidae*) from Argentina. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 73, p. 171-174, 2006.

Batrachochytrium dendrobatidis Global Mapping Project. Acessible at <http://www.spatialepidemiology.net/bd-maps>. Acesso em 08 de fevereiro de 2011.

BERGER, L.; SPEARE, R.; DASZAK, P.; GREEN, E.; CUNNINGHAM, A. A.; GOGGIN, C. L.; SLOCOMBE, R.; RAGAN, M. A.; HYATT, 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, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 9031 – 9036, 1998.

BERGER, L.; SPEARE, R.; HYATT, A. Diagnosis of chytridiomycosis of amphibians by histological examination. **Zoos Print Journal**, v. 15, p. 184 – 190, 1999.

BERGER, L.; SPEARE, R.; HINES, H. B.; MARANTELLI, G.; HYATT, A. D.; McDONALD, K. R.; SKERRATT, L. F.; OLSEN, V.; CLARKE, J. M.; GILLESPIE, G.; MAHONY, M.; SHEPPARD, N.; WILLIAMS, C.; TYLLER, M. J. Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, p.31 – 36, 2004.

BERGER, L.; MARANTELLI, G.; SKERRATT, L. F.; SPEARE, R. Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 65, p. 181-186, 2005.

BERTOLUCI, J.; HEYER, R. Boracéia Update. **Froglog**, v. 14, p. 2 – 3, 1995.

BLAUSTEIN, A. R.; KIESCHECKER, J. M. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. **Ecology Letters**, v.5, p.597–608, 2002.

BLAUSTEIN, A. R.; DOBSON, A. A message from the frogs. **Nature**, v. 439, p. 143 – 144, 2003.

BOSCH, J.; MARTÍNEZ – SOLANO, I.; GARCÍA –PARÍS, M. Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. **Biological Conservation**. v. 97, p. 331 – 337, 2001.

BOYLE, D. G.; BOYLE, D. B.; OLSEN, V.; MORGAN, J. A. T.; HYATT, A. D. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in

amphibian samples using real – time Taqman PCR assay. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 60, p. 141-148, 2004.

CARNAVAL, A. C. O. Q.; TOLEDO, L. F.; HADDAD, C. F. B.; BRITTO, F. B. Chytrid fungus infects high-altitude stream-dwelling *Hylodes magalhaesi* (Leptodactylidae) in the Brazilian Atlantic rainforest. **Froglog**, v. 70, p.3, 2005.

CARNAVAL, A. C. O. Q.; PUSCHENDORF, R.; PEIXOTO, O. L.; VERDADE, V. K.; RODRIGUES, M. T. Amphibian chytrid fungus broadly distributed in the Brazilian Atlantic rain forest. **Ecohealth**, v. 1, p.1 – 8, 2006.

COLLINS, J. P.; CRUMP, M. L. Contaminants, global change, and emerging infectious diseases. In:____. **Extinction in our times: global amphibian decline**, Oxford: Oxford University Press, 2009, p. 88 - 122.

CUNNINGHAM, A. A.; DASZAK, P.; RODRIGUEZ, J. P. Pathogen pollution: defining a parasitological threat to biodiversity conservation. **Journal of Parasitology**, v. 89, supl., p. 578 – 583, 2003.

DASZAK, P.; BERGER, L.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D.; GREEN, D. E.; SPEARE, R. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 735-748, 1999.

De HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. Würzburg: University of Würzburg. 2004. CD-ROM:2004.11 a

De HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. Pathogenic fungi: evolutionary advantage of animal association. In:____. **Atlas of clinical fungi**. Würzburg: University of Würzburg. 2004. CD-ROM:2004.11 b

De PAULA, C. D.; ASSIS, E. C. P.; CATÃO-DIAS, J. L. Chytridiomycosis in captive *Dendrobates tinctorius* (Anura: Dendrobatidae) in Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON DISEASES OF ZOO AND WILD ANIMALS. Madrid, 2010. **Proceedings**, p. 167 – 168.

FISHER, M. C.; GARNER, T. W. J.; WALKER, S. F. Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. **Annual Review of Microbiology**, v.63, p. 291 – 310, 2009.

FROST, D. R. Amphibian species of the world: an online. Version 5.3, 12th. February 2009. **American Museum of Natural History**, New York, USA. Acessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia>. Acesso em 3 de fevereiro de 2011.

GLOBAL AMPHIBIANS ASSESSMENT. Acessible at <http://www.globalamphibians.org> Acesso em 05 de fevereiro de 2011.

HYATT, A. D.; BOYLE, D. G.; OLSEN, V.; BOYLE, D. B.; BERGER, L.; OBENDORF, D.; DALTON, A.; KRIGER, K.; HERO, M.; HINES, 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, p. 175 -192, 2007.

INSTITUTO RÃ BUGIO PARA CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE Acessible at <http://www.ra-bugio.org.br/materialdidatico> Acesso em 23 de janeiro de 2011.

JAMES, T. Y.; PORTER, D.; LEANDER, C. A.; VILGALYS, R.; LONGCORE, J. E. Molecular phylogenetics of the Chytridiomycota supports the utility of ultrastructural data in chytrid systematics. **Canadian Journal of Botany**, v. 78, p. 336 – 350, 2000.

JAMES, T. Y.; VILGALYS, R. Amphibian chytridiomycosis as an emerging infectious disease of wildlife: What can we learn from the earliest diverging fungi? In: HEITMAN, J. **Molecular principles of fungal pathogenesis**, Washington: ASM Press Washington, 2006, p. 271 – 278.

JOHNSON, M. L.; SPEARE, R. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: Quarantine and disease control implications. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 922 – 925, 2003.

JOHNSON, M. L.; BERGER, L.; PHILIPS, L.; SPEARE, R. Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 57, p. 255 – 260, 2003.

KIRSCHSTEIN, J. D.; ANDERSON, C. W.; WOOD, J. E.; VOYTEK, M. A. Quantitative PCR detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* DNA from sediments and water. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 77, p. 11 - 15, 2007.

KRIGER, K. M.; ASHTON, K. J.; HINES, H. B.; HERO, J. M. On the biological relevance of a single *Batrachochytrium dendrobatidis* zoospore: a reply to Smith (2007). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 73, p. 257 – 260, 2007.

LIPS, K. R. Mass mortality and population declines of anurans at an upland site in western Panama. **Conservation biology**, v. 13, p. 117 – 125, 1999.

LIPS, K. R.; BURROWES, P. A.; MENDELSON, J.R.; PARRA-OLEA, G. Amphibian population declines in Latin America: a synthesis. **Biotropica**, v. 37, p. 222 – 226, 2005.

LONGCORE, J. E.; PESSIER, A. P.; NICHOLS, D. K. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et. sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. **Mycologia**, v. 91, p. 219-227, 1999.

MAZZONI, R.; CUNNINGHAM, A. A.; DASZAK, P.; APOLO, A.; PERDOMO, E.; SPERANZA, G. Emerging pathogen of wild amphibians in frog (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. **Emerging Infectious Disease**, v. 79, p. 995 – 998, 2003.

MOREHOUSE, E. A.; JAMES, T. Y.; GANLEY, A. R. D.; VILGALYS, R.; BERGER, L.; MURPHYS, P. J.; LONGCORE, J. E. Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently clone. **Molecular Ecology**, v 12, p. 395 – 403, 2003.

OIE – WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, Aquatic Animal Health Code, Chapter 2.4.1: Infection with *Batrachochytrium dendrobatidis*. Acessible at http://www.oie.int/eng/normes/fcode/fcode2008/en_chapitre_2.4.1.htm. Acesso em 25 de janeiro de 2011.

ORR, R. T. **Biologia dos vertebrados**. São Paulo: Editora Roca, 1986, 508p.

PESSIER, A. P.; NICHOLS, D. K.; LONGCORE, J. E.; FULLER, M. S. Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 194 – 199, 1999.

POUGH, F. H; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. Salamandras, anuros e cecílias. In:_____. **A vida dos vertebrados**. 4 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008. p 220 – 261.

POUNDS, J. A.; BUSTAMANTE, M. R.; COLOMA, L. A.; CONSUEGRA, J. A.; FOGDEN, M. P.; FOSTER, P. N.; La MARCA, E.; MASTERS, K. L.; MERINO-VITERI, A.; PUSCHENDORF, R.; RON, S. R.; SANCHEZ-AZOFEITA, G. A.; STILL, C; J.; YOUNG, B. E. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. **Nature**, v. 439, p. 161 – 167, 2006.

RACHOWICZ, L. J.; HERO, J.; ALFORD, R.; TAYLOR, J. W.; MORGAN, J. A. T.; VREDENBURG, V. T.; COLLINS, J. P.; BRIGGS, C. J. The novel and endemic pathogen hypothesis: Competing explanations for the origin of emerging infectious diseases of wildlife. **Conservation Biology**, v. 19, p. 1441 – 1448, 2005.

RETTALICK, R. W. R.; McCALLUM, H.; SPEARE, R. Endemic infection of amphibian chytrid fungus in a frog community post-decline. **Public Library of Science – Biology**, v. 2, p. 1965 – 1971, 2004.

RETTALICK, R. W. R.; MIERA, V.; RICHARDS, K. L.; FIELD, K. J.; COLLINS, J. P. A non-lethal technique for detecting the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* on tadpoles. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 72, p. 77 – 85, 2006.

ROLLINS-SMITH, L. A.; CAREY, C.; LONGCORE, J.; DOERSAM, J. K.; BOUTTE, A.; BRUZGAL, J. E.; CONLON, J. M. Activity of antimicrobial skin peptides from ranid frogs against *Batrachochytrium dendrobatidis*, the chytrid fungus associated with global amphibian declines. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 26, p. 471 – 479, 2002.

RON, S. R. Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the new world. **Biotropica**, v. 37, p.209 – 221, 2005.

SCHMIDT-NIELSEN, K., **Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente**. 5 ed. São Paulo: Editora Santos, 2002. 611p.

SHAPIRO, H. A.; ZWARENSTEIN, H. A rapid test for pregnancy on *Xenopus laevis*. **Nature**, v. 133, p. 762, 1934 apud WELDON, C.; PREEZ, L. H.; HYATT, A. D.; MULLER, R.; SPEARE, R. Origin of amphibian chytrid fungus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, p. 2100 – 2105, 2004.

SILVANO, D. L.; SEGALLA, M. V. Conservação de anfíbios no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 79 – 86, 2005

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. Brazilian amphibians: list of species. 2010. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.thm>. Acesso em 7 de fevereiro de 2011.

SYMONDS, E. P. Amphibian disease and declines: Chytridiomycosis. **Australia Microbiology**, v. 26, p. 85 – 86, 2005.

TAYLOR, S.K.; GREEN, D.E.; WRIGHT, K.M.; WHITAKER, B. R. **Amphibian medicine and captive husbandry**. Malabar: Krieger Publishing Co, 2001, 570p.

TOLEDO, L. F.; HADDAD, C. F. B.; CARNAVAL, A. C. O. Q.; BRITTO, F. B. A Brazilian anuran (*Hylodes magalhaesi*: *Leptodactylidae*) infected by *Batrachochytrium dendrobatidis*: a conservation concern. **Amphibian and Reptile Conservation**, v. 4, p. 17 – 21, 2006a.

TOLEDO, L. F.; BRITTO, F. B.; ARAÚJO, O. G. S.; GIASSEN, L. M. O.; HADDAD, C. F. B. The occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil and the inclusion of 17 new cases of infection. **South American Journal of Herpetology**, v. 3, p. 185 - 191, 2006b.

VOYLES, J.; YOUNG, S.; BERGER, L.; CAMPBELL, C.; VOYLES W. F.; DINUDOM, A.; COOK; WEBB, R.; ALFORD, R. A.; SKERRATT, L. F.; SPEARE, R. Pathogenesis of chytridiomycosis: a cause of catastrophic amphibian declines. **Science**, v. 326, p. 582 – 585, 2009.

WEIGOLDT, P. Changes in the composition of mountain stream frog communities in the Atlantic mountains of Brazil: frogs as indicators of environmental deteriorations? **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 24, p. 249 – 255, 1989.
WELDON, C.; PREEZ, L. H.; HYATT, A. D.; MULLER, R.; SPEARE, R. Origin of amphibian chytrid fungus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, p. 2100 – 2105, 2004.

WELL, K., D. Conservation of Amphibian In:____ **The ecology and behavior of amphibians**, Chicago: University of Chicago Press, 2007, p. 784 - 856.

WILLIAMS, E. S.; YUILL, T.; ARTOIS, M.; FISCHER, J.; HAIGH, S. A. Emerging infectious diseases in wildlife. **Revue Scientifique et Technique – Office International des Epizooties**. v. 21, p. 139 – 157, 2002.

ANEXO A: Caracterização taxonômica e detecção de *Batrachochytrium dendrobatidis* nos animais estudados.

AMOSTRAS	FAMÍLIA	ESPÉCIE	DETECÇÃO DO <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>
1	Hylodidae	<i>Hylodes asper</i>	NEGATIVO
2	Hylodidae	<i>Hylodes asper</i>	NEGATIVO
3	Hylodidae	<i>Hylodes asper</i>	NEGATIVO
4	Hylodidae	<i>Hylodes asper</i>	NEGATIVO
5	Hylodidae	<i>Hylodes asper</i>	NEGATIVO
6	Hylodidae	<i>Hylodes asper</i>	NEGATIVO
7	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus latrans</i>	NEGATIVO
8	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus latrans</i>	NEGATIVO
9	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus latrans</i>	NEGATIVO
10	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus latrans</i>	NEGATIVO
11	Hylidae	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	NEGATIVO
12	Hylidae	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	NEGATIVO
13	Hylidae	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	NEGATIVO
14	Hylidae	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	NEGATIVO
15	Brachycephatidae	<i>Ischnocnema guentheri</i>	NEGATIVO
16	Hylidae	<i>Scinax alter</i>	POSITIVO
17	Hylidae	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	NEGATIVO
18	Hylidae	<i>Scinax hayii</i>	NEGATIVO
19	Hylidae	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	NEGATIVO
20	Hylidae	<i>Scinax hayii</i>	NEGATIVO
21	Hylidae	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	NEGATIVO
22	Hylidae	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	NEGATIVO
23	Brachycephatidae	<i>Ischnocnema juipoca</i>	NEGATIVO
24	Brachycephatidae	<i>Ischnocnema juipoca</i>	NEGATIVO
25	Hylidae	<i>Scinax hayii</i>	NEGATIVO
26	Leiuperidae	<i>Adenomera marmorata</i>	NEGATIVO
27	Hylidae	<i>Dendropsophus minutus</i>	NEGATIVO
28	Hylidae	<i>Scinax alter</i>	NEGATIVO
29	Hylidae	<i>Dendropsophus minutus</i>	NEGATIVO
30	Hylidae	<i>Scinax alter</i>	POSITIVO
31	Hylidae	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	NEGATIVO
32	Hylidae	<i>Scinax alter</i>	NEGATIVO
33	Hylidae	<i>Scinax alter</i>	NEGATIVO
34	Hylidae	<i>Scinax alter</i>	NEGATIVO
35	Hylidae	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	NEGATIVO
36	Hylidae	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	NEGATIVO
37	Hylodidae	<i>Hylodes asper</i>	NEGATIVO
38	Hylodidae	<i>Hylodes asper</i>	NEGATIVO
39	Hylodidae	<i>Hylodes asper</i>	NEGATIVO

Continua

Continuação

40	Hylidae	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	NEGATIVO
41	Leiuperidae	<i>Physalaemus cuvieri</i>	NEGATIVO
42	Leiuperidae	<i>Adenomera marmorata</i>	NEGATIVO
43	Brachycephatidae	<i>Ischnocnema parva</i>	NEGATIVO
44	Leiuperidae	<i>Paratelmatobius cardosi</i>	NEGATIVO
45	Hylidae	<i>Dendropsophus minutus</i>	NEGATIVO
46	Brachycephatidae	<i>Ischnocnema juipoca</i>	NEGATIVO
47	Hylidae	<i>Dendropsophus minutus</i>	POSITIVO
48	Brachycephatidae	<i>Ischnocnema radorum</i>	POSITIVO
49	Brachycephatidae	<i>Ischnocnema sp</i>	POSITIVO
50	Hylidae	<i>Scinax crospedophilus</i>	NEGATIVO
51	Hylidae	<i>Scinax crospedophilus</i>	NEGATIVO
52	Hylidae	<i>Aplastodiscus arildae</i>	POSITIVO
53	Hylidae	<i>Hypsiboas faber</i>	POSITIVO
54	Hylidae	<i>Hypsiboas faber</i>	POSITIVO
55	Hylidae	<i>Aplastodiscus leucopygius</i>	POSITIVO
56	Hylidae	<i>Aplastodiscus arildae</i>	NEGATIVO
57	Hylidae	<i>Scinax crospedophilus</i>	NEGATIVO
58	Hylidae	<i>Bokermannohyla astartea</i>	NEGATIVO
59	Hylidae	<i>Hypsiboas faber</i>	POSITIVO
60	Hylodidae	<i>Hylodes asper</i>	POSITIVO
61	Hylidae	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	NEGATIVO
62	Hylidae	<i>Bokermannohyla astartea</i>	NEGATIVO
63	Hylidae	<i>Bokermannohyla astartea</i>	NEGATIVO
64	Hylidae	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	NEGATIVO
65	Hylidae	<i>Bokermannohyla astartea</i>	NEGATIVO
66	Hylidae	<i>Bokermannohyla circundata</i>	NEGATIVO
67	Hylidae	<i>Aplastodiscus arildae</i>	NEGATIVO
68	Hylidae	<i>Aplastodiscus albosignatus</i>	NEGATIVO
69	Hylidae	<i>Scinax crospedophilus</i>	NEGATIVO
70	Hylidae	<i>Dendropsophus minutus</i>	NEGATIVO
71	Hylidae	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	POSITIVO
72	Hylidae	<i>Bokermannohyla astartea</i>	NEGATIVO
73	Hylidae	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	POSITIVO
74	Hylidae	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	POSITIVO
75	Hylidae	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	POSITIVO
76	Hylodidae	<i>Hylodes asper</i>	POSITIVO
77	Hylidae	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	NEGATIVO
78	Hylidae	<i>Scinax crospedophilus</i>	NEGATIVO

ANEXO B: Licença Ambiental do Ibama



DIRETORIA DE BIODIVERSIDADE
GERÊNCIA DE PROJETOS E PESQUISAS

LICENÇA PARA REALIZAÇÃO DE PESQUISAS EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO					
Nº LICENÇA	UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	RESPONSÁVEL PELA UC	ENDEREÇO	CONTATO	ASSINATURA RESPONSÁVEL UC
076/09	Parque Estadual Rio Doce	Marcus Vinícios de Freitas	Marliéria - MG CEP: 35.185-000	(31) 3822-3006 (31) 9988-6186	

Esta licença será válida apenas com a autenticação do responsável pela(s) Unidade(s) de Conservação

- PERÍODO DE VALIDADE: 22 Setembro de 2009 a 17 Julho 2010
- TÍTULO DO PROJETO: Mudanças Climáticas e predição de endemismo no corredor central de Floresta Atlântica.
- RESPONSÁVEL PELO PROJETO: Miguel Trefaut Urbano Rodrigues
- DEMAIS INTEGRANTES: Mauro Teixeira Junior, Renato Sousa Recorder, José Cassimiro, Renata Cecília Amaro, Ana Carolina Carnaval, Craig Moritz, Roberta Damaceno, Catia de Paula, Agustín Camacho Guerreiro, Márcia Laguna, Marco Aurélio de Sana, José Mario Ghellere.
- INSTITUIÇÃO: Biociências, Universidade de São Paulo- Zoologia
- ENDEREÇO: Rua Matão, Travessa 14,321 NºSala: 102 Bairro: Cidade Universitária- São Paulo-SP
- CONTATO: Tel: (11) 3091-7570 ou (11) 3091-7513 E-mail: mturodri@usp.br

OBSERVAÇÕES: Esta licença autoriza coleta/transporte/captura de material biológico, do Amphibia (*Qtde:10), Testudinidae (*Qtde: 5), Chelidae (*Qtde: 5) e em caso de encontrar mortes nas armadilhas, Rodentia (*Qtde: 5), Squamata (*Qtde: 5), Didelphimorphia (*Qtde:5).
Quantidade de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

OBSERVAÇÕES:

- 1- Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Estadual, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
- 2- Esta autorização não exime o titular e a 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.
- 3- O projeto poderá ser cancelado pelo órgão, caso o executor não atenda as normas exigidas para controle das pesquisas.
- 4- Caso a Licença seja indeferida ou o projeto seja cancelado, favor entrar em contato com a GPRO, o mais rápido possível.
- 5- Conforme o Termo de Compromisso o responsável pela expedição deverá apresentar relatório final ao término da validade desta licença, além de encaminhar cópia das publicações resultantes dos trabalhos objeto da presente licença.
- 6- Esta licença não autoriza captura/ transporte de material biológico nas áreas de influência de empreendimentos sujeito ao licenciamento ambiental, conforme resolução do CONAMA de nº 237 de 19/12/97, salvo quando especificado
- 7- Esta licença não autoriza o uso de material biológico para acessar informação de origem genética, contida no todo ou parte de espécie vegetal, fúngico, microbiano ou animal, em subprodutos provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições in situ, inclusive domesticado, ou mantidos em coleções ex situ, desde que coletados em condições in situ, no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial de acordo com Medida Provisória nº 2.052 de 29 de junho de 2000 e Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de Agosto de 2001
- 8- Válida exclusivamente no estado de Minas Gerais
- 9- Esta licença não autoriza:
 - captura/coleta/transporte de espécies ameaçadas de extinção, salvo quando constante de projeto específico aprovado;
 - captura/coleta/transporte de fauna e flora em áreas de domínio privado, sem o consentimento expresso ou tácito do proprietário nos termos dos artigos 594, 595, 596, 597 e 598 do código civil;
 - captura/coleta/transporte de fauna e flora em unidades de conservação federais, estaduais, distritais ou municipais, salvo quando acompanhadas do consentimento do órgão administrador competente;
- 10- Válida somente sem emendas ou rasuras.

O pesquisador deverá estar sempre acompanhado deste documento, para apresentá-lo as autoridades.

Data de Emissão:	Assinatura do responsável pela Licença
22/09/09	 José Medina de Faria Gerente de Projetos e Pesquisas

Rua Espírito Santo, 485 - 9º Andar Bairro: Centro São Horizonte/MG CEP: 30160-030
Tel: (31) 3219-5548/5546/5553 E-mail: pesquisa@prop@meloambiente.mg.gov.br



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: 14555-4	Data da Emissão: 11/09/2009 15:18
Dados do titular	
Nome: Miguel Trefaut Urbano Rodrigues	CPF: 011.275.058-31
Título do Projeto: Sistemática e Evolução de Répteis, Anfíbios e pequenos mamíferos neotropicais	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS	CNPJ: 03.025.530/0004-57

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coletas de vertebrados terrestres em diversas localidades em território nacional	02/2008	12/2011

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

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 passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, a difusão ou a pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a 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.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. 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 fora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
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 estirpe de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	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, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Outras ressalvas

1	As armadilhas de queda deverão ser vistoriadas pelo menos duas vezes ao dia (matutino e vespertino) e possuir mecanismos para minimizar a morte dos animais devido a hipotermia e/ou por afogamento (na época chuvosa), com a colocação de uma camada de isopor ou espuma e furor na base. Também deverão ser retiradas ou permanecer inativas (fechadas), durante os intervalos de amostragem.
2	O pesquisador estrangeiro Agustin Camacho Guerrero está dependente de autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia. Vinculado a programa de bolsa ou auxílio à pesquisa patrocinado pela CAPES. O pesquisador estrangeiro Craig Charles Moritz está relacionado ao processo CNPq - Expedição Científica (AEX/ASCIN/CNPQ 10385/2009-6) e depende de Portaria emitida pelo CNPq/MCT.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Mauro Teixeira Junior	Estudante de Pós Graduação	303.560.738-83	338.36684-2 SSP-SP	Brasileira
2	Daniel Mohiute Carolino	Estudante de Pós Graduação	283.779.208-08	280.176.13X SSP-TO	Brasileira
3	Roberto do Val Vieira	Estudante de Pós Graduação	165.927.918-61	14.828.857-1 SSP-SP	Brasileira
4	Maria José de Jesus Silva	Colaborador	103.358.398-78	166.478.48 SSP-SP	Brasileira
5	João Mário Belotti Chellere	Estagiário	260.624.808-99	32652643-x ssp-SP	Brasileira
6	Jose Casimiro da Silva Junior	Estudante de Pós Graduação	870.773.536-72	M6.836.380 SSP-MG-MG	Brasileira
7	Renata Moretti	Estudante de Pós Graduação	270.256.528-06	280824683 SSP-SP	Brasileira
8	Helena Mary Alves Pinto	Estagiário	342.950.988-25	44.558.661-4 SSP-SP	Brasileira
9	ULIAN DUARTE DE MATOS	Estagiário	301.430.428-07	34820418-8 SSP-SP	Brasileira
10	Rodrigo Marques Lima dos Santos	Colaborador	260.703.698-40	26.129.9347 SSP-SP-SP	Brasileira
11	Agustín Camacho Guerrero	Estagiário	737.149.251-04	350970 E DELB/MG-SP	Estrangeira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 154/2007. 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: 53652878



Página 1/5



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 14555-4	Data da Emissão: 11/09/2009 15:18
----------------	-----------------------------------

Dados do titular	
Nome: Miguel Trefaut Urbano Rodrigues	CPF: 011.275.058-31
Título do Projeto: Sistemática e Evolução de Répteis, Anfíbios e pequenos mamíferos neotropicais	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS	CNPJ: 63.025.530/0004-57

2	3	Naren Ventura	Estudante de Pós Graduação	286.798.848-98	29400952-8 SSP-SP	Brasileira
3	4	Luís Fábio Silveira	Colaborador	884.171.156-68	m6601877 SSP-MG-MG	Brasileira
4	5	Katia Cristina Machado Pellegrino	Colaborador	128.311.698-79	16649904-6 SSP-SP	Brasileira
5	6	Renata Cecília Amaro Ghilardi	Colaborador	186.792.798-54	24317317-9 SSP-SP	Brasileira
6	7	SILMAR RODRIGUES GEURGAS	Colaborador	195.203.428-00	18315095 SSP-SP	Brasileira
7	8	Tamri Mott	Colaborador	130.907.868-88	25000008-0 SSP-SP	Brasileira
8	9	Vanessa Khuth Vardade	Colaborador	163.903.938-21	22865266-2 SSP-SP	Brasileira
9	0	NORALY SHAWEN LIQU	Estudante de Pós Graduação	290.622.598-39	261860763 SSP-SP	Brasileira
0	1	Sergio Marques de Souza	Estagiário	223.962.268-78	282779590 SSP-SP	Brasileira
1	2	Marcia Maria Laguna	Estagiário	342.560.748-05	28.774.526-0 SPP-SP	Brasileira
2	3	Juliana Gussion Roscio	Estudante de Pós Graduação	313.571.618-08	332014216 SSP-SP	Brasileira
3	4	DANTE PAVAN	Colaborador	140.560.438-76	31076-01 CRBIO-SP	Brasileira
4	5	Felipe Franco Curcio	Estudante de Pós Graduação	260.593.368-10	24914020-1 SSP-SP	Brasileira
5	6	Renatto Recorder	Estagiário	221.657.568-20	29692720x.ssp-sp	Brasileira
6	7	Pedro Munilo Sales Nunes	Estudante de Pós Graduação	263.459.408-95	24476934-5 SSP-SP	Brasileira
7	8	Yatayo Yonenaga Yasuda	Colaborador	219.198.108-97	2930762 SSP-SP	Brasileira
8	9	Maira Conostre	estagiária	283.945.028-30	30341974X SSP-SP	Brasileira
9	0	Antonio Mollo Neto	estagiário	361.676.648-62	340699022 SSP/SP-SP	Brasileira
0	1	Roberta Pacheco Damasceno	colaboradora	948.181.425-49	0753941112 SSP-BA	Brasileira
1	2	Ara Carolina Oliveira de Queiroz Camaval	colaboradora	018.737.107-55	08497528-3 IFF-RJ	Brasileira
2	3	Marco Aurélio de Sena	estagiário	255.521.578-69	24179674-x SSP-SP	Brasileira
3	4	Craig Charles Moritz	Colaborador		-	Estrangeira



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 14555-4	Data da Emissão: 11/09/2009 15:18
Dados do titular	
Nome: Miguel Trefaut Urbano Rodrigues	CPF: 011.275.068-31
Título do Projeto: Sistemática e Evolução de Répteis, Anfíbios e pequenos mamíferos neotropicais	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS	CNPJ: 63.025.530/0004-57

8	GO	todo o estado	Fora de UC
9	GO	todo o estado	Fora de UC
10	MA	todo o estado	Fora de UC
11	MA	todo o estado	Fora de UC
12	MA	todo o estado	Fora de UC
13	MT	todo o estado	Fora de UC
14	MT	todo o estado	Fora de UC
15	MT	todo o estado	Fora de UC
16	MS	todo o estado	Fora de UC
17	MS	todo o estado	Fora de UC
18	MS	todo o estado	Fora de UC
19	MS	todo o estado	Fora de UC
20	PA	todo o estado	Fora de UC
21	PB	todo o estado	Fora de UC
22	PB	todo o estado	Fora de UC
23	PR	todo o estado	Fora de UC
24	PE	todo o estado	Fora de UC
25	PI	todo o estado	Fora de UC
26	RJ	todo o estado	Fora de UC
27	RN	todo o estado	Fora de UC
28	RN	todo o estado	Fora de UC
29	RS	todo o estado	Fora de UC
30	RO	todo o estado	Fora de UC
31	RR	todo o estado	Fora de UC
32	SC	todo o estado	Fora de UC
33	SP	todo o estado	Fora de UC
34	SE	todo o estado	Fora de UC
35	SE	todo o estado	Fora de UC
36	TO	todo o estado	Fora de UC
37	TO	todo o estado	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Rodentia, Lagomorpha, Didelphimorphia, Crocodylia, Chiroptera, Amphibia, Chelidae, Emydidae, Kinosternidae, Podocnemididae, Testudinidae, Squamata
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Chelidae, Emydidae, Kinosternidae, Podocnemididae, Testudinidae, Squamata, Amphibia, Chiroptera, Crocodylia, Didelphimorphia, Lagomorpha, Rodentia
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Chiroptera ("Ord: 5), Crocodylia ("Ord: 5), Didelphimorphia ("Ord: 5), Lagomorpha ("Ord: 5), Rodentia ("Ord: 5), Amphibia ("Ord: 16), Podocnemididae ("Ord: 5), Kinosternidae ("Ord: 5), Emydidae ("Ord: 5), Chelidae ("Ord: 5), Squamata ("Ord: 16), Testudinidae ("Ord: 5)

* Ord: de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Ovos, Animal morto ou partes (carcaça/ossos/pele, Fragmento de tecido/orgão)
2	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Animal morto ou partes (carcaça/ossos/pele, Fragmento de tecido/orgão)
3	Amostras biológicas (Répteis)	Ecdise, Ovos, Regurgitação/conteúdo estomacal, Animal morto ou partes (carcaça/ossos/pele)
4	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Armadilha de queda "pit fall", Funil trap, Captura manual
5	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Captura manual, Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman"), Armadilha de queda "pit fall"
6	Método de captura/coleta (Répteis)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman"), Biscoito, Captura manual, Armadilha de queda "pit fall"

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. 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: 53652878



Página 3/5



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 14555-4		Data da Emissão: 11/09/2009 15:18
Dados do titular		
Nome: Miguel Trefaut Urbano Rodrigues		CPF: 011.275.058-31
Título do Projeto: Sistemática e Evolução de Répteis, Anfíbios e pequenos mamíferos neotropicais		
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS		CNPJ: 63.025.530/0004-57
Destino do material biológico coletado		
#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo	coleção
2	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS	coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. 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: 53652878



Página 4/5



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 14555-4	Data da Emissão: 11/09/2009 15:18
Dados do titular	
Nome: Miguel Trefaut Urbano Rodrigues	CPF: 011.275.068-31
Título do Projeto: Sistemática e Evolução de Répteis, Anfíbios e pequenos mamíferos neotropicais	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS	CNPJ: 63.025.530/0004-57

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, 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).

Taxon*	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 nº154/2007. 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: 53652878



Página 5/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14555-2	Data da Emissão: 24/03/2009 17:07	Data de Validade: 24/03/2010
Dados do titular		
Registro no bama: 1616381	Nome: Miguel Trefaut Urbano Rodrigues	CPF: 011.275.058-31
Título do Projeto: Sistemática e Evolução de Répteis, Anfíbios e pequenos mamíferos neotropicais		
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS		CNPJ: 63.025.530/0004-57

Observações, ressalvas e condicionantes

1	As atividades de campo deverão ser realizadas por pessoal qualificado, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, sendo permitido coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes de sítios de sítios e outros papéis, peças e passagens, outdoors, por meio de circuitos e locais que se destinam ao estudo, à pesquisa, à educação e à preservação, sendo necessária a autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular da equipe da necessidade de obter as licenças necessárias em outros órgãos e/ou locais, bem como do cumprimento das responsabilidades da área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades relacionadas ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deve ser utilizado para atividades científicas e distribuído no âmbito do ensino e pesquisa.
4	A autorização para uso ao exterior de material biológico não confere direito de exportação de material biológico para o exterior, conforme o artigo 11 da Lei nº 11.073/2004 - Lei de Proteção à Importação e Exportação de Bens e Serviços - CITES e não CITES. Em caso de material originário, consulte www.ibama.gov.br/bio/bio-mat para exportação.
5	O titular da autorização e os membros da equipe devem optar por métodos de coleta instrumentais de captura direcionada, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou danos significativos a outros grupos; e empregar sempre de coleta ou captura que não comprometa a estabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condições de vida.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre o acesso a componentes do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental, na zona econômica exclusiva, no acervo genético tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador deverá obter a autorização desta Unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para a realização das coletas e de uso da infraestrutura da Unidade.
8	As atividades com emprego desta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais de abrangência nacional, estaduais ou municipais de espécies ameaçadas de extinção, sobrepostas ou ameaçadas de sobreproteção.

Outras ressalvas

1	As armadilhas de queda deverão ser visitadas pelo menos duas vezes ao dia (matutino e vespertino) e possuir mecanismos para minimizar a morte dos animais devido a hipotermia e/ou por afogamento (na época chuvosa), com a colocação de uma camada de isopor ou espuma e furos na base. Também deverão ser retiradas ou permanecer inativas (fechadas), durante os intervalos de amostragem.
2	As atividades do pesquisador estrangeiro Miguel Trefaut Urbano Rodrigues estão dispensadas de autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia por ter vínculo empregatício com instituição brasileira de pesquisa e ensino superior, bem como as de Agostin Camacho Guernero, que é bolsista da CAPES.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Cod. Identidade	Nacionalidade
1	Mario Teixeira Junior	Estradante de Pós Graduação	303.569.736-83	33836654-2 SSP-SP	Brasil
2	Daniel Micheline Carolino	Estradante de Pós Graduação	283.779.208-08	29017613X SSP-TO	Brasil
3	Roberto do Val Vilela	Estradante de Pós Graduação	165.927.318-61	14.828.881-1 SSP-SP	Brasil
4	Marla José de Jesus Silva	Colaborador	103.368.396-15	16541849 SSP-SP	Brasil
5	José Manoel Braga de Almeida	Estradante	250.624.908-49	32552643X SSP-SP	Brasil
6	José Carmineiro da Silva Junior	Estradante de Pós Graduação	89.0.77.35.36-72	84-6.536.360 SSP-MG-MG	Brasil
7	Reis da Moeda	Estradante de Pós Graduação	27.0.25.65.28-05	28082483 SSP-SP	Brasil
8	Helena Nery Alves Filho	Estradante	342.968.988-25	44.858.651-4 SSP-SP	Brasil
9	LILIAN DUARTE DE MATOS	Estradante	301.430.428-07	34820418-8 SSP-SP	Brasil
10	Rodrigo Marques Lima dos Santos	Colaborador	250.703.658-00	25.129.501-7 SSP-SP-SP	Brasil
11	Agustín Camacho Guernero	Estradante	737.149.251-04	350970E DELEMIG-SP	Estrangeiro
12	Helena Vilela	Estradante de Pós Graduação	256.798.848-98	29400952-8 SSP-SP	Brasil
13	Leite Fábio Silveira	Colaborador	894.171.156-68	m5601877 SSP-MG-MG	Brasil

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa bama nº164/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do ibama.gov.br/sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 71689333



Página 1/6



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14555-2	Data da Emissão: 24/03/2009 17:07	Data de Validade: 24/03/2010
Dados do titular		
Registro no Ibama: 1616381	Nome: Miguel Trefaut Urbano Rodrigues	CPF: 011.275.058-31
Título do Projeto: Sistemática e Evolução de Répteis, Anfíbios e pequenos mamíferos neotropicais		
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS		CNPJ: 63.025.530/0004-57

1	Reata Cristina Macielado Pelegriño	Colaborador	128.311.596-7-9	15649804-6 SSP-SP	Brasil
1	Reata Cecília Amaro Gilardi	Colaborador	186.792.796-6-4	24317317-9 SSP-SP	Brasil
1	SILVIA RODRIGUES GEORGAS	Colaborador	195.203.428-00	18315095 SSP-SP	Brasil
1	Tani Mori	Colaborador	130.907.555-85	25050008-0 SSP-SP	Brasil
1	Valesca Kishi Verdade	Colaborador	153.903.938-21	22865266-2 SSP-SP	Brasil
1	NORALY SHAWEN LIU	Estudante de Pós Graduação	290.622.595-39	261850763 SSP-SP	Brasil
2	Sergio Marques de Souza	Estagiário	223.962.268-7-8	282719590 SSP-SP	Brasil
2	Marcia Maria Lagnia	Estagiário	342.960.748-05	28.774.526-0 SSP-SP	Brasil
2	Júlia Gussio Rosotto	Estudante de Pós Graduação	313.571.618-08	332914215 SSP-SP	Brasil
2	DANTE PAVAN	Colaborador	140.960.438-7-6	3107601 CRB IO-SP	Brasil
2	Felipe Franco Cricio	Estudante de Pós Graduação	260.593.388-10	24914020-1 SSP-SP	Brasil
2	Reato Recordar	Estagiário	221.667.568-20	296927201 ssp-SP	Brasil
2	Pedro Mirib Saler Nunes	Estudante de Pós Graduação	263.459.408-95	24476934-6 SSP-SP	Brasil
2	Yatyo Yonekaga Yasuda	Colaborador	219.198.105-97	2830762 SSP-SP	Brasil
2	Marta Coimbra	estagiário	283.945.028-30	30341974X SSP-SP	Brasil
2	Armando Mello Neto	estagiário	361.676.645-62	340959022 ssp-SP-SP	Brasil
3	Roberta Paolino Damasceno	colaboradora	948.181.425-4-9	0753941112 SSP-BA	Brasil
3	Ara Carolina Oliveira de Oliveira Canaval	colaboradora	018.737.107-65	08497525-3 IFP-RJ	Brasil
3	Marco Aurélio de Souza	estagiário	265.621.578-69	24479674-x SSP-SP	Brasil

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Designação do local	Tipo
1		AC	todo o estado	Faixa de UC
2		AL	todo o estado	Faixa de UC
3		AL	todo o estado	Faixa de UC
4		AP	todo o estado	Faixa de UC
5		BA	todo o estado	Faixa de UC
6		BA	todo o estado	Faixa de UC
7		ES	todo o estado	Faixa de UC
8		GO	todo o estado	Faixa de UC
9		GO	todo o estado	Faixa de UC
10		MA	todo o estado	Faixa de UC

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº164/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 71689333



Página 2/6



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14555-2	Data da Emissão: 24/03/2009 17:07	Data de Validade: 24/03/2010
Dados do titular		
Registro no Ibama: 1616381	Nome: Miguel Trefaut Urbano Rodrigues	CPF: 011.275.058-31
Título do Projeto: Sistemática e Evolução de Répteis, Anfíbios e pequenos mamíferos neotropicais		
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS		CNPJ: 63.025.530/0004-57

11	MA	todo o estado	Fo de UC
12	MA	todo o estado	Fo de UC
13	MT	todo o estado	Fo de UC
14	MT	todo o estado	Fo de UC
15	MT	todo o estado	Fo de UC
16	MS	todo o estado	Fo de UC
17	MS	todo o estado	Fo de UC
18	MS	todo o estado	Fo de UC
19	MS	todo o estado	Fo de UC
20	PA	todo o estado	Fo de UC
21	PA	todo o estado	Fo de UC
22	PA	todo o estado	Fo de UC
23	PR	todo o estado	Fo de UC
24	PR	todo o estado	Fo de UC
25	PI	todo o estado	Fo de UC
26	RJ	todo o estado	Fo de UC
27	RN	todo o estado	Fo de UC
28	RN	todo o estado	Fo de UC
29	RS	todo o estado	Fo de UC
30	RO	todo o estado	Fo de UC
31	RR	todo o estado	Fo de UC
32	SC	todo o estado	Fo de UC
33	SP	todo o estado	Fo de UC
34	SE	todo o estado	Fo de UC
35	SE	todo o estado	Fo de UC
36	TO	todo o estado	Fo de UC
37	TO	todo o estado	Fo de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captação de animais silvestres in situ	Rodentia, Lagomorphia, Didymophila, Crocodylia, Chiroptera, Amphibia, Ciliata, Eurydidae, Klorididae, Podocemididae, Testudinidae, Squamata
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Ciliata, Eurydidae, Klorididae, Podocemididae, Testudinidae, Squamata, Amphibia, Chiroptera, Crocodylia, Didymophila, Lagomorphia, Rodentia
3	Coleta/transporte de espécimes de animais silvestres in situ	Chiroptera (Ord: S), Crocodylia (Ord: S), Didymophila (Ord: S), Lagomorphia (Ord: S), Rodentia (Ord: S), Amphibia (Ord: S), Podocemididae (Ord: S), Klorididae (Ord: S), Eurydidae (Ord: S), Ciliata (Ord: S), Squamata (Ord: S), Testudinidae (Ord: S)

*Ord: de indivíduos por espécie/localidade/atividade de coleta, a ser coletado durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Ovar, Análise morfológica (caracal, cor, peso, etc.) e fragmento de tecido biológico
2	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Análise morfológica (caracal, cor, peso, etc.) e fragmento de tecido biológico
3	Amostras biológicas (Répteis)	Ovar, Ovar, Registração fotográfica e etimológica, Análise morfológica (caracal, cor, peso, etc.)
4	Método de captura (Anfíbios)	Amadilla de queda "pitfall", Felt trap, Captura manual
5	Método de captura (Outros mamíferos)	Captura manual, Amadilla tipo gaiola com atração por flocos ("Box Trap/Tomahawk/Siemax"), Amadilla de queda "pitfall"
6	Método de captura (Répteis)	Amadilla tipo gaiola com atração por flocos ("Box Trap/Tomahawk/Siemax"), Elástico, Captura manual, Amadilla de queda "pitfall"

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº164/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 71689333



Página 3/6



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14565-2	Data da Emissão: 24/03/2009 17:07	Data de Validade: 24/03/2010
Dados do titular		
Registro no Ibama: 1616381	Nome: Miguel Trefaut Urbano Rodrigues	CPF: 011.275.068-31
Título do Projeto: Sistemática e Evolução de Répteis, Anfíbios e pequenos mamíferos neotropicais		
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS		CNPJ: 63.025.530/0004-57

Destino do material biológico coletado

#	Nome total do destino	tipo Destino
1	Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo	colecção
2	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS	colecção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 71689333

Página 4/6



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14555-2	Data da Emissão: 24/03/2009 17:07	Data de Validade: 24/03/2010
Dados do titular		
Registro no Iama: 1616381	Nome: Miguel Trefaut Urbano Rodrigues	CPF: 011.275.058-31
Título do Projeto: Sistemática e Evolução de Répteis, Anfíbios e pequenos mamíferos neotropicais		
Nome da Instituição : UNIMERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCENCIAS		CNPJ: 63.025.530/0004-67

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº 54/2007, a coleta imprévisita 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 imprévisita 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 imprévisita, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CNCBO).

[illegible]

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 71689333



Página 55