



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE BIOLOGIA E QUÍMICA
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ANÁLISE DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS NO FÍGADO DE
Leptodactylus macrosternum (ANURA: Leptodactylidae)**

JOSÉ LUCAS DE ARAÚJO

CUITÉ - PB

2017

JOSÉ LUCAS DE ARAÚJO

**ANÁLISE DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS NO FÍGADO DE
Leptodactylus macrosternum (ANURA: Leptodactylidae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Cuité, Paraíba, como requisito parcial para aquisição do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Frazão Chaves

CUITÉ - PB

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes - CRB 15 - 256

A663a Araújo, José Lucas de.

Análise de proteínas e carboidratos no fígado de *Leptodactylus macrosternum* (ANURA: Leptodactylidae). / José Lucas de Araújo. - Cuité: CES, 2017.

37 fl.

Monografia (Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas) - Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2017.

Orientador: Márcio Frazão Chaves.

1. Caatinga. 2. Pluviosidade. 3. Temperatura. 4. Histoquímica. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 504.75

JOSÉ LUCAS DE ARAÚJO

**ANÁLISE DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS NO FÍGADO DE
Leptodactylus macrosternum (ANURA: Leptodactylidae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de Campina Grande,
Centro de Educação e Saúde, Cuité, Paraíba, como requisito parcial para aquisição do
título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Aprovado em ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Frazão Chaves
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG/CES
(Orientador)

Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG/CES

Prof^a. Dr^a. Kiriaki Nurit Silva
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG/CES

Prof^a. Dr^a. Michelle Gomes Santos
(Suplente)
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG/CES

À minha avó, Maria das Graças, aos meus pais, Ana Patrícia e Gilvan Araújo pelo incentivo de sempre. E em especial, ao meu avô Severino Jerônimo (in memoriam).

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar sabedoria para não desistir em momentos difíceis e pela força divina diariamente.

Ao Centro de Educação e Saúde (CES) pela oportunidade em ofertar conhecimento e à coordenação do curso pelo amparo durante a graduação.

Aos professores do curso de Ciências Biológicas por representarem de forma excepcional a classe docente e por servirem de exemplo na profissão a qual pretendo seguir.

Ao meu professor orientador, Dr.º Márcio Frazão pela confiança, paciência e amizade construída, a quem tenho imensa admiração. Serei grato sempre. Agradeço pelos conhecimentos repassados e pela contribuição na construção desta pesquisa.

Ao meu amado avô Severino Jerônimo (*in memorian*), por todos os ensinamentos repassados, sempre lembrarei com muito orgulho e saudade, essa vitória é nossa. A ele dedico, com respeito e admiração.

À minha avó/mãe, Maria das Graças, por nunca desistir de mim, sempre acreditou e sempre me deu forças para que esta caminhada se concretizasse. Suas orações e sua fé me mantiveram de pé até hoje. Agradeço a Deus todos os dias por colocar em minha vida o anjo que és. Te amo vó.

À minha mãe, Ana Patrícia, pelo apoio durante esta fase acadêmica, pelos esforços diários, pelo amor e pelo incentivo. Agradeço por tudo eternamente. Os conselhos, o amparo, o colo de mãe sempre são inigualáveis. Eterno e verdadeiro amor.

Ao meu pai, Gilvan Celso, pelas batalhas e apoio durante a graduação. Pelas palavras de motivação proferidas e pelo exemplo de pai. Agradeço por tudo.

À toda minha família em especial, as minhas tias, Alba Lúcia, Andressa Silva, Adriana Silva pela motivação e carinho de sempre. Amo vocês.

As minhas irmãs, Geovanna Thiffany e Ana Júlia que acompanham de perto toda essa trajetória. Peço a Deus que alcancem seus objetivos e sejam felizes cada dia mais.

À minha namorada, Kelly Moreira por dividir comigo essa caminhada, enfrentando altos e baixos e superando todos os obstáculos. Agradeço por me proporcionar felicidade, carinho e companheirismo. Agradeço a Deus por ter te colocado em minha vida, você é a resposta das minhas orações. Obrigado por tudo.

À professora Carolline Guimarães, da UFRPE, por me auxiliar em algumas etapas importantes desta pesquisa. Agradeço muito todo o aprendizado.

À toda turma de Ciências Biológicas 2013.1, a melhor turma do CES, sentirei saudades, Agradeço também, as amigas que construí ao longo dos quatro anos de graduação.

E por fim agradeço a todos que contribuíram de forma direta e indiretamente para a realização deste sonho.

“Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça”.

(Isaías 41:10)

RESUMO

Os anuros apresentam características adaptativas intrínsecas ao grupo, exercem importante função ecológica no controle de insetos e outros invertebrados, além disso, são um dos grupos mais sensíveis a variação do meio ambiente. A família Leptodactylidae é uma das mais ameaçadas e entre as causas do declínio está a redução dos habitats e as mudanças climáticas. Em áreas de domínio Caatinga, o padrão de distribuição de chuvas determina a atividade energética dos anfíbios anuros. Dessa forma, o *Leptodactylus macrosternum* é considerado bioindicador ambiental, que fornece informações sobre possíveis perturbações e conservação dos ecossistemas. Mediante a isto, a presente pesquisa objetiva explorar e contribuir com o registro de informações acerca da quantificação das proteínas e carboidratos presentes no fígado da espécie, permitindo melhor entendimento pós-quantificação. O local de coleta para o presente estudo foi no Horto Florestal Olho D'água da Bica, localizado no município de Cuité-PB, onde foram utilizados 32 machos adultos, coletados quinzenalmente entre os meses de janeiro a dezembro de 2013. Para a realização deste experimento, pequenos fragmentos de fígado foram removidos, pesados, medidos e encaminhados à rotina histológica. Os carboidratos foram corados com reação de PAS e as proteínas foram coradas com xilidina. Nas análises histológicas no fígado observou-se a presença das células de Kupffer e hepatócitos. A quantificação das proteínas e dos carboidratos foram estatisticamente analisadas. Os valores mensais das quantidades de proteínas apresentaram os menores valores significativos durante o mês de julho e os maiores valores observados para este parâmetro foram nos meses de agosto e dezembro. Contudo, as quantidades de carboidratos não apresentaram diferenças significativas durante os meses amostrados e o mês de junho foi o que apresentou as maiores valores médios para este parâmetro seguido do mês de maio. Foram observadas apenas relações significativas entre a pluviosidade e as quantidades de carboidratos, além de temperatura e quantidade de carboidratos. A variação do regime de chuvas e temperatura não apresentou nenhuma relação significativa com a quantidade de proteínas depositadas no fígado de *L. macrosternum*.

Palavras-chave: Caatinga. Pluviosidade. Temperatura. Histoquímica.

ABSTRACT

Anurans feature adaptive characteristics intrinsic to the group, they exert an important ecological function in the control of insects and other invertebrates, in addition, they are one of the most sensitive groups of environmental variation. The Leptodactylidae family is one of the most threatened and among the causes of decline is habitat reduction and climate change. In areas of Caatinga domain, the rain distribution pattern determines the energy activity of Anuran amphibians. Thus, the *Leptodactylus macrosternum* is considered an environmental bioindicator, which provides information on possible disturbances and conservation of ecosystems. Through this, this research aims to explore and contribute to the record of information about the quantification of proteins and carbohydrates present in the liver of the species, enabling better understanding Pós-quantificação. The place of collecting for the present study was in the Horto Florestal Olho D'água da Bica, located in the municipality of Cuité-PB, where 32 adults were used, collected fortnightly between the months of January to December of 2013. For the realization of this experiment, small liver fragments were removed, heavy, measured and routed to the histological routine. The carbohydrates were stained with PAS reaction and the proteins were stained with xilidina. In histological analyses in the liver, the presence of Kupffer and hepatocytes cells were observed. The quantification of proteins and carbohydrates were statistically analyzed. The monthly values of the quantities of proteins presented the smallest significant amounts during the month of July and the greatest values observed for this parameter were in the months of August and December. However, the quantities of carbohydrates did not present significant differences during the sampled months and the month of June was the one that presented the highest average values for this parameter followed by the month of May. There were only significant relationships between rainfall and the quantities of carbohydrates, in addition to temperature and quantity of carbohydrates. The variation in the rainfall and temperature regime has presented no significant relationship with the quantity of proteins deposited in the liver of *L. macrosternum*.

Keywords: Caatinga. Rainfall. Temperature. Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 01 - Espécie <i>Leptodactylus macrosternum</i>	18
Figura 02 - Localização da área de coleta, Horto Florestal Olho D'agua da Bica, Cuité, Paraíba.....	22
Figura 03 - Equipamentos utilizados para realização dos experimentos.....	24
Figura 04 - Visualização de estruturas presentes no fígado de <i>Leptodactylus macrosternum</i>	26

LISTA DE GRÁFICOS

Pág.

Gráfico 01- Valores médios e erro padrão mensais das quantidades de proteínas depositadas no fígado dos indivíduos machos coletados de *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926) na área do HFODB , Cuité- PB, no período de janeiro a dezembro de 2013.....27

Gráfico 02- Valores médios e erro padrão mensais das quantidades de carboidratos depositados no fígado dos indivíduos machos coletados de *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926) na área do HFODB (HFOB), Cuité- PB, no período de janeiro a dezembro de 2013.....27

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1 - Quantidade de espécimes coletados.....23

Tabela 2 - Relações entre a quantidade de proteínas e carboidratos depositados no fígado de machos da espécie *Leptodactylus macrosternum* em relação à pluviometria e a temperatura na área do Horto Florestal Olho D' Água da Bica (HFODB), município de Cuité, estado da Paraíba-Brasil, no período entre maio-agosto e novembro-dezembro de 2013. *= valores estatisticamente significativos.....29

LISTA DE ABBREVIATIONS AND SIGLAS

AESA - Agência Executivos de Gestão de Águas do Estado

CES – Centro de Educação e Saúde

HFODB – Horto Florestal Olho D'Água da Bica

UFCG – Universidade Federal De Campina Grande

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específicos	16
3. REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 Importância dos Anfíbios.....	17
3.2 Descrição da espécie	18
3.3 Período Sazonal	19
3.4 Características do fígado.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Área de Estudo.....	22
4.2 Espécimes avaliadas.....	23
4.3 Preparação das Lâminas.....	23
4.4 Análises da quantificação de proteínas e carboidratos e variáveis climáticas	24
4.5 Dados climatológicos.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Quantificação das proteínas e carboidratos.....	25
5.2 Relações de proteínas e carboidratos com a sazonalidade.....	28
6. CONCLUSÕES	31
7. REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

Segundo Frost (2011) são conhecidas 6.771 espécies de anfíbios no planeta, sendo que 5.858 equivalem à ordem Anura. Os anuros apresentam características adaptativas intrínsecas ao grupo, como membros posteriores alongados e as vértebras fundidas adaptadas para saltos. Exercem importante função ecológica no controle de insetos e outros invertebrados, que são os principais integrantes de sua dieta, além disso, são um dos grupos mais sensíveis a variação do meio ambiente, sendo assim amplamente utilizados como biomarcadores ambientais (ETEROVICK; SAZIMA, 2004).

Os anuros da família Leptodactylidae é uma das mais ameaçadas e entre as causas do declínio está a redução dos habitats e as mudanças climáticas (STUART et al., 2004). Segundo LI Y; COHEN; ROHR (2013), dentre os fatores responsáveis pela mudança climática destacam-se a umidade e a temperatura, sendo estes extremamente importantes para a sobrevivência dos anuros. Por isso, avaliar a tolerância a extremos climáticos de anuros parece uma questão fundamental para sua conservação (NAVAS et al., 2007).

Neste sentido, o conhecimento dos padrões energéticos, dos diferentes fatores e suas relações com a biologia destes animais fornecem informações que podem complementar o entendimento dos princípios de estruturação das comunidades em seus ecossistemas (BIONDA et al., 2011). De uma maneira geral, estes princípios baseados em informações relativas à dinâmica de populações e de comunidades, que visam entender a distribuição de grupos de espécies, suas relações internas e com o meio, é uma ferramenta primária e essencial para estudos mais aplicados, voltados para o levantamento, conservação e manejo da biodiversidade (HOCKEY; CURTIS, 2009).

Em áreas de domínio Caatinga, o padrão de distribuição de chuvas determina a atividade energética dos anfíbios anuros. Durante a estiagem, as espécies de anuros que ocorrem nesta região apresentam adaptações fisiológicas e comportamentais às variações térmicas, de escassez de alimentos e água em poças temporárias (PRADO et al., 2000; BERTOLUCI; RODRIGUES, 2002). Nesta perspectiva, estudos sobre a história, ecologia e evolução dos anfíbios nessas áreas, são extremamente necessários para auxiliar o entendimento dos padrões de distribuição das espécies bem como a sua conservação nesse ecossistema (RODRIGUES, 2003).

Considerando sua vulnerabilidade aos fatores antrópicos e a sua alta especificidade microambiental, várias espécies da família dos Leptodactylidae possuem um importante papel em muitos habitats sejam eles terrestres ou aquáticos, em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, atuando para manutenção e controle de outras espécies (VITT; CALDWELL, 2001). Como por exemplo, o *Leptodactylus macrosternum* (MIRANDA-RIBEIRO, 1926) considerado bioindicador ambiental, que fornece informações sobre possíveis perturbações e conservação dos ecossistemas (HEYER et al., 2000).

Nesta perspectiva, sabe-se que os estudos histoquímicos dos anfíbios são escassos, assim como a determinação das proteínas e carboidratos presentes no fígado de *L. macrosternum*, que podem indicar como as espécies se adaptam aos variados ecossistemas e flutuações sazonais, a partir da quantidade dos componentes químicos presentes no fígado (VIEIRA; HARZBE; SANTANA, 2007).

Mediante a isto, a presente pesquisa visa explorar e contribuir com o registro de informações acerca da quantificação das proteínas e carboidratos presentes no fígado da espécie *L. macrosternum*, permitindo melhor entendimento pós quantificação.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Realizar análise histoquímica de proteínas e carboidratos no fígado de *Leptodactylus macrosternum*.

2.2 Específicos

- Avaliar o balanço quantitativo das proteínas e dos carboidratos presentes no fígado de *L. macrosternum*;
- Avaliar a quantidade de proteínas e carboidratos no fígado e determinar as funções desempenhadas;
- Analisar o balanço qualitativo das proteínas e dos carboidratos;
- Associar a variação da quantidade de proteínas e carboidratos com a distribuição sazonal destes animais na área de estudo.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Importância dos Anfíbios

Tempone e colaboradores (2007) ressaltam que os anuros servem de alimento a uma extensa gama de animais, desde invertebrados até peixes, répteis, aves, mamíferos e até mesmo algumas espécies de anfíbios. Tendo em vista a pele permeável e exposta e a ocupação de habitats aquáticos e terrestres, os anfíbios são considerados como indicadores sensíveis a diversos fatores ambientais. São também uma fonte riquíssima em compostos biologicamente ativos, usados em pesquisas farmacológicas. Por esse motivo, a perda em diversidade de anfíbios poderia limitar descobertas relevantes.

Partindo desse pressuposto, os anuros apresentam substâncias farmacologicamente ativas em sua pele com funções principais de protegê-los contra infecções de microrganismos e também como mecanismo de defesa contra predadores (BERNARDE; SANTOS, 2009). O uso dessas substâncias advindas de suas glândulas são utilizadas para a fabricação de fármacos e este mercado aumenta de forma significativa. Logo, o declínio da biodiversidade de anuros afeta o desequilíbrio econômico das indústrias que utilizam suas secreções para fabricar medicamentos (CAMARGO, 2005; PUKALA et al., 2006).

Nesse sentido, De Carvalho e colaboradores (2008), afirmam que os anuros da família Leptodactylidae são compostos por 99 espécies divididas em 4 gêneros (*Hydrolaetare*, *Scythrophrys*, *Paratelmatobius* e *Leptodactylus*), desta forma o gênero *Leptodactylus* é o mais abundante com 88 espécies e vivem associados a ambientes com restos de vegetação de florestas tropicais úmidas, ou próximas à corpos d'água, com exceção de algumas espécies que habitam ambientes áridos e na qual os modos reprodutivos são intensamente diversificados.

Sendo assim, para Wells (2010) os anfíbios são modelos excepcionais em relação ao desenvolvimento e a constatação de evidências ecológicas. Desta forma, a ordem Anura, a mais diversa dentre os anfíbios tem servido como organismos modelo de extrema importância em toda história da ciência (VITT; CALDWELL, 2009).

3.2 Descrição da espécie

A espécie *Leptodactylus macrosternum* (MIRANDA-RIBEIRO, 1926) é uma espécie de anfíbio pertencente à família Leptodactylidae, composta por animais de pequeno e médio porte, em geral insetívoros, terrestres ou semi-aquáticos, e de atividade noturna (FROST, 2013). No Brasil essa família é representada por 152 espécies (CAMPIÃO et al., 2014).

O *Leptodactylus macrosternum*, popularmente conhecida como rã-manteiga (figura 01) apresenta porte médio e é caracterizado por possuir um padrão de ocelos negros espalhados de forma irregular pelo dorso, sua coloração permite ao animal a camuflagem no ambiente reprodutivo, utilizando da vegetação próxima ao curso de água para que possam dificultar a visualização. Além disso, possui ampla distribuição geográfica, o que abrange toda a América do Sul, cujo fator pode ter sido contribuído pelo alto poder de resistência a ambientes alterados por ação antrópica, habitando assim, grande parte do território compreendido nos domínios da Mata Atlântica, o que inclui brejos de altitudes e Caatinga (LAVILLA et al., 2010).

Figura 01: *Leptodactylus macrosternum*



Fonte: <http://ismaeljsnature.blogspot.com.br>

Esta espécie chega a medir 15 cm de comprimento com uma dieta preferencialmente carnívora, alimentando-se de artrópodes e até mesmo de pequenos vertebrados como outras rãs, peixes e serpentes (FREITAS; SILVA, 2007). Nesse sentido, Moura (2010) reitera que o *L. macrosternum* é facilmente encontrado tanto no período seco quanto na estação chuvosa com pico populacional no período de chuvas. Além disso, vocaliza em todos os meses do

ano, com pico principalmente na estação chuvosa, especialmente nas bordas de corpos d'água lânticos, onde a fêmea deposita seus ovos em ninhos de espuma e posteriormente seus ovos se desenvolvem em girinos (HADDAD et al., 2008).

3.3 Período Sazonal

De modo geral, o Brasil lidera o ranking mundial em riqueza de anfíbios (SBH, 2009). Entretanto, sabe-se que a maior ameaça atual aos anfíbios brasileiros é a destruição dos habitats pelo desmatamento, em decorrência dos avanços da urbanização (SILVANO; SEGALLA, 2005). E mais especificamente na Caatinga, Trefaut (2003) sustenta que este domínio é caracterizado por possuir altas temperaturas e chuvas, apresentando uma herpetofauna abundante.

Por serem vulneráveis à variações climáticas, a maioria dos anfíbios possuem ciclos sazonais de atividade e de reprodução e na região tropical, essa variação sazonal está inteiramente ligada ao regime de chuvas e variação de temperatura (GOTTSBERGER; GRUBER, 2004). Sendo assim, Vasconcelos e colaboradores (2011) ressaltam que muitos estudos corroboram que essas espécies na qual sofrem influência da sazonalidade, possuem peculiaridades no uso do habitat diminuindo a sobreposição espacial nos curtos períodos de atividade reprodutiva.

Nesse contexto, por serem animais ectotérmicos, os anfíbios têm sua temperatura corporal associada ao ambiente em que vivem. Possuem uma pele permeável que além da proteção mecânica, também serve como a principal via para trocas gasosas e absorção de água, sendo assim os anfíbios são limitados em se manterem ativos em temperaturas baixas e são completamente incapacitados em temperaturas muito altas, pois temperaturas elevadas ocasionam perda de água corporal através de evaporação através da pele, impossibilitando várias funções fisiológicas e metabólicas (WELLS, 2007).

Vale salientar que são inúmeros os elementos que podem influenciar a alteração da composição de uma comunidade como disponibilidade de recursos, predação, influências externas, variáveis climáticas ou um próprio ajuste na estrutura da comunidade (JIM, 2002). Dessa forma, a maioria dos estudos com comunidades de anfíbios são executados por cerca de um ano e geralmente têm como propósitos estudar a ecologia da comunidade e inclusive verificar a variação sazonal das espécies (SANTOS et al., 2007; SÃO PEDRO; FEIO, 2010).

A maioria das espécies como o *Leptodactylus macrosternum* possuem atividades noturnas e evitam sempre as altas temperaturas durante o dia, portanto o período sazonal é parte essencial no ciclo reprodutivo desses animais, por isso a temperatura é o principal sinal ambiental usado pelos anfíbios para ajustar o estágio reprodutivo (RASTOGI et al., 2011).

3.4 Características do fígado

O fígado é um dos órgãos hematopoiéticos responsável principalmente pelo metabolismo, na qual tem contato direto com poluentes advindos do ambiente. Além do mais, auxilia na formação e degeneração de células presentes no sangue, caracterizado como hematopoiético, e, portanto, está relacionado ao sistema imunológico sendo fundamental na manutenção da homeostase corporal (HILDEBRAND, 2006).

Neste sentido, Guyton e Hall (2002) afirmam que o fígado é o principal órgão envolvido e correlacionado ao metabolismo protético e uma alteração grave pode levar a um quadro irreversível, com visível diminuição da taxa de crescimento e conseqüentemente a morte do animal. Sendo assim, todo alimento depois de metabolizado e digerido no trato intestinal, tem seus nutrientes processados no fígado, como a formação de uréia para remoção de amônia, como efeito detoxificante e a síntese de certos aminoácidos (HIPOLITO et al., 2004).

No fígado estão presentes as células de Kupffer, que são macrófagos extremamente móveis, na qual em seu interior contém enzimas necessárias para a digestão intracelular de substâncias fagocitadas. Há a presença ainda dos melanócitos, que são células responsáveis pela produção de melanina, além de conter também os hepatócitos, células capazes de sintetizar proteínas, tanto para exportação quanto para a própria manutenção (SHERLOCK; DOOLEY, 2004).

Vale ressaltar que na enxurrada seca, os sapos de Caatinga possuem adaptações fisiológicas para sobreviver aos meses sem chuva. Durante esse período, o metabolismo fica reduzido no fígado e nos músculos das patas de trás. A quantificação de elementos importantes como carboidrato e proteínas nesse órgão podem fornecer importantes informações sobre o estado reprodutivo e ou nutricional de indivíduos em uma população (GUIMARÃES, 2010).

O fígado nos anfíbios desempenha diversas funções, como excreção de produtos de degradação, secreção da bile, armazenamento de lipídios e glicogênio, síntese de globulinas e albumina, participação no metabolismo de proteínas, carboidratos e gorduras, regulando a concentração de metabólitos no sangue (GUYTON; HALL, 2002). Logo, as alterações em suas funções básicas, podem estar atreladas ao desenvolvimento desses organismos em regiões neotropicais (ZIERI; OLIVEIRA, 2007; FRANCO-BELUSSI et al., 2011).

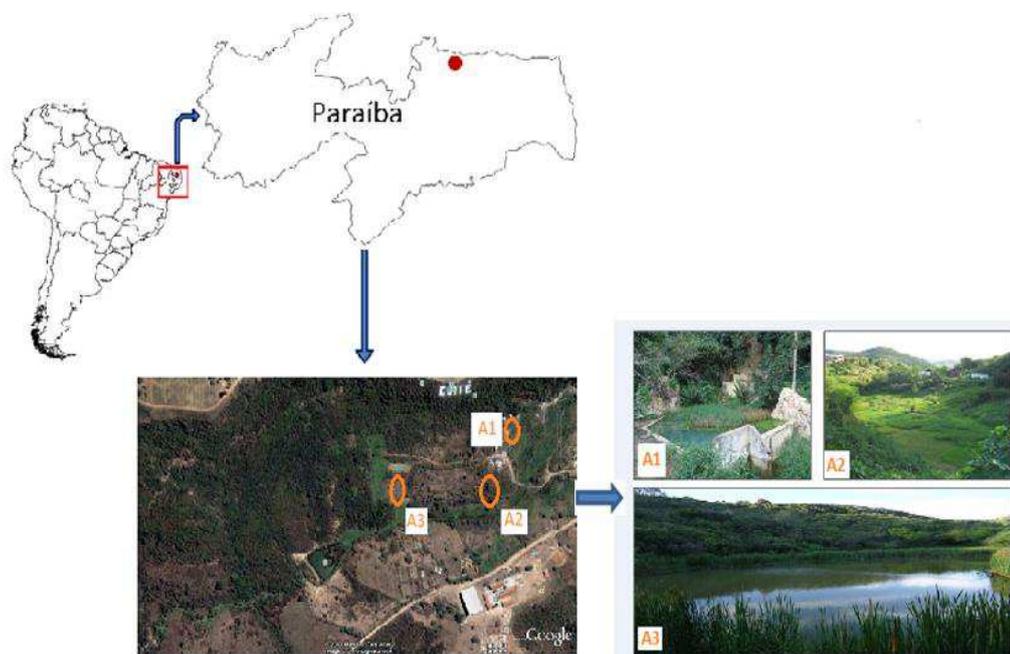
Nessa perspectiva, a síntese de proteínas em anuros seria amplamente recuperada no estágio pós-depressivo na qual segue a energética de estivação (DUELLMAN; TRUEB, 2002). Já os carboidratos são relevantes substratos energéticos, logo, a quantidade de proteínas é relativamente conservada durante a estivação (PAKAY et al., 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de Estudo

O local de coleta para o presente estudo foi no Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFODB), localizado no município de Cuité-PB (figura 02), na mesorregião do Agreste paraibano e na microrregião do Curimataú Ocidental ($6^{\circ}29'06''S/36^{\circ}9'24''O$), com altitude de 667 metros acima do nível do mar e uma área total de 758,6 km², possui clima quente e seco, com temperatura oscilando entre 17° e 28°C, pluviosidade média mensal de 76,35 mm e umidade relativa em torno de 70% (TEIXEIRA, 2003).

Figura 02: Localização da área de coleta, Horto Florestal Olho D'água da Bica, Cuité, Paraíba.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Além disso, apresenta uma hidrografia peculiar, com rios efêmeros, açudes, além de fontes d'água naturais e dentre essas fontes, está o Olho D'água da Bica, manancial perene localizado próximo ao campus do Centro de Educação e Saúde (CES) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). A região dos arredores da nascente é área de Caatinga arbórea e arbustiva, com presença de córregos, barragens, áreas úmidas e áreas de encosta (COSTA, 2009).

4.2 Espécimes avaliadas

Para este trabalho foram utilizados 32 machos adultos da espécie *L. macrosternum*, coletados quinzenalmente entre os meses de janeiro a dezembro de 2013, na área do Horto Florestal Olho d'água da Bica, com autorização prévia do IBAMA/SISBIO (44134-1). A seguir representa-se a (tabela 01), referente ao total de machos coletados em cada mês, nos meses entre janeiro-abril e setembro-outubro não foram avistados indivíduos de *L. macrosternum* durante as saídas de campo.

Tabela 01: Referente à quantidade de espécimes coletados.

Maio	6 exemplares
Junho	11 exemplares
Julho	7 exemplares
Agosto	3 exemplares
Novembro	3 exemplares
Dezembro	2 exemplares

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Vale salientar que estas espécies já haviam sido capturadas para um trabalho anterior, além disso, os fígados desses animais haviam sido conservados para que não fossem desperdiçados e para não ocorrer outra retirada relevante do seu habitat, desta maneira foi possível utiliza-los para fins desta pesquisa.

Portanto, esta pesquisa é de cunho descritiva e exploratória (GIL, 2010), caracterizada como uma abordagem quali-quantitativa.

4.3 Preparação das Lâminas

Para a realização deste experimento, pequenos fragmentos de fígado foram removidos, pesados, medidos e encaminhados à rotina histológica (RIBEIRO; LIMA, 2000). Para isto foram utilizados equipamentos (figura 03) como a capela de exaustão, cuja função evitar que os gases tóxicos se dissipem, a estufa laboratorial inibindo a ação microbiana, o micrótomo para os cortes histológicos e o banho maria de laboratório.

Figura 03: Equipamentos utilizados para realização dos experimentos.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Os indivíduos machos de *L. macrosternum* foram levados ao Laboratório de Biosistemática de Anfíbios (LABAN) da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Cuité-PB. Os fígados foram fixados em solução Bouin (mistura de 71% ácido pícrico, 24 % e formol puro e 5% volumes de ácido acético glacial) por 24 horas e depois desidratados em série crescentes de álcool (70%-30min, 80%-30min, 90%-30min, 95%30min, 100%-30min e 100%-30min) (HOPWOOD, 1990), posteriormente incluídos em parafina seccionados a 5,0 μm , foi realizado uma análise histoquímica das proteínas e a coração dos cortes por meio de corantes específicos, para carboidratos utilizou-se reação de PAS e para as proteínas utilizou-se xilidina. Para cada indivíduo foram realizados dez cortes histológicos. As lâminas histológicas foram observadas em um microscópio de luz com sistema de captura de imagens. Para obter a quantificação das proteínas e dos carboidratos presentes no fígado, foram analisados a área do tecido hepático através das fotomicrografias dos cortes obtidas no programa de manutenção de imagem GIMP 2, onde os valores das quantidades de proteínas e carboidratos foram expressos em pixels .

4.4 Análises da quantificação de proteínas e carboidratos e variáveis climáticas

Primeiramente foi verificada a existência de valores discrepantes (*outliers*), em seguida, a normalidade dos dados foi testada por Shapiro-Wilk, e quando necessários submetidos à normalização $(x + 0,5)^{1/2}$. (Tukey e Dunn, respectivamente). A quantificação de proteínas e carboidratos no fígado foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis Wallis e quando necessário completado pelo Teste de Dunn.

A dependência entre as variáveis climáticas e quantificação de proteínas e carboidratos, foi verificada por meio do teste de Regressão Linear Simples. Sendo

necessários a realização dos testes de correlação de Spearman (dados não paramétricos) entre os parâmetros avaliados. Foram considerados $p \leq 0,05$ como referência para se atribuir significância estatística, sendo todas as análises baseadas em Krebs (1999).

4.5 Dados climatológicos

Os dados meteorológicos mensais de temperatura (°C) e pluviosidade (mm) foram adquiridos através do banco de dados do Centro de Agência Executivos de Gestão de Águas do Estado da Paraíba (AESAs), através da estação meteorológica vizinha do local de amostragem.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Quantificação das proteínas e carboidratos

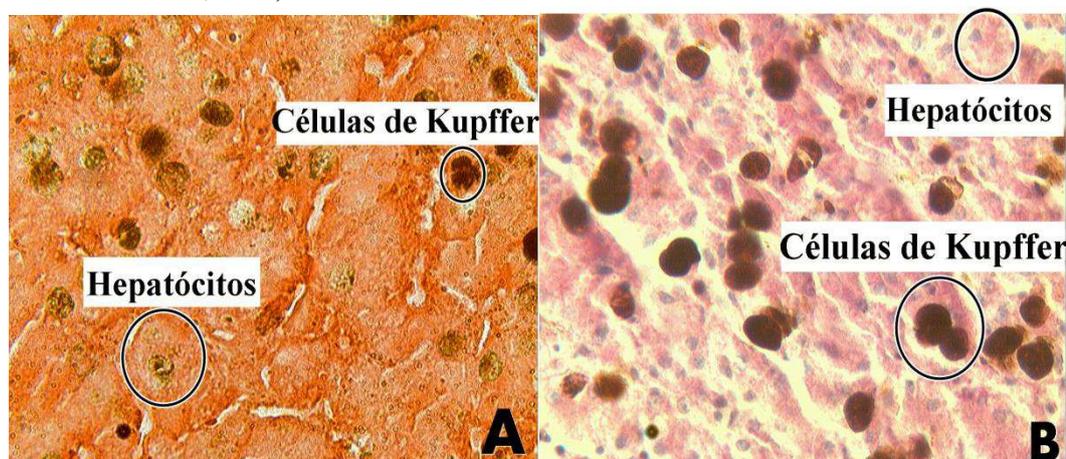
Nas análises histológicas no fígado de *L. macrosternum* observou-se a presença das células de Kupffer também designados macrófagos pigmentados (Figura 4A e 5B), que segundo Agius e Roberts (2003) evidenciam diferentes tipos de grânulos no citoplasma, os quais podem indicar substâncias químicas diversificadas, como a melanina, advindas da degradação de material celular fagocitado, sendo assim funcionam como células de defesa e sua deficiência ou morte causam patologias.

Além do mais, os melanomacrófaos hepáticos, denominados células de Kupffer especificamente em anfíbios, são dotados de diversos grânulos citoplasmáticos, que podem indicar a presença de diferentes substâncias químicas e grânulos escuros com propriedades histoquímicas e ultraestruturais semelhantes à melanina (GUIDA, 2004). Foram evidenciados também os hepatócitos contendo agrupamento de grânulos pigmentados, cuja função está relacionada à síntese de proteínas, para manutenção própria ou exportação (CORSARO et al., 2000).

Gartner e Hiat (2003) afirmam que os hepatócitos estão distribuídos em placas, como um “muro”, essas placas possuem células denominadas células de Kupffer, contendo uma morfologia estrelada com um núcleo oval atuando como macrófagos, e consideram ainda que estas estruturas hepáticas são as principais células constituintes do fígado. Desta forma, as imagens observadas nesse trabalho corroboram com as descrições dos autores

supracitados, demonstrando assim que este padrão é muito conservado dentro dos vertebrados (figura 4).

Figura 04: Visualização de estruturas presentes no fígado de *Leptodactylus macrosternum* (MIRANDA-RIBEIRO,1926).

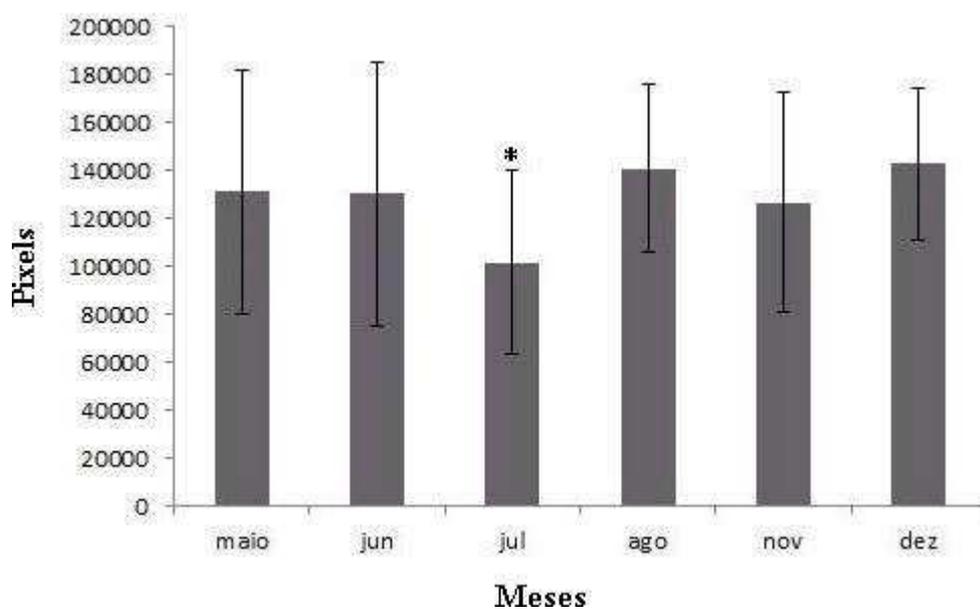


Legenda - A) Visualização de estruturas presentes no fígado (por meio de corante Xilidina para análise histoquímica de proteínas); **B)** Visualização de estruturas presentes no fígado (por meio da reação de PAS para análise histoquímica de carboidratos) dos indivíduos machos coletados de *Leptodactylus macrosternum* (MIRANDA-RIBEIRO, 1926) na área do HFOB, Cuité- PB, no período de janeiro a dezembro de 2013.

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Os valores mensais das quantidades de proteínas apresentaram os menores valores significativos durante o mês de julho ($p = 0,04$, Kruskal - Wallis). No gráfico abaixo (gráfico 01), observou-se que a quantidade de proteínas dadas em pixels, entre os meses de maio, junho, agosto, novembro e dezembro, apresentaram quantidade consideráveis de proteínas, variando entre 120000 e 140000 pixels. Os maiores valores observados para este parâmetro foram nos meses de agosto ($140985,9 \pm 35395,4$ pixels) e dezembro ($142731,8 \pm 31865,7248$). Contudo, as quantidades de carboidratos não apresentaram diferenças significativas durante os meses amostrados, permanecendo pouco acima de 150000. O mês de junho foi o que apresentou as maiores valores médio para este parâmetro ($176251,13 \pm 6904,78$) seguido do mês maio ($172161,13 \pm 53484,26$) (Gráfico 02).

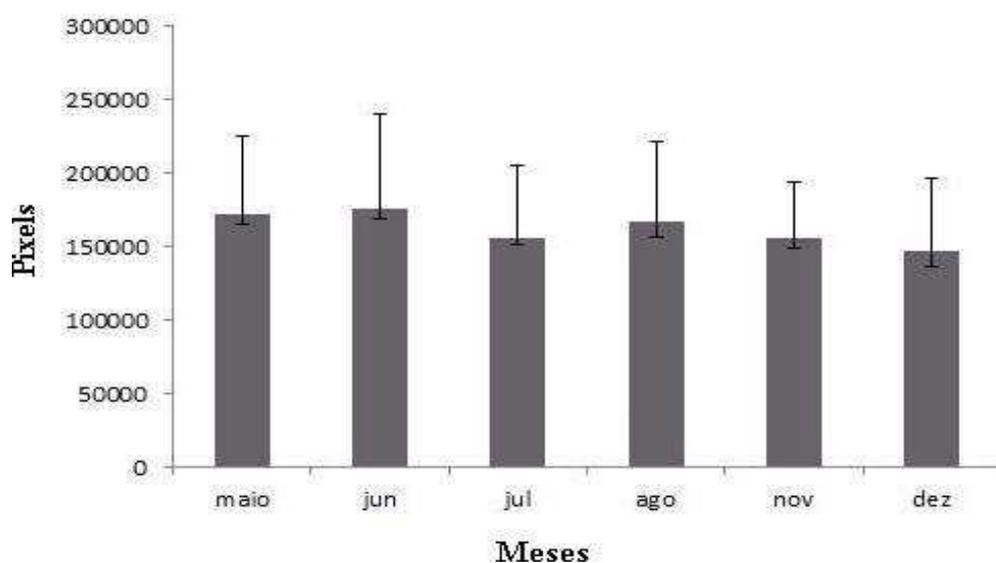
Gráfico 01: Valores médios e erro padrão mensais das quantidades de proteínas depositadas no fígado dos indivíduos machos coletados de *Leptodactylus macrosternum* (MIRANDA-RIBEIRO, 1926) na área do HFODB, Cuité- PB, no período de janeiro a dezembro de 2013.



Legenda - * indica diferenças estatísticas significativas pelo teste de Kruskal-Wallis- $p < 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Gráfico 02: Valores médios e erro padrão mensais das quantidades de carboidratos depositados no fígado dos indivíduos machos coletados de *Leptodactylus macrosternum* (MIRANDA-RIBEIRO, 1926) na área do HFODB, Cuité- PB, no período de janeiro a dezembro de 2013.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Vale salientar que dentre as espécies de anuros ocorrentes nas áreas da Caatinga, o *Leptodactylus macrosternum*, é registrado praticamente em todos os meses do ano sendo preferencialmente de atividade noturna (TEIXEIRA; VRCIBRADIC, 2003). Contudo, de acordo com Dayton e Fitzgerald (2001) a irregularidade de chuvas, a formação e duração dos corpos de água limitam vários aspectos de vida dos anuros como aquisição de recursos, acúmulo de reservas e principalmente, atividade reprodutiva. Nesse sentido, as baixas ocorrências das chuvas bem como a sua imprevisibilidade em ambientes semi-áridos podem determinar alguns ajustes fisiológicos nos anuros limitando a ocorrência destes animais em alguns meses do ano o que justifica a ausência de avistamento dos indivíduos de *L. macrosternum* entre os meses de janeiro-abril e setembro-outubro durante as saídas de campo (SANTOS; ROSSA-FERES; CASATTI, 2007; GIARETTA et al., 2008).

Logo, sabe-se que o fígado é o segundo maior órgão do corpo e a maior glândula, pois é um órgão no qual os nutrientes absorvidos no trato digestivo são processados e armazenados para serem utilizados por outros órgãos (HIPOLITO, 2001). Por conseguinte, o arranjo do tecido hepático é diretamente relacionado com as características fisiológicas dos animais, tais como ectotermia e reprodução (BRUSLÈ; ANADON, 1996).

Desta forma os valores de proteínas e carboidratos acumulados no fígado de *L. macrosternum* também podem ser utilizados como indicador de várias atividades desempenhadas por esses animais como alimentação, forrageio do período reprodutivo, dentre outras. Portanto, pode-se afirmar que estes valores podem estar relacionados com a mobilização das reservas energéticas necessárias para o processo de vitelogenese, reprodução ou inclusive de preparação para um período de baixa disponibilidade alimentar (MADALOZZO; BOTH; CECHIN, 2013).

5.2 Relações de proteínas e carboidratos com a sazonalidade

Foram observadas apenas relações significativas entre a pluviosidade e as quantidades de carboidratos ($r = 0,01$; $p = 0,03$) e temperatura e quantidade de carboidratos ($r = 0,02$; $p = 0,04$). A variação do regime de chuvas e temperatura não apresentou nenhuma relação significativa com a quantidade de proteínas depositadas no fígado de *L. macrosternum* (Tabela 2).

Tabela 02: Referente as relações entre a quantidade de proteínas e carboidratos depositados no fígado de machos da espécie *Leptodactylus macrosternum* (MIRANDA-RIBEIRO,1926). em relação à pluviometria e a temperatura na área do Horto Florestal Olho D' Água da Bica, município de Cuité, estado da Paraíba-Brasil, no período entre maio-agosto e novembro-dezembro de 2013.

	Pluviometria		Temperatura	
	r	p	r	p
Proteína	0,004	0,24	0,003	0,15
Carboidrato	0,01	0,03*	0,02	0,04*

Legenda - * = Valores estatisticamente significativos.

r = Valor da análise estatística.

p = Teste de significância

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

A Caatinga é caracterizada por um complexo de ecossistemas compostos por várias fitofisionomias, clima semi-árido, baixa pluviosidade (400mm a 750mm), concentrada na estação chuvosa e temperaturas médias anuais entre 25°-27 °. Além disso, representa um ambiente desafiador para a fauna que nela habita, sobretudo para os anfíbios, que apesar de estarem intimamente relacionados com a disponibilidade de água são aparentemente bem adaptados às condições impostas por este domínio. Sendo assim, a comunidade de anuros da Caatinga utilizam de diversos comportamentos, associações ecológicas e adaptações fisiológicas que variam por influência de diversos fatores (ARZABE, 1999; NAVAS; ANTONIAZZI; JARED, 2004).

Baseado nisto, o presente trabalho realizou coletas em meses com períodos curtos chuva, durante a noite, já que as espécies de *L. macrosternum* são de hábitos noturnos, na qual retomam suas atividades de alimentação e de reprodução, aproveitando-se corpos d'água no local de coleta. Nesse aspecto, vale ressaltar que dentre os vários fatores que dificultam a obtenção de informações sobre a anurofauna da Caatinga destacam-se a irregularidade das precipitações e longos períodos de estiagem, dificultando a obtenção de dados (RODRIGUES, 2003).

Foi possível avaliar também o padrão de atividade de *L. macrosternum* com base no número de capturas na área de estudos do HFODB, na qual verifica-se que no mês de junho obteve-se o maior número de exemplares coletados (Tabela 1), explicado pelo fato de que este mês é caracterizado pelo início do período chuvoso, onde estes animais são encontrados

com maior frequência tanto para busca de alimentos quanto para a vocalização no caso dos machos, que caracteriza o período reprodutivo e conseqüentemente, no mês seguinte, obtiveram menores valores de proteínas e carboidratos no fígado (Gráfico 1 e 2), comprovando um grande desgaste energético.

Durante a estiagem, espécies de anuros como o *L. macrosternum* apresentam adaptações fisiológicas e comportamentais às variações térmicas, de escassez de alimentos e água em poças temporárias (SUN; NARINS, 2005; AMÉZQUITA et al., 2011). As atividades diárias e sazonal de anuros são reguladas por diferentes fatores no ambiente, tais como precipitação, umidade relativa do ar, temperatura e fotoperíodo (HATANO et al., 2002; BOQUIMPANI-FREITAS et al., 2002; XIMENEZ; TOZETTI, 2015; BOTH et al., 2008; VAN SLUYS, et al., 2012; TOZETTI, 2015). A baixa temperatura do ar, por exemplo, afeta diretamente os animais ectotérmicos devido a redução da atividade metabólica, podendo causar uma redução da atividade de vocalização ou forrageio (OLIVEIRA et al., 2013).

6. CONCLUSÕES

Com base nos objetivos e nos resultados obtidos em relação à análise histoquímica de proteínas e carboidratos de *Leptodactylus macrosternum*, foi possível concluir que:

- Os valores mensais das quantidades de proteínas apresentaram os menores valores significativos durante o mês de julho e os maiores valores observados para este parâmetro foram nos meses de agosto e dezembro. Contudo, as quantidades de carboidratos não apresentaram diferenças significativas durante os meses amostrados e o mês de junho foi o que apresentou as maiores valores médios para este parâmetro seguido do mês de maio.

- Foram observadas apenas relações significativas entre a pluviosidade e as quantidades de carboidratos, além de temperatura e quantidade de carboidratos.

- A variação do regime de chuvas e temperatura não apresentou nenhuma relação significativa com a quantidade de proteínas depositadas no fígado de *L. macrosternum*.

REFERENCIAS

AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Review: Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Biology*, v. 26, p. 499-509, 2003.

AMÉZQUITA, A.; FLECHAS, S. V.; LIMA, A. P.; GASSER, H.; HODL, W. Acoustic interference and recognition space within a complex assemblage of dendrobatid frogs. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 108, n. 1, p. 17058-17063, 2011.

ARZABE, C. Reproduction activity patterns of anurans in two different altitudinal sites within the Brazilian Caatinga. **Revista brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 3, p. 851-864. 1999.

BERNARDE P. S.; SANTOS, R. A. Utilização medicinal da secreção ("vacinadosapo") do anfíbio kambô (*Phyllomedusa bicolor*) (Anura: Hylidae) por população não-indígena em Espigão do Oeste, Rondônia, Brasil. **Revista Biotemas**, 22:213- 220. 2009.

BERTOLUCI, J; RODRIGUES, M.T. **Seasonal patterns of breeding activity of Atlantic rainforest anurans at Boracéia, southeastern Brazil**. *Amphibia-Reptilia*, p. 161-167, 2002.

BIONDA, C. L; TADA, I.; LAJMANOVICH R.C. **Composition of amphibian assemblages in agroecosystems from the central region of Argentina**. *Russ. J. Herpetol.* 18: 93-98, 2011.

BOQUIMPANI- FREITAS, L.; ROCHA, C. F. D.; VAN SLUYS, M. Ecology of the horned leaf-frog, *Proceratophrys appendiculata* (Leptodactylidae), in an insular atlantic rainforest area of southeastern Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 36, n. 1, p. 318-322. 2002.

BOTH, C.; KAEFER, I. L.; SANTOS, T. G.; ZECHIN, S. T. Z. An austral anuran assemblage in the Neotropics: seasonal occurrence correlated with protoperiod. **Journal Natural History**, v. 42, n. 3, p. 205-222, 2008.

BRUSLÈ, J.; ANADON, G.G. The structure and function of fish liver. In: MUNSHI, J.S.D.; DUTTA, H.M. (Ed.). **Fish morphology horizon of new research**. Beirute: Science Publisher Inc., p. 16, 1996.

CAMARGO, A.C. M. **Perspective for pharmaceutical innovation in Brazil** - Center for Applied Toxinology (CEPID-Center for Research, Innovation and Dissemination - FAPESP). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 11, n. 4, p. 384- 390, 2005.

CAMPIÃO, K. M. et al. **Checklist of Helminth parasites of Amphibians from South America**. *Zootaxa*, [S.l.], v. 3843, n. 1, p. 1–93, jul. 2014. ISSN 1175-5334, 2014.

CORSARO, C.; SCALIA, M.; LEOTTA, M., MONDIO, F.; SICHEL, G. Characterization of Kupffer cells in some Amphibia. **Journal of Anatomy**, v. 196, p. 249-261, 2000.

COSTA, C. F. **Projeto horto florestal olho d'água da bica\ UF CG\ CES\ CUITÉ**. Cuité, Fev, 2009.

DAYTON, G.H.; FITZGERALD, L. A. Competition, predation, and the distribution of four desert anurans *Oecologia*, 129:430-435, 2001.

DE-CARVALHO, C. B.; FREITAS, E. B.; FARIA, R. G.; BATISTA, R. C.; BATISTA, C. C.; COELHO, W. A.; BOCCHIGLIERI, A. **História natural de *Leptodactylus mystacinus* e *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae) no Cerrado do Brasil Central**. *Biota Neotropica*, v. 8, n. 3, p. 105-115, 2008.

DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians**, McGraw-Hill Book Company, New York, 2002.

ETEROVICK, P.C.; SAZIMA, I. **Anfíbios da Serra do Cipó**. Ed. PUC Minas, Belo Horizonte, 2004.

FRANCO-BELUSSI, L.R.; ZIERI, R.O **Visceral pigmentation in four *Dendropsophus* species (Anura: Hylidae): occurrence and comparison**. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, v. 250, n. 2, p. 102-110, 2011.

FREITAS, M.A.; SILVA, T.F.S. **A Herpetofauna das Caatingas e áreas de altitudes do Nordeste brasileiro**. Pelotas: USEB, 2007.

FROST, D. R. **Amphibia Species of the World: an online reference**. Version 5.3. Disponível em <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/references>>. American Museum of Natural History, New York, USA. Acessado em 06 de abril de 2011.

FROST, W.D. **Amphibians species of the world**. Version 5.6. Disponível em <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia>>. 2013. Acessado em 15 de julho de 2017.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GIARETTA, A. A.; MENIN, M.; FACURE, K. G.; KOKUBUM, M. N. DE C. & OLIVEIRA FIHO, J. C. Species richness, relative abundance, and habitat of reproduction of terrestrial frogs in the Triângulo Mineiro region, Cerrado biome, southeastern Brazil. *Iheringia, Série Zoologia*, v. 98, n. 2, p. 181-188, 2008.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 5. ed. São Paulo: Atlas, 2010.

GOTTSBERGER, B. & E. GRUBER. 2004. **Temporal partitioning of reproductive activity in a Neotropical anuran community**. *Journal of Tropical Ecology*, v. 20, p. 271-280, 2004.

GUIDA, G.; ZANNA, P.; GALLONE, A.; ARGENZIO, E.; CICERO, R. Melanogenic Response of the Kupffer Cells of *Rana Esculentia L.* to Melanocyte Stimulating Hormone. **Pigment Cell Research**, v. 17, p. 128-134, 2004.

GUIMARÃES, M. **Na enxurrada seca**. Pesquisa FAPESP, n. 169, p. 48, 2010.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 972, 2002.

HADDAD, C.F.B.; TOLEDO, L.F.; PRADO, C.P.A. **Anfíbios da Mata Atlântica**. São Paulo: Neotropical, 2008.

HATANO, F. H.; ROCHA, C. F. D.; VAN SLUYS, M. Environmental factors affecting calling activity of a tropical diurnal frog (*Hylodes phyllodes*: Leptodactylidae). **Journal of herpetology**, v. 36, n. 1, p. 314-318, 2002.

HEYER, W.R.; RAND, A.S.; CRUZ, C.A.G.; PEIXOTO, O.L.; NELSON, C.E. Frogsof Boracéia. **Arquivos de Zoologia**, v.31, p.231-410, 2000.

HIDELBRAND, M. **Análise da estrutura dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, p. 700, 2006.

HIPOLITO, M.; LEME, M.C.M.; BACH, E.E. Lesões anátomo-histopatológicas em rãstouro (*Rana catesbeiana* SHAW, 1802) associadas à deterioração da ração. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.68, n.1, p. 111-114, 2001.

HIPOLITO, M.; MARTINS, A.M.C.R.P.F.; BACH, E.E. **Aspectos bioquímicos em fígado de rãs-touro (*Ranacatesbeiana* SHAW, 1802) sadias e doentes**. Arquivos do Instituto Biológico, v.71, n.2, p.147- 153, 2004.

HOCKEY, P. A. R.; CURTIS, O.E. **Use of basic biological information for rapid prediction of the response of species to habitat loss**. Conservation Biology, 2009.

HOPWOOD, D. Fixation e fixatives. In: Bancroft JD, Stevens A. **Theory and practice of histological techniques**. New York, Churchill Livingstone, 3rd ed., pp 21-42, 1990. in fish pathology. **Journal of Fish Biology**, v.26, p. 499-509, 2003.

JIM, J. **Distribuição altitudinal e estudo de longa duração de anfíbios da região de Botucatu, Estado de São Paulo**. Tese de Livre-Docência. Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu, p. 343, 2002.

KREBS, C. J. **Ecological Methodology**. Addison Wesley Educational Publishers, Menlo Park, 1999.

LAVILLA, E. O.; LANGONE, J. A.; CARAMASCHI, U.; HEYER, R.; DE SÁ, R. O. **The identification of *Rana ocellata* Linnaeus, 1758**. Nomenclatural impact in the species currently known as *Leptodactylusocellatus* (Leptodactylidae) and *Osteopilusbrunneus* (Gosse, 1851) (Hylidae). *Zootaxa*, v. 2346, n.1, p. 1-16, 2010.

LI Y, COHEN J. M.; ROHR J.R. **Review and synthesis of the effects of climate change on amphibians**. *IntegrativeZoology* 8, 145–161, 2013.

MADALOZZO, B.; BOTH, C.; CECHIN, S. Z. Temporal distribution and age structure of tadpoles of *Hypsiboas faber* and *H. leptolineatus* in ponds: how do they coexist? **Journal of Natural History**, v. 45, n. 39-40, p. 2575-2581, 2013. Melanogenic Response of the Kupffer Cells of *Rana Esculenta*L. to Melanocyte

MOURA, G.J.B. **Estrutura da comunidade de anuros e lagartos de remanescente de Mata Atlântica, com considerações ecológicas e zoogeográficas sobre a Herpetofauna do Estado de Pernambuco, Brasil.** 393 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) — Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

NAVAS, C. A.; ANTONIAZZI, M. M.; CARVALHO, J. E.; Suzuki, H. & Jared, C. **Physiological basis for diurnal activity in dispersing juvenile *Bufogranulosus* in the Caatinga, a Brazilian semi-arid environment.** *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 147:647-657, 2007.

NAVAS, C. A.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C. A preliminary assessment of anuran physiological and morphological adaptation to the Caatinga, a Brazilian semi-arid environment. **International Congress Series**, v. 1275, p. 298–305, 2004.

OLIVEIRA, M. C. L. M.; SANTOS, M. B.; LOEBMANN, D.; TOZETTI, A. M. Diversity and associations between coastal habitats and anurans in southernmost Brazil, **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 1, p. 575-582, 2013.

PAKAY, J. L.; WHITERS, P. C.; HOBBS, A. A.; GUPPY, M. In vivo downregulation of protein synthesis in the snail *Helix apersa* during estivation. **American Journal of Physiology – regulatory integrative and comparative Physiology**, v. 283, n. 1, p. 197-204, 2013.

PRADO, C. P. A.; UETANABARO, M. & LOPES, F. S. **Reproductive strategies of *Leptodactyluschaquensis* and *Leptodactyluspodicipinus* in the Pantanal, Brazil.** *J. Herpetol.*, St. Louis: p 135-139, 2000.

PUKALA, T. L.; BOWIE, J. H.; MASELLI, V. M.; MUSGRAVE, I. F.; TYLER, M. J. **Hostdefense peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity.** *Natural Product Reports*, v. 23, n. 1, p. 368-393, 2006.

RASTOGI, R. K.; PINELLI, C.; POLESE, G.; D'ANIELLO, B.; CHIEFF, G.; BACCARI. **Hormones and Reproductive Cycles in Anuran Amphibians.** In: *Hormones and Reproduction of Vertebrates, Vol 2. Amphibians.* (Eds) Noriss, D. O., and K.H. Lopez. Academic Press. Elsevier Inc. San Diego, CA. USA, 2011.

RIBEIRO, M.G.; LIMA, S.R. **Iniciação às técnicas de preparação de material para estudo e pesquisa em morfologia.** Editora Belo Horizonte: Segrac, p. 89, 2000.

RODRIGUES, M.T. **Herpetofauna da Caatinga.** In: I.R. Leal, M. Tabarelli & J.M.C. Silva (eds.). **Ecologia e conservação da Caatinga.** pp. 181-236. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2003.

SANTOS, T. G.; ROSSA-FERES, D. C.; CASATTI, L. Diversidade e distribuição espaço-temporal de anuros em região com pronunciada estação seca no sudeste do Brasil. **Iheringia, Sér.Zool**, v. 97, n. 1, p. 37-49, 2007.

SANTOS, T. G.; ROSSA-FERES, D. C.; CASATTI, L. Diversidade e distribuição espaço-temporal de anuros em região com pronunciada estação seca no sudeste do Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 97, n. 1, p. 37-49, 2007.

- SÃO PEDRO, V. A. & FEIO, R. N. Distribuição espacial e sazonal de anuros em três ambientes na Serra do Ouro Branco, extremo sul da Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais, Brazil. **Biotemas**, v. 23, p. 143-154, 2010.
- SBH – Sociedade Brasileira de Herpetologia. **Brazilianamphibians – Listofspecies**. Disponível em < falta site!>Acessado em 13 de agosto de 2016. 2009.
- SHERLOCK, S.; DOOLEY, J. **Doenças do fígado e do sistema biliar**. Rio de Janeiro. 2004.
- SILVANO, D. L.; SEGALLA, M. V. **Conservação de anfíbios no Brasil. Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 79-86, 2005.
Stimulating Hormone. **Pigment Cell Research**. 17: 128–134, 2004.
- STUART, S. N.; CHANSON, J. S.; COX, N. A.; YOUNG, B. E.; RODRIGUES, A. S. L.; FISCHMAN, D. L.; WALLER, R. W. **Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide**. **Science**, v. 306, p. 1783-1786, 2004.
- SUN, J. W. C.; NARINS, P. M. Anthropogenic sounds differentially affect amphibian call rate. **Biological Conservation**, v. 121, n. 1, p. 419-427, 2005.
- TEIXEIRA, L. M. **Informando o trade turístico paraibano**: Cuité, caderno de Turismo, p. 9-11, 2003.
- TEIXEIRA, R.L.; VRCIBRADIC, D. Diet of *Leptodactylus ocellatus* (Anura; Leptodactylidae) from coastal lagoons of southeastern Brazil. **Cuadernos de Herpetologia**, v. 17, n. ½, p. 111-118, 2003.
- TEMPONE, G.A.; M.S.C. MELHEM, F.O.; PRADO, G.; MOTOIE, R.M.; HIRAMOTO, M.M. Antoniazzi, C.F.B. Haddad and C. Jared. Amphibian secretions for drug discovery studies: a search for new antiparasitic and antifungal compounds. **Letters in drug design & Discovery**, v. 4, p. 67-73, 2007.
- TOZETTI, A. M.; PONTES, G. M. F.; MARTINS, M. B; OLIVEIRA, R. B. Temperature preferences of *Xenodon dorbigny*: field and experimental observations. **Journal of herpetology**, v. 20, n. 1, p. 277-280, 2010.
- TREFAUT, M. R. Herpetofauna da Caatinga. In: **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Leal, I.R.; Tabarelli, M.; Silva, J. M. C. (eds). Editora Universitária da UFRPE, pp. 181-236. 2003.
- VAN SLUYS, M.; MARRA, R. V.; BOQUIMPANI-FREITAS, L.; ROCHA, C. F. D. Environmental factors affecting calling behavior of sympatric frog species at na Atlantic Rain Forest Area, southeatern Brazil, **Journal of herpetology**, v. 46, n. 1, p. 41-46, 2012.
- VASCONCELOS, T. S.; ROSSA-FERES, D. C. **Diversidade, distribuição espacial e temporal de anfíbios anuros (Amphibia, Anura) na região Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil**. **BiotaNeotrop**, v. 5, n. 2, p. 1-14, 2011.

VIERA, W. L. S.; ARZABE, C.; SANTANA, G. G. **Composição e distribuição espaço-temporal de anuros no Cariri Paraibano, nordeste do Brasil.** *Oecologia Brasiliensis*, v. 11, n. 3, p. 383- 396, 2007.

VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology** – Elsevier. 2009.

_____, L. J.; CALDWELL, J. P.; WILBUR, W. M.; SMITH, D. C. **Amphibians as harbingers of decay.** *Bioscience*, v. 40, p. 418, 2001.

WELLS, K. D. **The ecology and behavior of amphibians.** The University of Chicago, London. 1400p. WE, 2007.

_____, K. **The Ecology and Behavior of amphibians** – The University of Chicago Press. 2010.

XIMENEZ, S. S.; TOZETTI, A. M. Seasonality in anuran activity and calling season in a Brazilian subtemperate wetland. *Zoological Studies*, v. 2015, n. 1, p. 54-47, 2015.

ZIERI.R, T.; OLIVEIRA, C. **Melanocytes in the testes of *Eupemphixnattereri* (Anura, Leiuperidae):** histological, stereological, and ultrastructural aspects, p. 795–800, 2007.