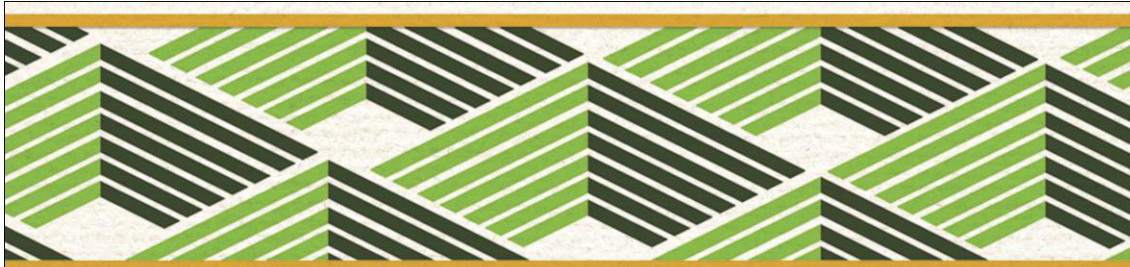


Seminário de Pesquisa Científica da Floresta Nacional do Tapajós

ANAIS DO II SEMINÁRIO DE PESQUISA CIENTÍFICA DA
FLORESTA NACIONAL DO TAPAJÓS



FLORESTA NACIONAL DO
TAPAJÓS
ICMBio-MMA



FLORESTA NACIONAL DO
TAPAJÓS
ICMBio-MMA



Ministério
do Meio Ambiente



APOIO:



COMPARAÇÕES AMBIENTAIS DE *Bothrops atrox* NA AMAZÔNIA ORIENTAL

MARTINEZ, Melissa Gaste¹; CHALKIDIS, Hipócrates de Menezes²; OLIVEIRA JR, Raimundo Cosme de³; MOURÃO, Rosa Helena Veras⁴; SILVA, Ana Moura da⁵; NETO, Francisco Alves de Freitas³; MARTINELLI, Luiz Antônio¹; CAMARGO, Plínio Barbosa de¹.

RESUMO

A região de Santarém (PA) está relacionada com 92% dos acidentes ofídicos, dos quais 20% foram considerados graves. Através do uso da metodologia dos isótopos estáveis do carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) e do nitrogênio-15 ($\delta^{15}\text{N}$), pretende-se verificar se as variações dos hábitos e fontes alimentares existentes nos diferentes ambientes e usos de solo na Amazônia, neste caso áreas de floresta, savana e pastagem, influenciam na composição isotópica das serpentes encontradas nestes ambientes, de forma a auxiliar estudos de correlação, com a variabilidade de seus venenos. As serpentes, assim como as suas possíveis presas, foram coletadas nos três ambientes, através de três métodos de coleta – encontro ocasional, busca ativa e armadilhas de interceptação e queda – e tiveram os seus tecidos analisados isotopicamente. Ainda serão realizadas mais coletas de serpentes e de suas fontes alimentares e essas amostras dos diferentes ambientes também serão analisadas isotopicamente. Supõe-se que as diferentes fontes alimentares nos diferentes ambientes serão isotopicamente distintas, com reflexo na composição isotópica dos tecidos das serpentes. Caso se confirme tais hipóteses este estudo contribuirá para o conhecimento da ecologia da serpente e seu uso dos ambientes, ainda pouco relatados, como para o aprimoramento futuro dos soros antiofídicos e diminuição das seqüelas geradas pelos acidentes.

Palavras-chave: Serpentes, Ambientes, Isótopos estáveis.

1. INTRODUÇÃO

As *Bothrops* são um gênero de serpente da família viperidae, com espécies popularmente conhecidas como jararacas. Essas serpentes peçonhentas, encontradas na América Central e do Sul são responsáveis por causarem acidentes em seres humanos não somente no Brasil, mas também em outros países da América Latina (McDIARMID; CAMPBELL; TOURÉ, 1999). O gênero apresenta atualmente 32 espécies com grande variabilidade dos padrões de coloração, tamanho e ação da peçonha. As espécies do gênero que causam mais acidentes ofídicos são a *B. atrox* (Amazônia brasileira), *B. jararaca* (Centro - Sul do Brasil) e *B. asper* (Peru, Colômbia e

¹Centro de Energia Nuclear na Agricultura – USP. Email: martinez.melissa@yahoo.com.br

²Faculdades Integradas do Tapajós.

³CPATU, Embrapa, Santarém, Para, Brasil.

⁴Universidade Federal do Pará

⁵Instituto Butantan.

Venezuela). Acidentes sem o tratamento adequado levam a taxa de mortalidade estimada em 7%. Com o uso correto do soro antiofídico e tratamento de suporte, essa taxa é reduzida para 0,5 e 3% (CAMPBELL; LAMAR, et. al. 2004).

Por seu alto índice de acidentes e devido a sua agressividade, a *Bothrops atrox* é considerada uma das serpentes mais perigosa da América do Sul. Apesar disso, esta espécie é muito pouco estudada por ser simpátrica da Amazônia, um local pouco explorado, sendo necessárias informações prioritárias de sua ecologia e história natural. Ela é uma espécie muito abundante na Amazônia oriental, principalmente na região de Santarém, estado do Pará, na qual há a diversidade mais rica registrada até o momento em sua distribuição geográfica (CUNHA et al., 1985; NASCIMENTO et al., 1987; DUELLMAN, 1990; CUNHA; NASCIMENTO, 1993; MARTINS; OLIVEIRA, 1998). Alguns estudos com esta serpente mostraram ser uma espécie generalista, consumidoras principalmente de centopéias, peixes, anuros, lagartos, outras serpentes, aves e pequenos mamíferos (MARTINS; GORDO, 1993; EGLER et al., 1996; MARTINS; OLIVEIRA, 1998; MARTINS et al., 2002; OLIVEIRA; MARTINS, 2001; MACEDO-BERNARDE; BERNARDE, 2005; NASCIMENTO et al., 2008).

Essa jararaca, assim como algumas outras espécies, torna a região de Santarém uma área com alta incidência de acidentes ofídicos, o que pode estar relacionado à maior diversidade ambiental na região, o que possibilitam a existência e concentração de todos os gêneros de serpentes peçonhentas ocorrentes no Brasil.

Nesta região, áreas como a Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), a Reserva Extrativista (RESEX - Rios Tapajós e Arapiuns) e a várzea do rio Amazonas, são exemplos da diversidade ambiental. Somam-se a essa, o surgimento de pastagens no início da década de 70, e mais recentemente, a substituição destas pastagens pelo cultivo de soja. Esse reordenamento espacial interfere na estrutura das comunidades ofídicas, em especial as taxocenoses de interesse médico como a *Bothrops atrox*.

A compreensão da influência de fatores ecológicos e históricos na estruturação de comunidades de serpentes, devem ser baseada em conhecimentos prévios sobre a sistemática e biogeografia dos grupos, assim como nas relações de ocorrência e abundância de espécies com fatores bióticos (e.g. disponibilidade de alimento, estrutura da vegetação) e abióticos (pluviosidade, temperatura do ar, radiação solar). Esses fatores podem influenciar os padrões de riqueza e abundância locais, assim como, o uso dos recursos e as atividades das serpentes ao longo do ano. Além disso, a correlação entre clima, riqueza e a energia disponível no ambiente, podem ainda ser caracterizados como

fatores limitantes ao comportamento e distribuição espacial de uma espécie (BERNARDE et al., 2000; OUTEIRAL, 2006; SAWAYA, et. al, 2008).

Acredita-se que venenos de serpentes são influenciados pelo tipo de presa consumida, o que interfere na composição das proteínas formadas no organismo do animal, e conseqüentemente, na toxicidade deste veneno (MACKESSY, 1988; ANDRADE; ABE, 1999; MACKESSY et al., 2006; ZELANIS et al., 2008; MACKESSY et al., 2003). A variabilidade na composição dos venenos pode ser verificada entre as diferentes espécies, e de forma intraespecífica representada por variações ontogenéticas (SALDARRIAGA et al., 2003, GUÉRCIO et al., 2006), ligadas ao sexo (MENEZES et al., 2006), ou conforme a distribuição geográfica (ALAPE-GIRÓN et al., 2008). A abundância e diversidade de presas, também devem influenciar na composição do veneno e variações relacionadas ao ambiente ocupado, com diferentes usos do solo, ainda não são conhecidas.

A metodologia isotópica e as análises da ocorrência natural de isótopos estáveis ambientais têm possibilitado grandes avanços em estudos de ecologia animal, especialmente nas áreas de: origem, comportamento, dieta, estrutura trófica, metabolismo e reprodução (MCKECHNIE, 2004; NEWSOME et al., 2007). Estas investigações demonstram que as composições isotópicas dos tecidos de animais dependem principalmente da alimentação, da água ingerida e dos gases inalados. Associados a estes fatos, os efeitos dos isótopos estão ligados aos processos metabólicos (KENNEDY; KROUSE, 1990).

É pouco compreendido como os isótopos estáveis, uma vez modificados ou fracionados são incorporados aos tecidos (MIZUTANI et. al., 1991) Rankama (1956) observou, que pronunciadas variações naturais ocorrem na composição isotópica do carbono e a razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, através da determinação por espectrometria de massa. O valor dessa razão isotópica é uma medida relativa tomada comparativamente a um padrão internacional, ou seja, um fóssil carbonatado da era Cretaceous (*Bellefinitella Americana*) da formação *Pee Dee* na Carolina do Sul, denominada de PDB. A razão ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) se expressa com terminologia em delta per mil, relativo ao padrão internacional.

A fonte primária de carbono das plantas terrestres é o gás carbônico (CO_2) atmosférico, o qual tem o valor de $\delta^{13}\text{C}$ aproximadamente $-7,7\text{‰}$. (KENNEDY; KROUSE, 1990). Nas rotas bioquímicas do processo de fotossíntese, quando o primeiro composto orgânico sintetizado é constituído de três átomos de carbono, estas plantas são

denominadas de plantas do ciclo fotossintético C₃. Quando apresentam quatro átomos de carbono, estas são denominadas de plantas do ciclo fotossintético C₄.

No grupo C₃ encontram-se cerca de 86% das espécies vegetais do planeta. No grupo das plantas C₄, destacam-se as gramíneas, milho, cana-de-açúcar e gramíneas tropicais, dentre outras (VOGEL, 1993). Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ das plantas C₃, variam de -24 a -38‰ com valor modal de -28‰; as plantas C₄, sofrem variações de -9 a -14‰, determinando um valor modal de -12‰ (DENIRO; EPPSTEIN, 1978).

No caso do isótopo estável de nitrogênio, o padrão internacional é o ar atmosférico, o qual é considerado uma mistura isotópica homogênea na superfície terrestre. Os valores do nitrogênio-15 ($\delta^{15}\text{N}$) são expressos em terminologia de delta per mil da razão isotópica $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ do produto, em relação ao padrão internacional definido (DUCATTI et. al., 2002).

Diferentemente do carbono, a razão isotópica $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ nas plantas não depende do ciclo fotossintético realizado, no caso das leguminosas que utilizam o ar atmosférico como fonte para a fixação do nitrogênio, esta razão aproxima-se do padrão internacional e no caso das gramíneas, que dependem do solo como fonte de nitrogênio, esta razão varia em função de cada solo específico, dependente de inúmeros fatores como clima e adubação. Assim como o carbono, a abundância natural de ^{15}N pode ser utilizada como traçador em estudos de nutrição animal.

Em análise da composição isotópica do ^{15}N em diversos materiais de origem terrestre, observa-se que o $\delta^{15}\text{N}$ nos animais varia de +3 a +13‰, enquanto que nas plantas varia de -10 a +10‰, visto que os animais são ricos em ^{15}N quando comparados com os vegetais. (LÉTOLLE, 1980).

Segundo Rodwell (1990), o balanço do nitrogenado é utilizado para avaliar o metabolismo protéico global, a saúde e a condição nutricional dos animais. Quando a quantidade de nitrogênio absorvida é maior que a excretada, observa-se que o indivíduo está com balanço nitrogenado positivo durante o crescimento, se a excreção é maior que a absorção o balanço nitrogenado é negativo. O equilíbrio nitrogenado ocorre em adultos normais, com absorção igual à excreção. Assim, a quantificação do nitrogênio absorvido e o excretado é uma forma de avaliar a renovação de proteínas e outros compostos celulares, ampliando as metodologias possíveis de serem utilizadas.

Létolle (1980), tendo por base os trabalhos de (HOERING, 1955 e GAEBLER, et al., 1963), mostraram um possível modelo do enriquecimento de nitrogênio-15 entre a alimentação e o animal como um todo.

Koch et. al. (1994), demonstraram também através de níveis tróficos, o modelo da variação do nitrogênio nas plantas e o fracionamento do ^{15}N nos diferentes níveis tróficos, incluindo herbívoros, carnívoros e onívoros.

Piasentier et al. (2003), caracterizaram carnes de ovelhas em função da origem de países europeus e do regime de alimentação. Esta caracterização foi obtida através da análise de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, nas proteínas puras da carne de ovelhas alimentando-se de pasto (C_4), leite (C_4) e cereais (C_3).

Piasentier et al. (2003), avaliaram também a efetividade da técnica dos isótopos estáveis do $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ como uma metodologia para a certificação da origem geográfica e do regime de alimentação de carneiros. Acredita-se que as diferenças encontradas nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ podem ser devidas ao tipo de solo, a aplicação de fertilizantes orgânicos, assim como, a presença de plantas leguminosas que discriminam o N_2 atmosférico, ou ao próprio metabolismo animal.

A investigação da influência da dieta na distribuição de isótopos de nitrogênio em animais evidenciou que os tecidos apresentam normalmente valores maiores de ^{15}N em relação aos encontrados em plantas. Esse progressivo enriquecimento demonstrado em tecidos animais é decorrência dos caminhos catabólicos que favorecem a liberação do isótopo mais leve. Sendo assim, a cada nível trófico ocorre um aumento no valor isotópico do $\delta^{15}\text{N}$. Estudos realizados por Minagawa e Wada (1984), mostraram um enriquecimento de ^{15}N na cadeia alimentar de aproximadamente 3‰ entre cada nível trófico.

A base do uso de isótopos estáveis em nutrição animal deve-se ao fato que, a composição isotópica de um consumidor (serpente), reflete a composição isotópica de itens alimentares presentes em sua dieta (presas), descontando-se qualquer fracionamento isotópico que haja no processo de aquisição, digestão e incorporação dos átomos de carbono e nitrogênio advindos da dieta que são incorporados nos processos metabólicos em um determinado tecido (músculo, coração, fígado, sangue, escama, pele) do consumidor.

Assim, este estudo pretende contribuir para o conhecimento das fontes alimentares nos ambientes que essa serpente causadora de acidentes ofídicos ocorre, a fim de contribuir para o desenvolvimento de soros antiofídicos mais eficientes na região amazônica.

Através do uso da metodologia dos isótopos estáveis do carbono (^{13}C) e do nitrogênio (^{15}N), pretende-se verificar se as variações dos hábitos e fontes alimentares

existentes nos diferentes ambientes e usos de solo na Amazônia, neste caso áreas de floresta, savana e pastagem, influenciam na composição isotópica das serpentes encontradas nestes ambientes, de forma a auxiliar estudos de correlação, com a variabilidade de seus venenos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

Este estudo foi realizado na região amazônica mais especificamente no estado do Pará, por ser o local com maior incidência de acidentes ofídicos (Figura 1). Foram amostradas serpentes da espécie *B. atrox* em três áreas com diferentes usos do solo, sendo dois ambientes naturais e um antropizado. Uma área será subdividida em duas áreas de floresta de terra-firme, a Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), distantes da cidade de Santarém a cerca de 67 km ($2^{\circ}53'59,65''S$, $54^{\circ}56'13,75''O$) e 83 km ($3^{\circ}02'19,59''S$, $54^{\circ}56'05,03''O$), respectivamente, (Figuras 2 e 3), no município de Santarém (PA).

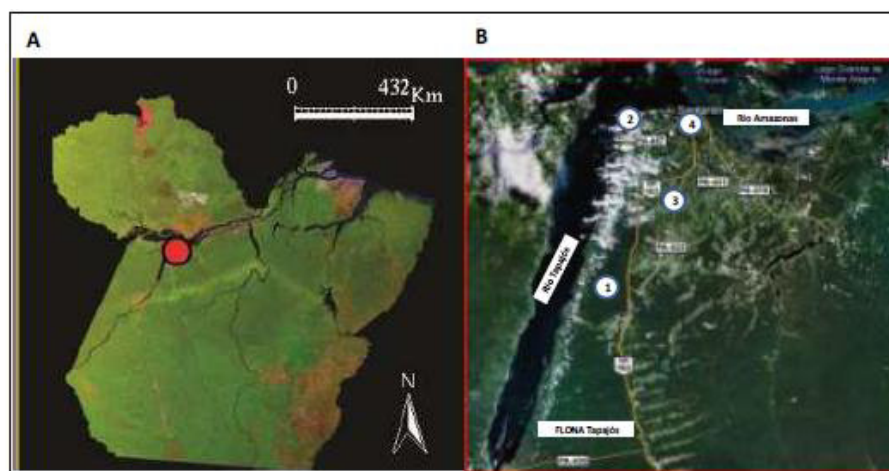


Figura 1: Áreas de estudo – A: localização do município de Santarém no estado do Pará (círculo vermelho), B: áreas de amostragem de (1) floresta, (2) savana, (3) pastagem, (4) região urbana de Santarém.



Figura 2: Área de floresta 67 Km a Floresta Nacional do Tapajós.



Figura 3: Área de floresta 83 Km da Floresta Nacional do Tapajós.

A segunda área de amostragem foi uma área de savana, composta por uma mistura de árvores esparsas e gramíneas nativas localizada próximo a vila de Tapari, no município de Santarém ($2^{\circ}25'26,65''S$, $54^{\circ}55'28,18''O$) (Figura 4).



Figura 4: Área de savana, próximo à vila do Tapari.

Finalmente, em uma área de pastagem, cultivada com *Brachiaria umidicola*, localizada a margem da rodovia Santarém-Cuiabá, próximo à Vila de São Jorge, pertencente ao município de Belterra (PA) ($3^{\circ}10'14,41''S$, $54^{\circ}59'23,13''O$) (Figura 5).



Figura 5: Área de pastagem cultivada, próximo à vila de São Jorge.

2.2 Métodos de coleta

As serpentes foram coletadas utilizando-se diferentes métodos de captura, foram sempre identificadas, georreferenciados e anotados por qual método de captura foram coletados:

- a) *Armadilhas de interceptação e queda*, (HEYER *et al*, 1994; CECHIN; MARTINS, 2000) - Este sistema consiste em enterrar baldes plásticos (110 L)

que foram ligados por cerca guia (lona plástica ou telas) em cada um dos ambientes estudados, (floresta, savana e agrícola). Em cada uma das áreas, foram instalados onze baldes, dispostos a intervalos de 10 m ao longo de uma linha e interligados por uma cerca guia constituída de uma lona plástica ou tela verde (mosquiteiro) de 1,60 metros de altura. Esta cerca guia foi enterrada a 10 cm abaixo do solo mantida na posição vertical por estacas de madeira com 1,80 metros de altura, dentro de cada balde, foi colocado uma placa de isopor (25 x 25 x 5 cm) apoiada em quatro espetos de madeira e um pequeno recipiente de água, para criar um micro ambiente úmido e abrigado do sol evitando assim, a morte por desidratação (Figura 6). Elas permaneceram abertas durante cinco dias em cada semana de coleta, onde no primeiro dia foram abertas as armadilhas, (que permanecem fechadas com tampas plásticas, fora do período de coleta) e fechadas no último dia da expedição para evitar que exemplares eventualmente caíam nas armadilhas e venham a morrer presos nas mesmas. As armadilhas foram vistoriadas diariamente sendo coletados as *B. atrox* e alguns animais que possam servir de alimento das mesmas, o restante dos animais foram devolvidos ao ambiente. Todas as coletas possuem a devida autorização e licença do IBAMA/ICMBIO nº32098-1 com data de 07/12/2011.

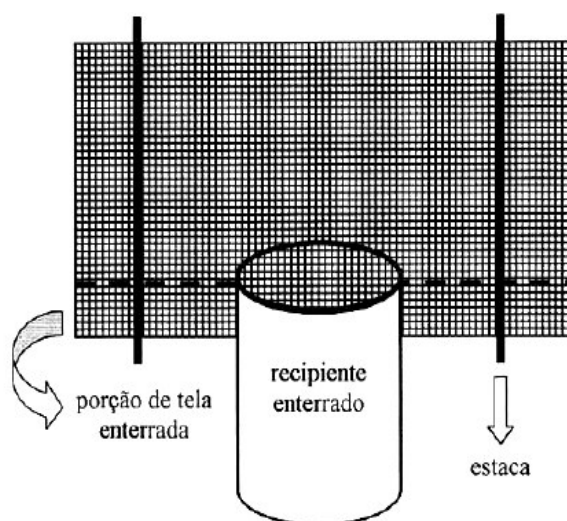


Figura 6: Esquema de um trecho de armadilhas de queda com cerca-guia. A linha tracejada representa o nível do solo (CECHIN; MARTINS, 2000).

- b) *Procura visual ativa limitada por tempo* (MARTINS; OLIVEIRA, 1998) - Este método consiste em buscas realizadas durante o dia e a noite em trajetos realizados a pé com velocidade de 1 km/h, em trilhas, estradas secundárias,

matas de galeria e locais próximos a residências. Com esta metodologia procura-se aumentar o esforço de captura dos animais e amostrar o maior número possível de microhabitats desses ambientes, buscando-se animais em atividade em abrigos (e.g., tocas, sob pedras, troncos caídos, formigueiros) ou apenas vestígios (mudas). A procura foi realizada em apenas um horário do dia nos períodos de coleta, pois o que nos interessa é a serpente *B.atrox* daquela área.

c) *Encontro ocasional* - Corresponde ao encontro de serpentes durante atividades distintas dos demais métodos de amostragem. Para cada espécime capturado foram anotadas as seguintes informações: hora, a data de coleta, ponto georeferenciado, método de coleta, micro-habitat (chão aberto, serrapilheira, sobre arbustos e/ou arvores, sob a vegetação e/ou troncos ou pedras) e foram então acondicionados em caixas plásticas e transferidos para o laboratório de pesquisas zoológicas da FIT, onde serão identificados e analisados morfológicamente (sexo, peso, comprimento total, comprimento da cauda). De cada espécime foram obtidas amostras de escama, sangue e fezes. Os animais que eventualmente vierem a óbito durante seu transporte do campo para o laboratório foram amostrados seu fígado, coração, músculo e se possível seu conteúdo estomacal para a verificação de itens alimentares. Será também obtido caso possível, amostras de veneno.

Além das serpentes, alguns invertebrados e vertebrados descritos na literatura como constituintes da dieta de *B. atrox*, também foram coletados, dentre eles: aranhas, lagartos, escorpiões, anfíbios e pequenos mamíferos, que foram encontrados nas armadilhas de interceptação e queda, a fim de obter suas assinaturas isotópicas para a determinação de fontes alimentares nas serpentes. As presas foram identificadas ao menor nível taxonômico possível, com o auxílio de especialistas de cada grupo taxonômico da região (em parceria com a FIT – Faculdades integradas Tapajós).

2.3 Análise isotópica

As amostras de tecido foram limpas manualmente para a remoção de contaminantes provenientes do ambiente ou mesmo de algum outro tecido do próprio animal, fragmentadas no menor tamanho possível e moídas a uma granulometria menor que 0,250 mm, para isso foi utilizado um moinho criogênico do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais (CIE) da UNESP – Botucatu. Caso fosse necessário, a retirada de

água e gorduras, as amostras foram liofilizadas e desengorduradas, uma vez que a parte lipídica (gordura) ocasiona uma diferença isotópica de até 5‰ no carbono-13 (Piasentier et al. 2003), utilizando um extrator de gordura Soxhlet (SARGE APARELHOS LTDA-MODELO TE-044, PIRACICABA, BRASIL). O material resultante foi pesado (aproximadamente 2 a 3 mg) em balanças de alta precisão (0,001mg), e colocado em pequenas cápsulas de estanho para a análise. As composições isotópicas de carbono e nitrogênio foram determinadas pela técnica CF-IRMS (Continuous Flow – Isotope Ratio Mass Spectrometers) através da combustão “on-line” da amostra, em um analisador elementar Carlo Erba (CHN-1110). No Laboratório de Ecologia Isotópica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP) Neste processo, os gases gerados pela combustão da amostra, são purificados e separados através de uma coluna cromatográfica gasosa e posteriormente inseridos diretamente no espectrômetro de massas, (IRMS Delta Plus; Finnigan Delta Plus), para a determinação das razões isotópicas.

A abundância natural de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ é expressa como desvio por mil (‰) em relação a um padrão internacionalmente reconhecido (ver equação 1). O erro analítico para o C é de até 0,3‰, para o $\delta^{13}\text{C}$ e de até 0,5‰ para o N, em análises de $\delta^{15}\text{N}$.

$$\delta^{13}\text{C} = (R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}} - 1) \times 1000 \quad (1)$$

2.4 Análises estatísticas

Todos os dados analisados anteriormente de serpentes e suas contribuições alimentares das três áreas analisadas foram testados através da análise de variância (ANOVA) e posteriormente o teste de Tukey foi aplicado para explicar qualquer diferença significativa apresentada pela ANOVA. As análises foram realizadas com o pacote estatístico STATISTICA, versão 11 para Windows (Sttsoft, inc.2012).

Para cada teste realizado, primeiramente, foi testada a normalidade dos dados, caso os mesmos não sigam uma distribuição normal foram transformados utilizando-se a técnica Box-Cox.

As diferenças entre a composição isotópica das serpentes e presas agrupadas por ambientes (floresta x savana x pastagem) foram testadas por análise de variância. Em casos onde as probabilidades encontradas pela análise de variância forem significativas, foi aplicado o teste de *tukey*. As Probabilidades iguais ou inferiores a 0,5 foram consideradas significativas.

Para a determinação da contribuição relativa dos diversos itens alimentares, será utilizado o modelo SIAR (*Stable Isotope Analysis in R*). Este modelo baseia-se em um modelo de mistura isotópica utilizando-se de técnicas Baeynsiana e desenvolvido na plataforma computacional R (Parnell et al., 2010).

Este modelo tem sido amplamente utilizado na literatura devido sua precisão e seu uso relativamente fácil. O modelo requer a entrada dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ do consumidor (serpentes) e a composição isotópica média das possíveis fontes alimentares, bem como, o fracionamento isotópico médio adotado entre consumidor-dieta. Este fracionamento é relativamente baixo (0 a 1‰) no caso do carbono e situa-se em torno de 3‰ a 4‰ no caso do nitrogênio. O valor mais utilizado na literatura é de 3,4‰ (Newsome, 2007). Para os novos dados inseridos nos resultados, estão sendo feitos os tratamentos estatístico, pois aumentaram o número de amostra que já existiam e ainda foram inseridas novas variáveis, que não haviam nos resultados anteriores.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para esse estudo, foram realizadas amostragens de *Bothrops atrox* (*B. atrox*), e presas em potencial como pequenos vertebrados e invertebrados em áreas de floresta (FLONA-Tapajós), Savana (Tapari) e duas áreas de pastagens: Oriximiná e São Jorge (PA). Na área de floresta (FLONA), foram coletadas 12 serpentes *Bothrops atrox*, uma *Bothrops bilineata*, uma *Lachesis muta*, e uma *Bothrops taeniata*, sendo coletadas até o momento 73 amostras, entre elas, amostras de tecidos como coração, músculo, fígado, conteúdo estomacal, algumas amostras de veneno e amostras de escamas, ecdise, fezes e sangue. Além das serpentes também foram coletadas nove amostras de pequenos vertebrados e invertebrados, sugerindo que esses animais podem ser as fontes alimentares destas serpentes neste ambiente. Os resultados isotópicos dos tecidos e do veneno das *B. atrox* e das outras serpentes no $\delta^{15}\text{N}$ mostraram que estas serpentes (predadoras), encontram-se em um nível trófico acima dos pequenos vertebrados e invertebrados (consumidores) coletados no mesmo ambiente das serpentes e as fezes dessas serpentes, encontram-se no mesmo nível trófico ou abaixo, sendo elas o representativo da dieta dessas serpentes naquele momento. Os resultados das amostras das serpentes e dos outros animais coletados estão dispostos na (Figura 7) e (Figura 8). Na Figura 7, foram observados os resultados isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das amostras coletadas na FLONA e verificou-se, que todos os animais coletados neste ambiente (serpentes, pequenos vertebrados e invertebrados) apresentaram nos resultados de $\delta^{13}\text{C}$

como sendo do próprio ambiente e alimentando-se dele, isto é, apresentando os resultados característicos de plantas da floresta, (plantas C₃). Nestes resultados observou-se um fracionamento da ordem de ±1‰ entre produtor e consumidor. Na Figura 8, estão dispostos todos os resultados do material coletado na FLONA com o número de amostras de cada material (*n*), suas médias e erro-padrão. Nesta figura, como foram incluídos mais resultados e mais uma variável como as fezes a o tratamento estatístico ainda está sendo feito para os novos resultados tanto para δ¹⁵N, como para δ¹³C.

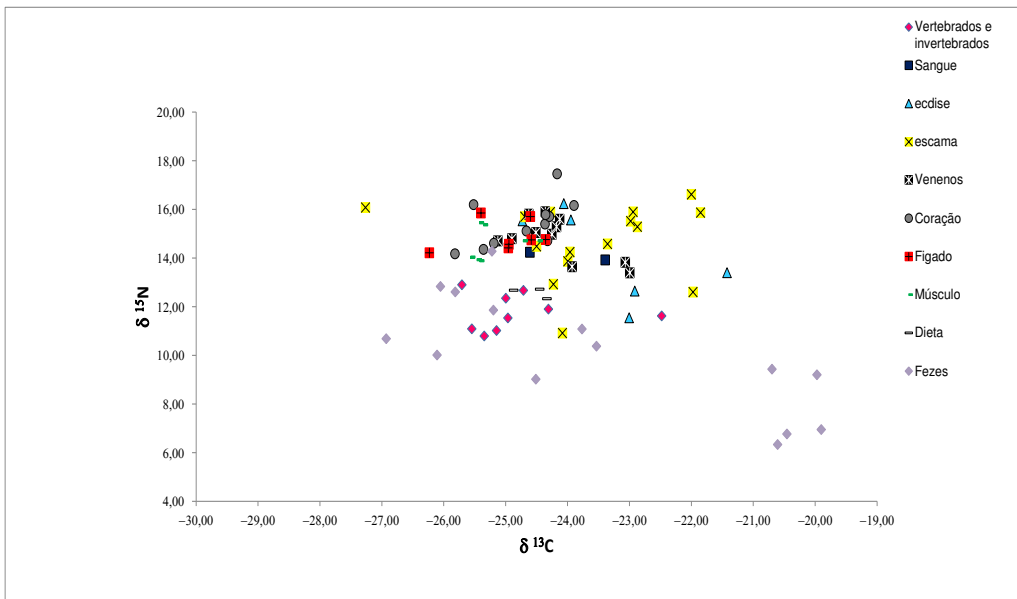


Figura 7. Distribuição dos valores de δ¹³C e δ¹⁵N das amostras coletadas na FLONA – Tapajós.

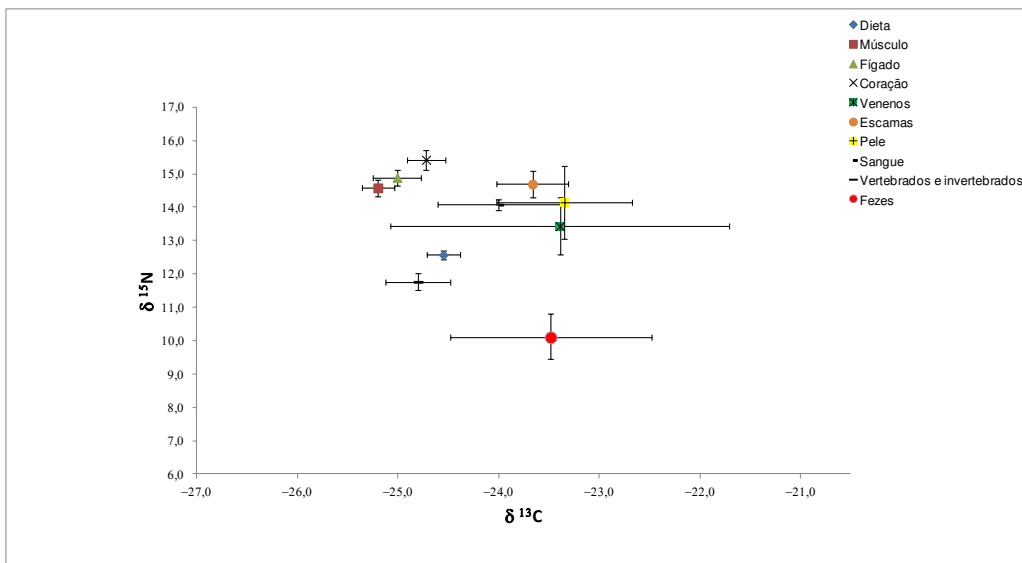


Figura 8: Distribuição dos valores de δ¹³C e δ¹⁵N com as médias e erro-padrão de todas as amostras coletadas na FLONA – Tapajós, comparando as amostras dos vertebrados e invertebrados (*n*=9) e conteúdo estomacal (*n*=3), com as amostras de músculo (*n*=7), Fígado (*n*=7), coração (*n*=11), veneno (*n*=11), escama (*n*=15), ecdise (*n*=3), sangue (*n*=2) Fezes (*n*= 14) de *B. atrox* e outras espécies de serpentes.

Na área de Oriximiná, (área de pastagem), foram coletadas nove serpentes *B. atrox* e entre elas 43 amostras incluindo coração, escama, ecdise fezes e sangue. Nesta área ainda não foram coletados os pequenos vertebrados e invertebrados, não sendo possível comparar as prováveis fontes alimentares com as amostras das *B. atrox*. Esses resultados podem ser visualizados na (Figura 9) e (Figura 10). Na Figura 9, foram observados os resultados isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das amostras coletadas na em Oriximiná e verificou-se, que os tecidos coletados destas serpentes, apresentaram valores intermediários entre a floresta e a pastagem típica. Isto ocorre, pois na Amazônia as pastagens são rodeadas por pequenos fragmentos de florestas e acredita-se que os animais que servem de alimento para essas serpentes podem se refugiar e alimentar-se também nestes fragmentos de floresta.

Na Figura 10, estão dispostos todos os resultados do material coletado das *B. atrox* de Oriximiná o número de amostras de cada material (n), suas médias e erro padrão, comparando as os tecidos analisados. Os tecidos foram coração ($n=1$), escamas ($n=12$), ecdise ($n=2$) fezes ($n=20$) e sangue ($n=7$), tanto no $\delta^{13}\text{C}$ quanto no $\delta^{15}\text{N}$, sendo observada a variabilidade isotópica destes tecidos.

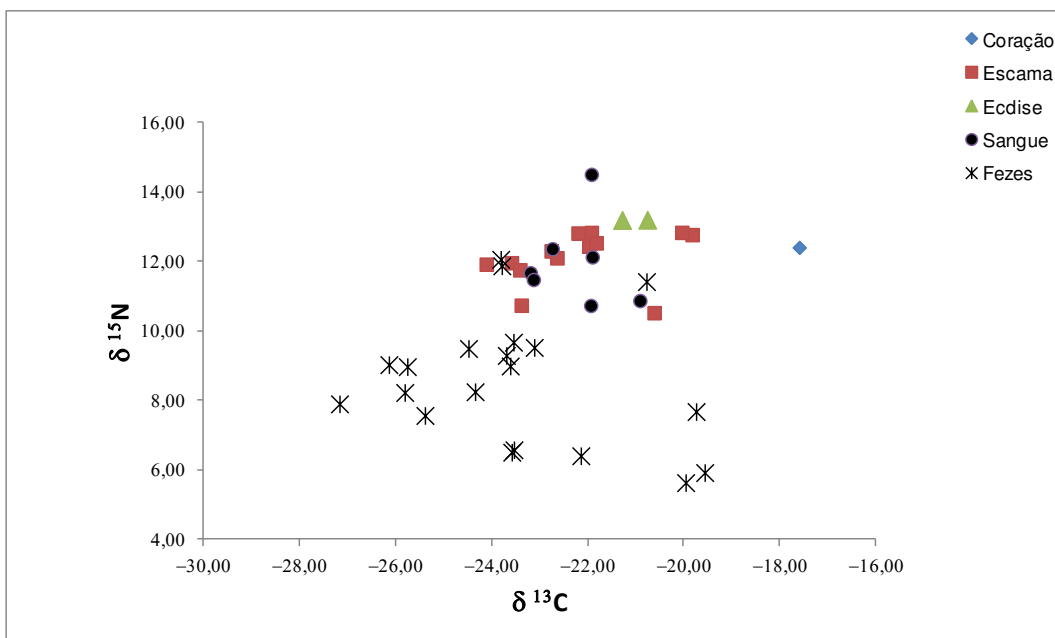


Figura 9: Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das amostras das *B. atrox* coletadas na área de Oriximiná.

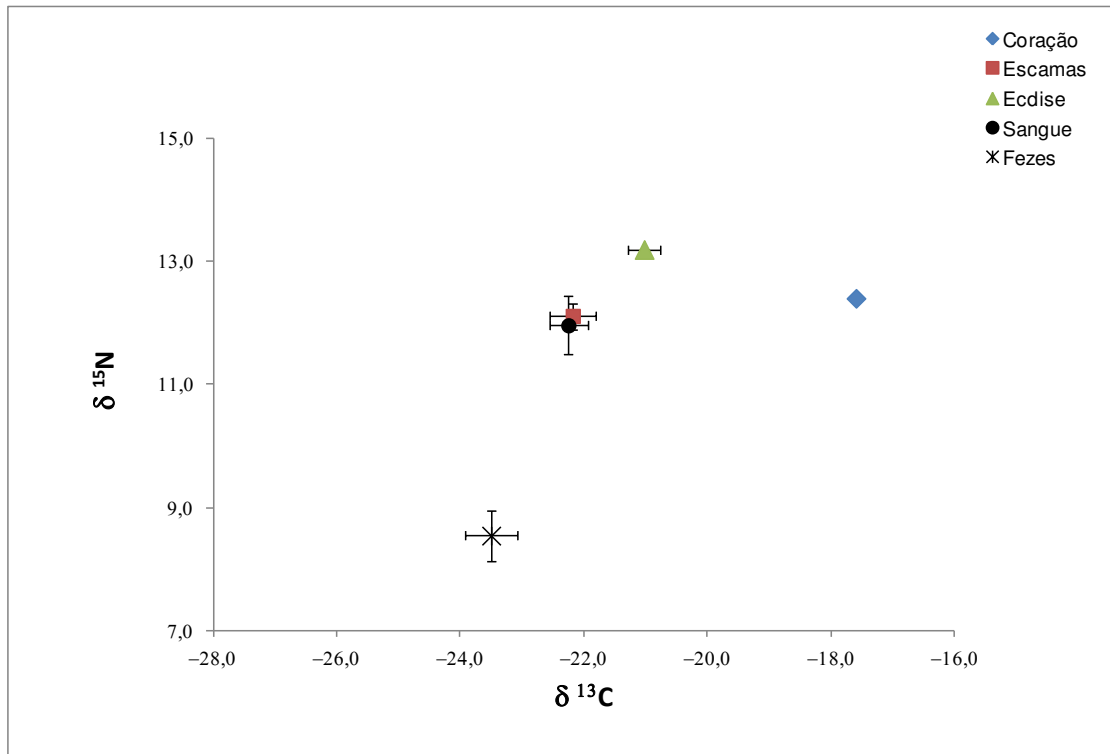


Figura 10: Distribuição das médias e erro-padrão nas amostras das *B.atrox* coletadas na área de Oriximiná, onde, coração ($n=1$), escamas ($n=13$), ecdise ($n=2$) fezes ($n= 20$) sangue ($n=7$), sendo observada a variabilidade isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, nos tecidos analisados.

Na área de São Jorge (pastagem), foram coletadas nove serpentes, sendo cinco *B. atrox* e oito de outras espécies, com um total de 44 amostras entre elas, escamas, fezes, ecdise e sangue. Foram coletadas também 55 amostras de invertebrados e pequenos vertebrados, sugerindo que alguns destes animais podem ser as possíveis fontes alimentares destas serpentes. *B. atrox*, Os resultados das amostras das serpentes e dos outros animais coletados estão dispostos nas figuras 11 e 12. Na Figura 11, foram observados os resultados isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ das amostras coletadas na área de São Jorge e verificou-se também, que todos os animais coletados neste ambiente (serpentes, pequenos vertebrados e invertebrados) apresentaram valores intermediários entre a floresta e a pastagem; pois o corre o mesmo processo da área de Oriximiná, esta área de pastagem também esta rodeada por pequenos fragmentos de floresta apresentando uma grande variabilidade nos resultados de $\delta^{13}\text{C}$. Na Figura 12, estão dispostos todos os resultados do material coletado em São Jorge com o número de amostras de cada material (n), suas médias e erro-padrão. Nesta figura, como foram incluídos mais resultados e mais uma variável, como as fezes o tratamento estatístico ainda está sendo feito para os novos resultados tanto para $\delta^{15}\text{N}$, como para $\delta^{13}\text{C}$.

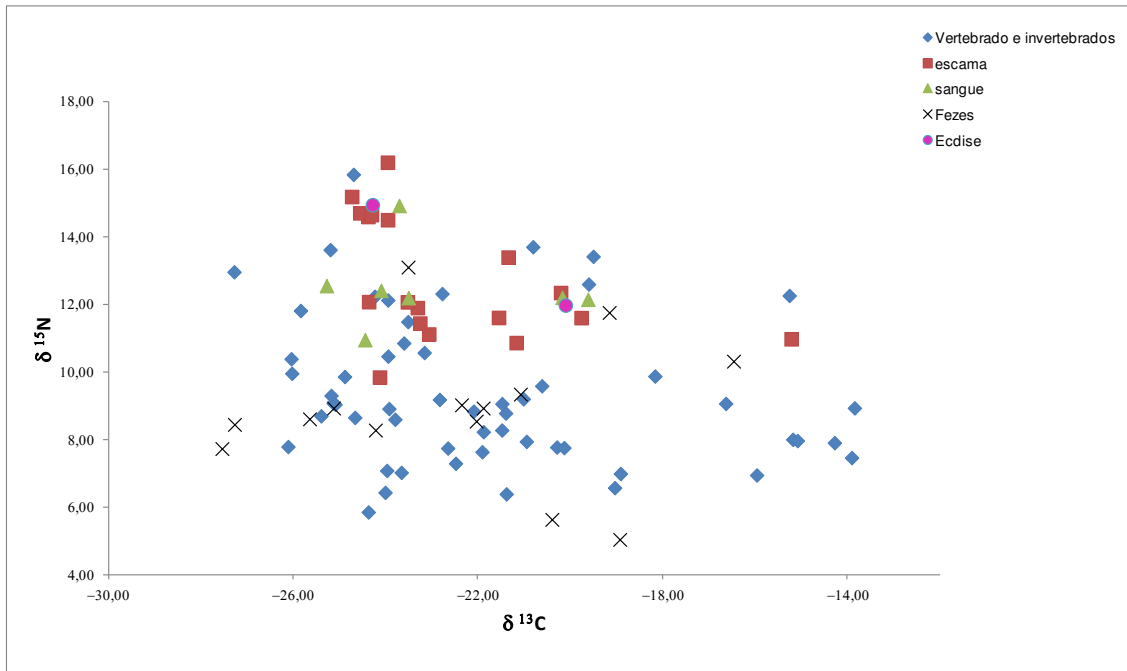


Figura 11: Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das amostras coletadas na área de São Jorge.

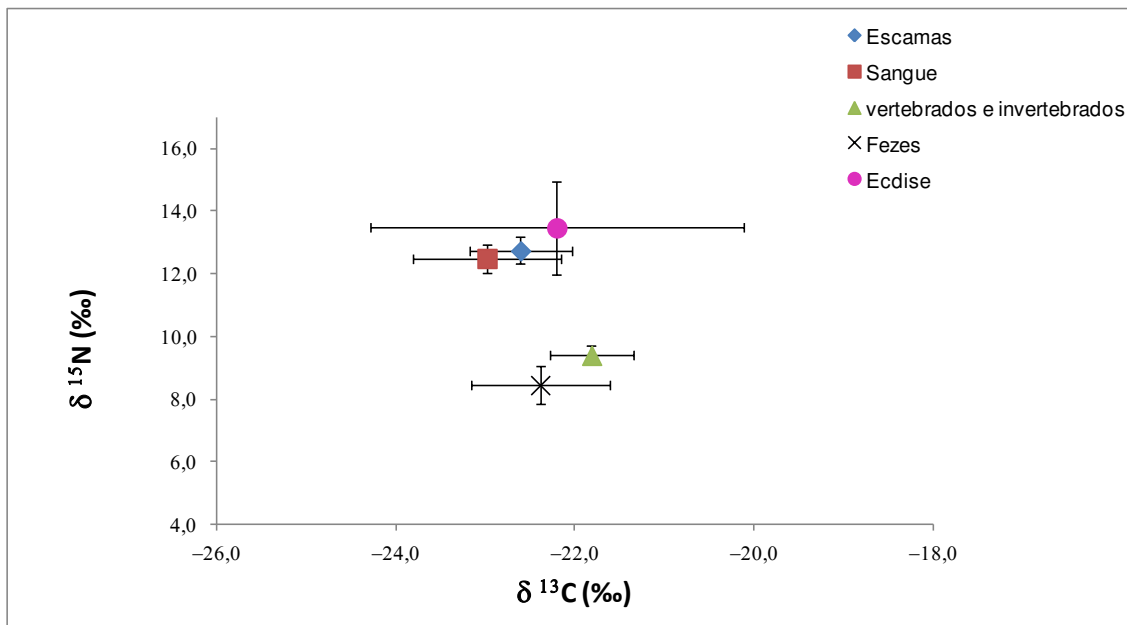


Figura 12: Distribuição das médias e erro-padrão nas amostras das *B.atrox*, ($n=5$) e de outras espécies de serpentes ($n=8$) onde, escamas ($n=18$), sangue ($n=7$), fezes ($n=17$) ecdise ($n=2$) e invertebrados e pequenos vertebrados ($n=55$), coletadas na área de São Jorge, comparando as amostras destes animais com o tecido das serpentes.

Na área de savana, foram coletadas cinco serpentes, sendo quatro *B. atrox* e uma de outras espécies, sendo coletadas 15 amostras como escamas, ecdise e sangue. Foram coletadas também três amostras de invertebrados e pequenos vertebrados, sugerindo que alguns destes animais podem ser as possíveis fontes alimentares destas serpentes, necessitando ainda de futuras coletas. Os resultados das amostras das serpentes e dos outros animais coletados na savana estão dispostos nas (Figura 13) e (Figura 14). Na

Figura 13, foram observados os resultados isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ das amostras coletadas na área de savana e verificou-se também, que todos os animais coletados neste ambiente (serpentes, pequenos vertebrados e invertebrados) apresentaram valores intermediários entre a floresta e a pastagem típica e sendo muito parecida com as pastagens da Amazônia, apresentando uma grande variabilidade nos resultados de $\delta^{13}\text{C}$. Na Figura 14, estão dispostos todos os resultados do material coletado na savana com o número de amostras de cada material (n), suas médias e erro-padrão. Nesta figura, como foram incluídos mais resultados e mais uma variável, como as fezes o tratamento estatístico ainda está sendo feito para os novos resultados tanto para $\delta^{15}\text{N}$, como para $\delta^{13}\text{C}$.

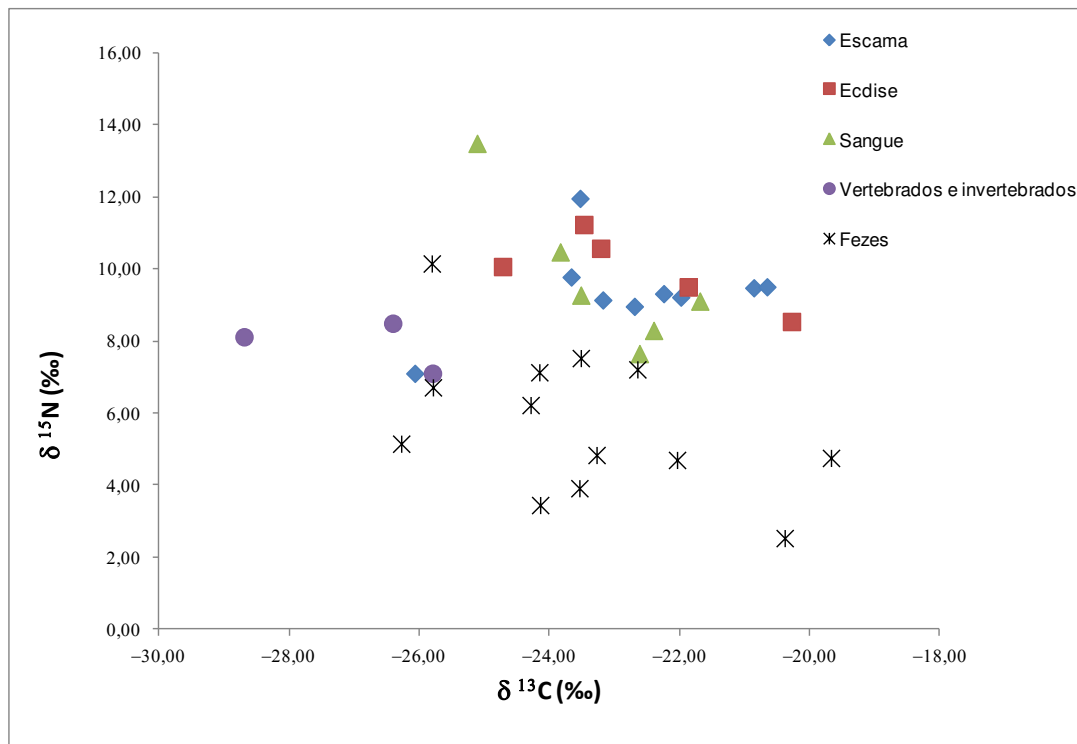


Figura 13: Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das amostras coletadas na área de savana.

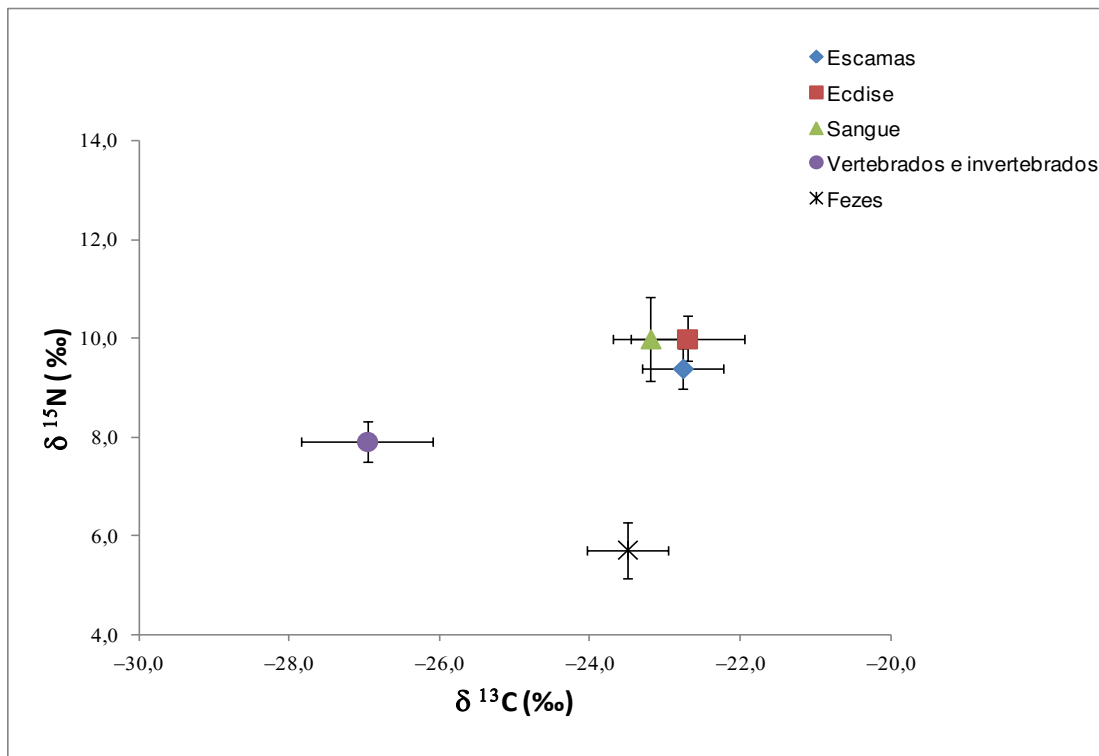


Figura 14: Distribuição das médias e erro-padrão das amostras coletadas na área de Savana das *B.atrox*, ($n=4$) e de outra espécie de serpentes ($n=2$) onde, escamas ($n=9$), ecdise ($n=5$) sangue ($n=6$) fezes ($n=13$) e invertebrados e pequenos vertebrados ($n=3$) comparando as amostras destes animais com o tecido das serpentes.

As (Figuras 15) e (Figura 16) mostraram as diferenças das áreas onde foram coletadas as serpentes e os animais, caracterizando o ambiente em que eles viviam. Foi calculado a média, o erro-padrão e está sendo feito o tratamento estatístico para os novos resultados. As médias dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ dos tecidos das serpentes da Floresta, Oriximiná, São Jorge e Savana foram: -24,1; -22,6; -22,6; -23,1; e 13,8; 10,5; 11,5; 8,1‰, respectivamente. O $\delta^{13}\text{C}$ das serpentes da Floresta apresentaram diferenças isotópicas de $\pm 1,0$ ‰ dos resultados das serpentes de Savana e de $\pm 2,0$ ‰ das áreas de pastagens (Oriximiná e São Jorge). Para os resultados de $\delta^{15}\text{N}$, foram observadas diferenças isotópicas de $\pm 3,0$ ‰ entre a Floresta quando comparadas com Oriximiná, São Jorge e de $\pm 6,0$ ‰ quando compara a floresta com a Savana, mostrando isotopicamente as diferenças de níveis tróficos de cada ambiente analisado. Para os resultados de outros animais coletados nas áreas de Floresta, São Jorge (Pastagem) e Savana, a área de Pastagem apresentou diferença no $\delta^{13}\text{C}$ de $\pm 2,5$ ‰ entre Floresta e Savana, e para os resultados de $\delta^{15}\text{N}$, foram observadas diferenças de $\pm 1,5$ ‰ entre a Floresta diferindo da Pastagem e da Savana. Na (Figura 16), a média dos valores desses animais para o $\delta^{13}\text{C}$ foram: -24,8; -21,8; -25,8‰ e as médias dos valores desses animais para o $\delta^{15}\text{N}$ foram: 11,9; 9,4; 8,3‰.

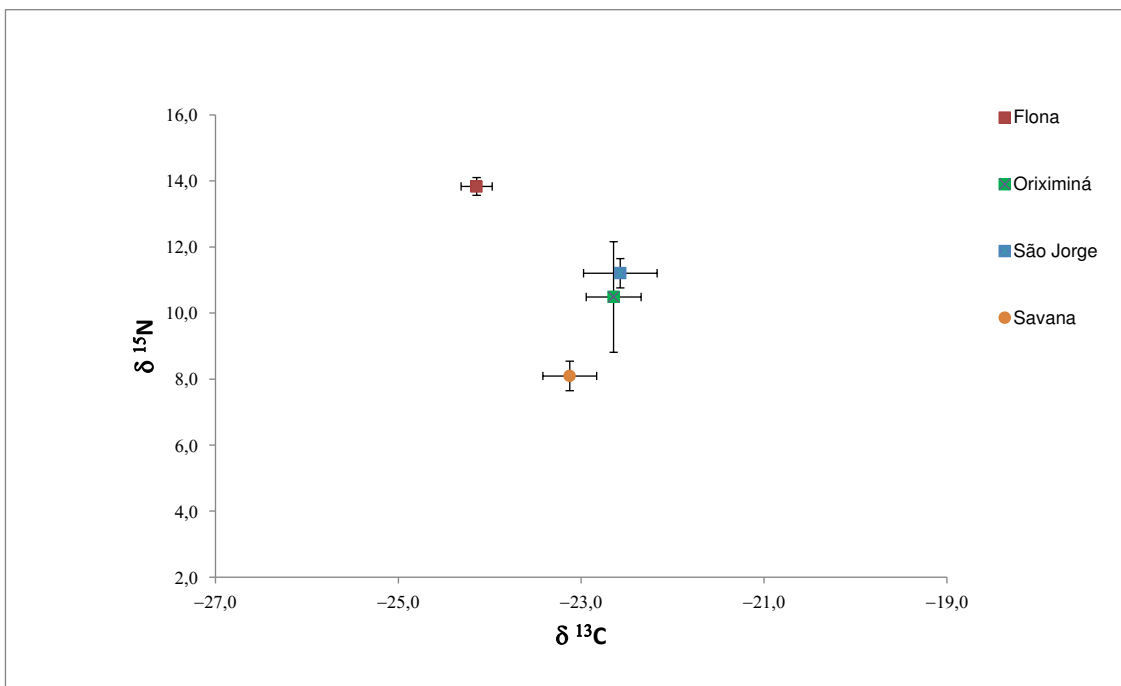


Figura 15: Distribuição das áreas onde foram coletadas as serpentes, com média, erro-padrão.

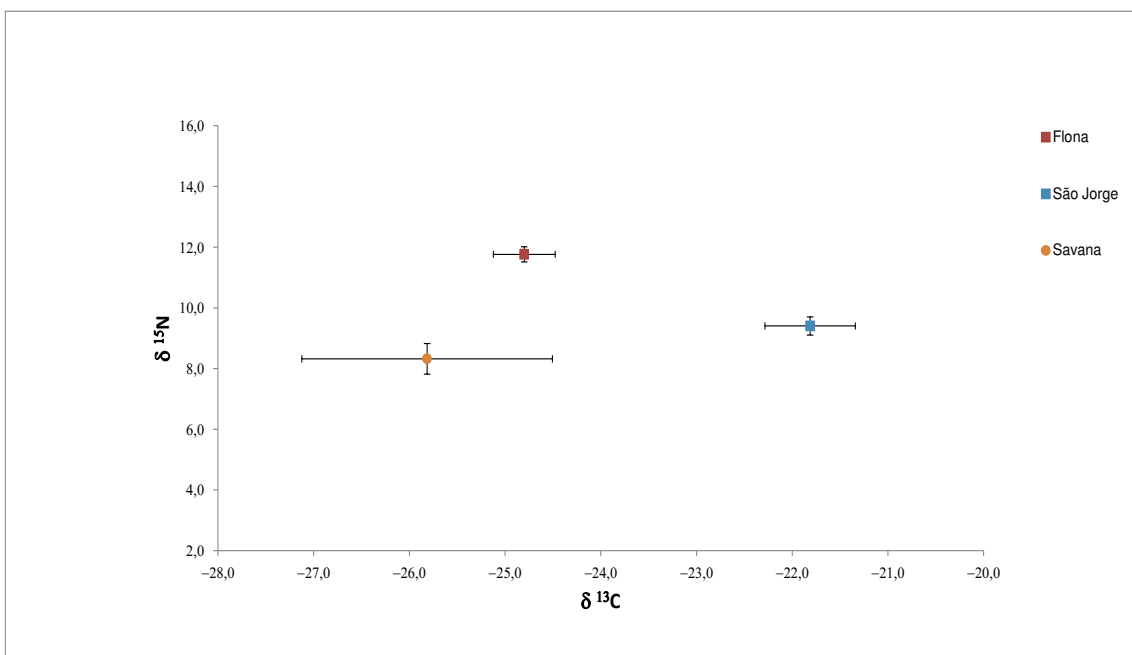


Figura 16: Diferenças das áreas onde foram coletadas as serpentes e os animais, caracterizando o ambiente em que eles viviam. Foi calculado a média, o erro-padrão.

4. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, os animais coletados na floresta (FLONA-TAPAJÓS), vertebrados, invertebrados e as *B.atrox*, são diferentes em sua composição isotópica tanto no carbono-13 e no nitrogênio-15, quando são comparados os vertebrados e invertebrados, com os tecidos das *B.atrox*, podendo também sugerir que

essas diferenças estão relacionadas com o nível trófico (presa e predador) e bem visualizado nos resultados com $\delta^{15}\text{N}$. Isto também acontece quando observamos as outras áreas em que os vertebrados e pequenos vertebrados foram coletados, São Jorge e Savana.

Nos resultados de $\delta^{13}\text{C}$, foi observado que quando analisamos a escama, ecdise, que são tecidos externos das serpentes, esses resultados são bem diferentes dos órgãos e tecidos internos, como sangue, coração, músculo, veneno e fígado, mostrando os diferentes tipos de metabolismo de cada tecido, podendo representar as diferentes fases alimentares destas serpentes, podendo sugerir se elas estão se alimentando de animais das áreas em que foram encontrados. Isto pode ser visualizado também quando analisamos os resultados de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das fezes dessas serpentes, pois seus resultados estão abaixo de seus tecidos e muito parecidos com os resultados de suas fontes alimentares.

Quando são comparadas as diferentes áreas de coleta, essas diferenças são mais claras isotopicamente, pois as áreas possuem vegetações diferentes, animais que residem nestas áreas diferentes, que se alimentam de coisas diferentes e isso é refletido nos animais que ali residem. Esses animais podem ser os vertebrados e invertebrados, nas fontes alimentares dessas serpentes capturadas e analisadas ou nas próprias serpentes que vivem nestas áreas.

Esse estudo pode colaborar para os diferentes tipos de venenos coletados nas *B. atrox* das diferentes áreas e verificar se essas diferenças estão relacionadas com o hábito alimentar e o ambiente.

5. AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer as agências de fomento CAPES e FAPESP pelos auxílios recebidos

6. REFERÊNCIAS

ALAPE-GIRON, A.; SANZ, L.; ESCOLANO, J. FLORES-DIAS, M.; MADRIGAL M.; SASA M.; CALVET J.J.; Snake venomics of the lancehead *Bothrops asper*. Geographical, individual and ontogenetic variations. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 7, p. 3556–3571, 2008.

ANDRADE, D.V.; ABE, A.S.; Relationship of venom ontogeny and diet in *Bothrops*. **Herpetologica**, Lafayette, v. 55, n. 2, p. 200-204.

BERNARDE, P.S.; KOKUBUM, M.N.C.; MARQUES, O.A.; Atividade e uso de hábitat em *Thamnodynastes strigatus* (Günter, 1858), no sul do Brasil (Serpentes, Colubridae). **Boletim do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v. 4 n. 28, p. 1-8, 2000.

CAMPBELL J.A.; LAMAR W.W. The venomous reptiles of the western hemisphere. **Cornell University Press**, Ithaca, New York, v. 2, p. 870, 2004.

CECHIN, S.Z. & MARTINS, M.; Eficiências das armadilhas de interceptação e queda (pitfall traps) em amostragem de anfíbios e répteis do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 17, n. 3, p. 729-740, 2000.

CUNHA, O.R.; NASCIMENTO, F.P.; Ofídios da Amazônia. As cobras da região leste do Pará. **Boletim do Museu. Paraense Emílio Goeldi**. (n.s.), Zoologia, Belém, n. 9, p. 1-191, 1993.

CUNHA, O.R.; NASCIMENTO, F.P.; ÁVILA-PIRES, T.C.S.; Os répteis da área de Carajás, Pará, Brasil (Testudines e Squamatas). **Publicações Avulsas do Museu Paraense Emílio Goeldi**, Belém, v. 40, p. 10-92, 1985.

DE NIRO, M.J.; EPSTEIN, S.; Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, Washington, v.42, p.495-506, 1978.

DUCATTI, C.; CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; MANCERA, P.F.A.; Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agrícola**. Piracicaba, n. 59, p. 29-33, 2002.

DUELLMAN, W.E; Herpetofauna in neotropical rainforests: comparative composition, history, and resource use. **In: Gentry, A. (Ed.). Four Neotropical rainforests**. Yale: Yale University Press, p. 455-505, 1990.

EGLER, S.G.; OLIVEIRA, M.E.; MARTINS, M.; *Bothrops atrox* (common lancehead) Foraging behavior and ophiophagy. **Herpetological Review**, Lawrence, KS, v. 27, n. 1, p. 22-23, 1996.

GAEBLER OH, CHOITZ HC, VITTI TG, VUKMIROVICH R.; Significance of ¹⁵N excess in nitrogenous compounds of biological origin. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.41, p. 1089-97, 1963.

GUÉRCIO, R.A.P.; SHEVCHENKO, A.; SHEVCHENKO, A.; LÓPEZ-LOZANO, J.L.; SOUSA, M.V.; RICART, C.A.O.; Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Protein Science**, New York, NY, v. 4, n. 11, 2006.

HEYER, W.R.; DONNELLY, M.A.; McDIARMID, R.W.; HAYEK, L.C.; FOSTER, M.S.; Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for Amphibians. **Smithsonian Institution Press**, Washington, 1994.

HOERING T. C.; Variations of nitrogen-fifteen abundance in naturally occurring substances. **Science**, Washington, v. 122, p. 1233-1234.

KENNED, B.V.; KROUSE, H.R.; Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 68p. 960-72, 1990.

KOCK P.L. FOGEL M. L. & TURONS N.; Tracing the Diets of Fossil Animals Using Stable Isotope, in: LAJTHA K., MICHENER R.H. (eds) **Stable in Ecology and Environmental Science**.; Blackwell Scientific Publication. Austria, Chapter 4, p. 63-92, 1994.

LÉTOLLE R.; Nitrogen-15 in the Natural Environment in: FONTES J. C. (eds) **Handbook of Environmental Isotope Geochemistry**; Elsevier Scientific Publishing Company, v.1, p. 407-429, 1980.

MACEDO-BERNARDE L.C. ;BERNARDE, P.S.; *Bothrops atrox* (Common Lancehead). Diet, **Herpetological. Review**, Lawrence, KS, v. 36, n. 4, p.456, 2005.

MACKESSY, S.P.; Venom ontogeny in pacific rattlesnakes *Crotalus viridis helleri* and *Crotalus viridis oreganus*; **Copeia**, Lawrence, KS, n. 1, p. 92-101, 1988.

MACKESSY, S.P.;WILLIAMS, K.; ASHTON, K.G.; Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus concolor*. A case of venom Paedomorphosis?; **Copeia**, Lawrence, KS, n. 4, p. 769-782, 2003.

MACKESSY, S.P.; SIXBERRY, N.M.; HEYBORNE, W.H.; FRITTS, T.; venom of the brown treesnake, *Boiga irregularis*; Ontogenetic shifts and taxa-specific toxicity. **Toxicon**, Elmsford, NY, v. 47, p. 537-548, 2006.

MARTINS, M.;GORDO, M.; *Bothrops atrox* (Common Lancehead) Diet., **Herpetological. Review**, Lawrence, KS, v. 24, p. 151-152, 1993.

MARTINS, M.; OLIVEIRA. M.E.; Natural history of snakes in forests of the Manaus Region, Central Amazonian, Brazil. **Herpetological Natural History**, Stanford, v 6, p. 78-150, 1998.

MARTINS, M.; MARQUES, O.A.V.; SAZIMA, I.; Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers (Genus *Bothrops*). **In: Biology of the vipers**. Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E., Green, H.W. (Eds.). Eagle Mountain Publishing, Eagle Mountain, Utah, p.307–328, 2002.

McDIARMID R.W.; CAMPBELL J.A. ;TOURÉ T.; Snakes species of the world: A taxonomic and geographic reference. **The Herpetologist league**, Lawrence, KS, v. 1, p. 511, 1999

McKECHNIE, A. E.; Stable isotopes:powerful new tools for animal ecologists. **South African Journal of Science**, Johannesburg, South Africa, v.100, p. 131 134, 2004.

MENEZES, M.C.; FURTADO, M.F.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S.R.; CAMARGO, A.C.; SERRANO, S.M.; Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**, Elmsford, NY, v. 47, p. 304–312, 2006.

MINAGAWA, M.; WADA, E.; Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between ^{15}N and animal age. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, London, n. 28 p. 1155-1164, 1984.

MIZUTANI H.; KUBAYA Y.; WADA E.; Nitrogen and carbon isotope composition relates linearly in cormorants tissues and its diets **Isotopenpraxis**, Basel, v. 4, p. 166-168, 1991.

NASCIMENTO, F.P.; ÁVILA-PIRES, T.C.S.; CUNHA, O.R.; Os répteis da área de Carajás, Pará, Brasil (Squamata). **II. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, n.s. Zoologia**, Belém, v.3, n.1, p. 33-65, 1987.

NASCIMENTO, P.F.; BERNARDE, P.S.; BUZZETTI, D.R.C.; *Bothrops atrox* (Amazonian Lancehead). Diet. **Herpetological Review**, Lawrence, KS, v.39, n. 3, p. 353, 2008.

NEWSOME, S.D.; DEL RIO, C.M.; BEARHOP S.; PHILLIPS D. L.; A niche for isotopic ecology. **Frontiers in Ecology and the Environment**, Ithaca, NY, v. 5, n. 8, p. 429-436, 2007.

OLIVEIRA, M.E. & MARTINS, M.; When and where to find a pit viper: activity patterns and habitat use of the lancehead, *Bothrops atrox*, in central Amazonia, Brasil. **Herpetological Natural History**, Stanford, v. 8, n. 2, p. 101-110, 2001.

OUTEIRAL, A.B.; **História Natural de uma Comunidade de Serpentes da Serra do Sudeste, Bioma Pampa, Brasil**. Tese de Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Biociências. Porto Alegre, RS, 2006.

PARNELL, A.C.; INGER, R.; BEARHOP, S.; JACKSON, A.L.; Souce partitioning using stable isotopes: Coping with too much variation.; **Plos one**, Unithed Kingdom, v. 5, n. 3, e9672, 2010.

PIASSENTIER, E.; VALUSSO, R.; CARMIN, F.; VERSINI, G.; Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. **Meat Science**, Barking, v.64, p. 239–247, 2003.

RANKAMA, K.; Carbon Isotope, **Geology**, London Pergamon Press, 2⁰edition, Cap 16, p.181-234, 1956.

RODWELL, V.W.; Catabolismo do Nitrogênio dos Aminoácidos :in MURRAY R. HAPER K.; **Bioquímica**, São Paulo: Atheneu, p. 276-285, 1990.

SALDARRIAGA, M.M.; OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; TORO, M.F.; DÍAZ A.; GUTIERREZ, M.J.; Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. **Toxicon**, Elmsford, NY, v.42, p. 405–411, 2003.

SAWAYA, R.J.; MARQUES, O.A.V.; MARTINS, M.; Composição e história natural das serpentes de Cerrado de Itirapina, São Paulo, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, São Paulo, SP, v. 8, p. 127-149, 2008.

STATSOFT, Inc. 2012. Disponível em <<http://www.statsoft.com>>.

VOGEL, J.C.; Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis In: EHLERINGER, J.R; HALE, A; FARQUHAR, G.D. editors. **Stable isotopes and plants carbon-water relations**, San Diego, Academic Press; p. 29-46, 1993.

ZELANIS, A.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; FURTADO, M. F. D.; Ontogenetic changes in the venom of *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae) and its biological implication. **South America Journal of Herpetology**, Washington, v. 3, n. 1, p. 43-50, 2008.