

Melissa Gaste Martinez

**Histórico alimentar das serpentes *Crotalus durissus*
terrificus pela análise do isótopo do carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$)
no guizo.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Doenças Tropicais da Faculdade
de Medicina de Botucatu –
UNESP para obtenção do título
de Mestre em Doenças Tropicais.

Benedito Barraviera

- Orientador –

Carlos Ducatti

- Co-orientador -

Botucatu-SP

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Melissa Gaste Martinez

**Histórico alimentar das serpentes *Crotalus durissus*
terrificus pela análise do isótopo do carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$)
no guizo.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Doenças Tropicais da Faculdade
de Medicina de Botucatu –
UNESP para obtenção do título
de Mestre em Doenças Tropicais.

Benedito Barraviera

- Orientador –

Carlos Ducatti

- Co-orientador -

Botucatu-SP

2009

“O primeiro sinal de sabedoria é a Humildade”.

(Albert Einstein)

Dedicatória

A Deus

Pela proteção constante, força, iluminação, por permitir a minha existência e oportunidade para a realização deste trabalho.

Aos meus pais

José Carlos Martinez e Vanderci Gaste Martinez, pelo exemplo de Fé, Força, Perseverança e Determinação; por terem sempre me apoiado e incentivado em tudo, principalmente no decorrer desta dissertação, nunca deixando eu parar no meio do caminho, por mais difícil que ele fosse.

As minhas irmãs

Mariana e Marila, pelo amor, carinho e amizade, por estarem sempre juntas comigo em todos os momentos de minha vida.

Ao meu Orientador

Professor Titular Benedito Barraviera, que em função de sua vasta experiência e sabedoria, me ensinou a ser persistente e a nunca desistir dos meus Sonhos por mais tempo que ele levem para se realizarem, o meu muito

Obrigada por Tudo

Ao meu Co-orientador

Professor Dr. Carlos Ducatti, por ter colaborado com a minha dissertação, o meu muito Obrigada por toda a minha formação académica, pelo apoio Moral e Profissional, por todos os ensinamentos que me foram passados com muita paciência, compreensão e principalmente pela amizade de todos esses anos.

Agradecimentos

A Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho –UNESP- Campus de Botucatu-SP, pela a existência e permissão para a realização do meu trabalho.

Ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos-CEVAP – UNESP-BOTUCATU-SP, pelo auxílio de todas as coletas de material dos animais utilizados na dissertação.

A equipe técnica do CEVAP, Thomaz, Michelli e Luciana, pela disponibilidade dos animais para o estudo, auxílio e disposição.

Aos alunos de graduação, aprimorandos, pós-graduação e funcionário do CEVAP, pelo auxílio em que me foi prestado no trabalho de campo e coletas, até o último dia de conclusão da minha dissertação.

A equipe do setor administrativo, secretaria e revista do CEVAP, pelo o auxílio e amizade de todos esses anos.

Ao pesquisador do CEVAP Rui Seabra, pelo auxílio prestado na dissertação.

Ao professor Benedito Barraviera e diretor do CEVAP que autorizou a coleta nos animais e a utilização de toda a estrutura do Centro.

A serpente Crotalus durissus terrificus, material principal de meu estudo, pois sem elas eu não teria realizado o meu trabalho.

Aos animais doados do Instituto Butantan e em especial ao Professor e pesquisador do Instituto, Sávio Sant’anna, que atendeu prontamente ao meu pedido, enviando as amostras necessárias para as análises, enriquecendo a minha dissertação.

Ao Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, UNESP-Botucatu-SP, pela realização de todas as análises realizadas na minha dissertação.

Aos Amigos, Evandro, Sílvia, Cibele, pelo auxílio nas análises realizadas, pelos serviços de secretaria, pelo carinho, amizade e disponibilidade em todo o período da realização de meu trabalho e de todos esses anos de convivência.

Aos alunos de Pós-Graduação, que freqüentam o Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, pelo auxílio prestado durante a realização do meu trabalho.

A Juliana Célia Denadai, pelo auxílio prestado com seus ensinamentos durante toda a realização da dissertação.

Aos funcionários da seção de pós-graduação, que com muito préstimo, sempre estiveram a disposição para esclarecer e auxiliar-me em qual quer dúvida durante o período da realização da dissertação.

A Todos os funcionários e professores do Departamento de Doenças Tropicais, ao coordenador e ao vice-coordenador do programa de pós-graduação em Doenças Tropicais, pela amizade e auxílio em todos esses anos.

Aos funcionários da Biblioteca, pelo auxílio e préstimo em atender sempre prontamente as dúvidas .

Ao amigo Mauri, pelo auxílio nas versões em inglês em todas as vezes em que eu precisei.

Aos meus avós, Cida e Zézinho (em memória), que sempre estiveram presentes em todos os momentos de minha vida.

Ao meu avô, Zezão, por estar junto comigo todos os dias.

Aos meus padrinos, Com e Paulo, pelo apoio e exemplo de perseverança constante.

Ao meu noivo Deivid, por sempre estar em meu lado, pela ajuda na montagem das armadilhas de campo e vistorias, por me ensinar a ser forte em algumas ações do dia-a-dia, pelo amor, compreensão e dedicação.

O meu muito obrigada por tudo a todos que me ajudaram direta e indiretamente, em todos esses anos.

Sumário

1 - Introdução.....	1
2 - Objetivos.....	6
3 - Materiais e Métodos.....	7
3.1 – <i>Material.....</i>	7
3.2 – <i>Métodos.....</i>	7
3.2.1 – <i>Serpentes doadas ao CEVAP.....</i>	7
3.2.2 – <i>Serpentes doadas ao Instituto Butantan.....</i>	8
3.2.3 – <i>Coleta dos guizos.....</i>	8
3.2.4 – <i>Rodores mantidos no CEVAP.....</i>	9
3.2.5 – <i>Ração oferecidas ao roedore.....</i>	9
3.2.6 – <i>Rodores mantidos no Instituto Butantan.....</i>	9
3.2.7 – <i>Ração oferecida aos roedores do Insituto Butantan.....</i>	9
3.2.8 – <i>Estudo de campo – Captura dos animais.....</i>	10
3.2.9 – <i>Montagem das armadilhas de interceptação e queda.....</i>	11
3.2.10 – <i>Análise isotópica.....</i>	15
3.2.11 – <i>Definição de ambientes de plantas do ciclo C₃ e plantas do ciclo C₄.....</i>	17
3.2.12 – <i>Análise estatística.....</i>	19
4 – Resultados.....	19
4.1 – <i>Captura de camundongos no campo.....</i>	19
4.2 – <i>Análises isotópicas do $\delta^{13}C$ no guizo das serpentes doadas ao CEVAP.....</i>	20
4.3 – <i>Análises isotópicas do $\delta^{13}C$ no guizo dos filhotes nascidos no CEVAP.....</i>	25
4.4 – <i>Análises isotópicas do $\delta^{13}C$ dos guizos das serpentes doadas ao Instituto Butantan.....</i>	27
4.5 – <i>Rodores mantidos no CEVAP.....</i>	33
4.6 – <i>Ração oferecida aos roedores do CEVAP.....</i>	33
4.7 – <i>Rodores do Instituto Butantan.....</i>	33
4.8 – <i>Ração oferecida aos roedores do Instituto Butantan.....</i>	33
4.9 – <i>Distribuição dos valores de $\delta^{13}C$ dos roedores capturados no estudo de campo.....</i>	34

<i>4.10 - Distribuição dos valores de $\delta^{13}C$ dos segmentos dos guizos de todas as serpentes estudadas.....</i>	<i>35</i>
<i>5 - Discussão.....</i>	<i>37</i>
<i>6 - Conclusões.....</i>	<i>44</i>
<i>7 - Resumo.....</i>	<i>45</i>
<i>8 - Abstract.....</i>	<i>47</i>
<i>9 - Referências.....</i>	<i>49</i>
<i>10 - Apêndice.....</i>	<i>52</i>

1-Introdução

Os acidentes causados por animais peçonhentos constituem um problema de saúde pública para os países tropicais (1). No Brasil, a partir de 1986, ano em que foi instituído o Programa Nacional de Controle de Acidentes por Animais Peçonhentos, o Ministério da Saúde passou a se preocupar com a notificação dos acidentes, bem como com a publicação de manuais de orientação à comunidade. Assim, em 1987 foi publicado o primeiro manual denominado Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes Ofídicos. Em 1992 publicou-se o Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos e em 1998 foram atualizados. A partir de então foi possível conhecer o número de acidentes por animais peçonhentos nas diversas regiões do país, bem como sua prevalência e gravidade (2).

No âmbito dos acidentes ofídicos, as serpentes da família Viperidae são as que mais causam acidentes no Brasil (1). A fauna brasileira possui cinco gêneros: *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Porthidium*, *Crotalus* e *Lachesis*; que perfazem cerca de 30 espécies (3). Entre janeiro de 1990 e dezembro de 1993 foram notificados ao Ministério da Saúde 81.611 acidentes ofídicos, o que corresponde a aproximadamente 20.000 casos por ano, com um coeficiente de incidência de 13,5 acidentes para cada 100.000 habitantes. Em 2009, de acordo com o Ministério da Saúde, notificou-se cerca de 30.000 casos de acidentes ofídicos no Brasil (4). No Estado de São Paulo ocorrem aproximadamente 2.000 casos por ano. Quanto ao gênero da serpente causadora do acidente, as do gênero *Bothrops* causaram 90,5%, as *Crotalus* 7,7%, as *Lachesis* 1,4% e as *Micrurus* 0,4% (2).

Em 1995, Ribeiro *et al.*(5) publicaram um estudo retrospectivo realizado em 1988. Estes autores (5) avaliaram 322 acidentes por serpentes peçonhentas que ocorreram no Estado de São Paulo, atendidos no Hospital Vital Brasil do Instituto Butantan. Verificaram que 95% dos acidentes foram causados por serpentes do gênero *Bothrops*, 4,4% por *Crotalus* e 0,6% por *Micrurus*.

Em 1989 Barraviera *et al* (6, 7) avaliando a prevalência de acidentes por serpentes na região de Botucatu, no Estado de São Paulo, observaram que

80% dos acidentes foram causados por serpentes do gênero *Bothrops* e 20% por *Crotalus*. Estes estudos foram corroborados posteriormente por Azevedo-Marques (8) em Ribeirão Preto em 1992 e por Sgarbi *et al.* (9) em Marília em 1995. Dessa forma, é possível postular que os acidentes causados por serpentes do gênero *Crotalus*, pelo menos em determinadas regiões do Estado de São Paulo, encontram-se em ascensão. Tendo em vista o grande crescimento dos acidentes do gênero *Crotalus* na região de Botucatu, SP; tentou-se por métodos isótopos estáveis, verificar pela análise dos segmentos dos guizos, porque vem aumentando o número de serpentes conseqüentemente e com ele o número de acidentes desse gênero.

O termo isótopo vem do grego ISO (mesmo ou igual) e TOPOS (lugar), referindo-se ao fato de que estes são átomos que ocupam o mesmo lugar na tabela periódica. Especificamente diferem no número de nêutrons e, portanto, no número de massa. Apresentam as mesmas propriedades químicas diferindo às vezes em suas propriedades físicas. A expressão “estável” significa que não emitem radiação.

O emprego da técnica de traçadores utilizando isótopos estáveis tem possibilitado grande avanço e abre novos horizontes nas diversas áreas das ciências básicas e aplicadas. Os isótopos estáveis ambientais são utilizados em ciências da vida, pois compõem a estrutura dos ácidos nucléicos, dos carboidratos e dos aminoácidos. Portanto, fazem parte de mais de 90% de todos os tecidos vivos (10). Dentre os isótopos mais utilizados têm-se o Carbono (^{12}C , ^{13}C), o Hidrogênio (^1H , ^2H), o Oxigênio (^{16}O , ^{17}O , ^{18}O), o Nitrogênio (^{14}N , ^{15}N) e o Enxofre (^{32}S , ^{33}S , ^{34}S , ^{36}S) conhecidos como (CHONS). As principais aplicações encontram-se nas áreas de geologia, fisiologia, geoquímica, farmacologia, química, geocronologia, mineralogia, exploração de petróleo, ciências do solo, agronomia e engenharia de alimentos, entre outras (11).

As pesquisas demonstram que as composições isotópicas dos tecidos 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 (12).

Pronunciadas variações naturais ocorrem na composição isotópica do carbono e a razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ é medida pela espectrometria de massa. O valor

dessa razão isotópica é relativo ao carbono encontrado no fóssil *Bellefornitella americana*, utilizado como medida de padrão internacional. Este fóssil encontrado na Carolina do Sul, nos EUA, é do período cretáceo e originário da formação Pee Dee, abreviado internacionalmente por PDB. A razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra é comparada a razão do padrão PDB, com terminologia de $\delta^{13}\text{C}$, a qual pode ser negativa ou positiva, indicando menor ou maior valor da razão, relativamente ao padrão internacional (13).

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 $-7,7\text{‰}$ (12). Como a composição isotópica das plantas depende do ciclo fotossintético e do meio ambiente, os subprodutos derivados são isotopicamente semelhantes às plantas geradoras. Nestas o CO_2 penetra por difusão nos estômatos das folhas, passando por rotas bioquímicas no interior das células. Durante esse processo o carbono sofre discriminação isotópica pelas plantas gerando um aumento na concentração de ^{12}C (14).

Nas referidas rotas bioquímicas, quando o primeiro composto orgânico sintetizado é constituído de 3 átomos de carbono, estas plantas são denominadas de plantas do ciclo fotossintético C_3 . Quando apresentam 4 átomos de carbono, estas são denominadas de plantas do ciclo fotossintético C_4 . No grupo C_3 encontram-se cerca de 86% das espécies vegetais em nível mundial, tais como as madeiras de lei, leguminosas, florestas de eucalipto e de pinus e árvores frutíferas (maçã, uva, etc.). No grupo das plantas C_4 , destacam-se as gramíneas, milho, cana-de-açúcar, dentre outras (15). Os valores em $\delta^{13}\text{C}$, PDB das plantas C_3 , variam de -22‰ a -33‰ com valor modal de $-26,7\text{‰}$; nas plantas C_4 , sofrem variações de -9‰ à -16‰ , determinando valor modal de $-12,6\text{‰}$ e média amostral de $-12,5\text{‰}$ (16).

Os animais ao ingerirem produtos de origem vegetal e/ou animal podem incorporar o valor isotópico da dieta nos tecidos orgânicos, “você é aquilo que você come $\pm 1\text{‰}$ para carbono” De Niro & Epstein (16) recomendam a utilização do carbono de todo o animal para estimar o $\delta^{13}\text{C}$ da dieta, pois nenhum tecido isolado é ideal para determinar-se a relação da composição isotópica do animal e de sua dieta. Na prática, o melhor tecido utilizado é o músculo.

Tieszen *et al.* (17) encontraram uma variação inferior a 1‰ para fígado, músculo e tecido do cérebro dos roedores gerbils e afirmaram que estes tecidos podem ser também indicadores adequados da composição isotópica da dieta.

É pouco compreendido como os isótopos estáveis, uma vez modificados ou fracionados são incorporados aos tecidos (18). O conhecimento do fator de fracionamento tecido/dieta é essencial para os estudos sobre as composições isotópicas.

A outra limitação é que as taxas de *turnover* dos isótopos estáveis do carbono do tecido de aves selvagens são pouco conhecidas (19). Ducatti *et al* (20) investigaram as taxas de *turnover* isotópico em mamíferos utilizando dietas de composição isotópicas diferentes. Estes autores (20) observaram que as concentrações isotópicas dos tecidos animais refletem a assinatura isotópica da dieta ingerida. Isto dependerá, em parte, da taxa de *turnover*, ou seja, a síntese e a degradação isotópica do mesmo. Tecidos com *turnover* rápido apresentam metabolismo rápido e indicam dietas recentes. Àqueles com *turnover* lentos indicam médias dietéticas de longo prazo, ou seja, referem-se a alimentação antiga. A escolha do tipo de tecido para análise isotópica dependerá, então, da questão de interesse (13).

É possível concluir, baseado na literatura mundial (11, 12, 13, 14, 16 - 20) que os animais podem apresentar nos seus tecidos valores de $\delta^{13}\text{C}$ originados de dietas provenientes de ambientes C_3 ou C_4 . Desta forma, a fonte alimentar será determinante na composição dos tecidos analisados.

Kelly (21), em revisão de 102 estudos da variabilidade natural de carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio-15 ($\delta^{15}\text{N}$) na ecologia trófica de animais, não cita ou faz mensurações de um único estudos com serpentes.

No caso das serpentes *Crotalus durissus terrificus* os filhotes nascem com o guizo primordial que reflete possivelmente o histórico alimentar da mãe. Além disso, acumulam ao longo da vida os demais anéis, cuja formação depende do número de trocas de pele. Este apêndice é constituído de diversos tipos de átomos, em especial os de carbono, incluindo o isótopo de carbono - 13. É possível que a história alimentar pregressa destes animais esteja armazenada nos anéis do guizo.

Assim, a escolha das serpentes do gênero *Crotalus* para a realização do presente trabalho deve-se principalmente a quatro fatores: primeiro o fato de ser um trabalho inédito, segundo todas carregarem consigo ao longo da vida o seu histórico alimentar no guizo; terceiro; devido ao fato do serpentário do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP - CEVAP receber grande quantidade de exemplares, e quarto; pelo aumento no número dos acidentes com essa serpente na região de Botucatu, Estado de São Paulo.

2-Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram os de analisar o valor isotópico do carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) nos anéis do guizo das serpentes *Crotalus durissus terrificus*, nos camundongos capturados, nos oferecidos como alimento e na ração com vistas a elaborar um possível histórico alimentar e explicar o aumento do número de animais e acidentes na região de Botucatu.

3-Material e Métodos

3.1-Material

O material utilizado no presente estudo foi guizo das serpentes *Crotalus durissus terrificus*, camundongos e ração. Assim, foi estudado o valor isotópico de carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) nos guizos de serpentes doadas respectivamente ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP - CEVAP e ao Instituto Butantan. Estas eram provenientes do campo, bem como exemplares adultos e filhotes mantidos em cativeiro nestas Instituições. Além disso, foi avaliado o valor isotópico de carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) em camundongos criados e mantidos em cativeiro nos biotérios do CEVAP e do Instituto Butantan que serviam de alimento às serpentes, bem como a ração oferecida a estes animais. Foi estudada também uma amostra de roedores capturados no município de Pardinho - SP, por meio de armadilhas padronizadas. Este local foi escolhido uma vez que a maioria das serpentes provenientes do campo e doadas ao CEVAP são capturadas neste ambiente. Para esta captura foi solicitada a devida Licença e Autorização do IBAMA conforme Anexo1.

3.2-Métodos

A análise do valor isotópico de carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) foi realizada em guizos de *Crotalus durissus terrificus*, roedores mantidos em Biotério e capturados no campo e na ração oferecida como alimento a estes animais.

3.2.1-Serpentes doadas ao CEVAP

Foram coletados 15 guizos de animais doados ao serpentário do CEVAP, provenientes da região de Botucatu. Destes quinze, três guizos eram de serpentes adultas, vindas da natureza e mantidas em cativeiro; dois guizos eram de filhotes com o guizo primordial, vindos da natureza e mantidos em cativeiro; dois eram filhotes nascidos em cativeiro com o guizo primordial e oito

serpentes eram exemplares adultos que vieram da natureza e foram mantidos em cativeiro sem o guizo primordial.

3.2.2-Serpentes doadas ao Instituto Butantan

Foram coletados 16 guizos de animais doados ao serpentário do Instituto Butantan de diferentes regiões do Estado de São Paulo. Destes, três eram adultos e três eram filhotes, todos vindos da natureza e mantidos em cativeiro. Todas possuíam o guizo primordial.

Foram estudadas ainda duas serpentes adultas, do sexo feminino, que pariram em cativeiro. Nenhuma delas possuía o guizo primordial. A primeira pariu três e a segunda, cinco filhotes respectivamente. Todos possuíam o guizo primordial.

3.2.3-Coleta dos guizos

Para a retirada do guizo, a serpente foi inserida em tubo de borracha transparente para a imobilização e este foi puxado manualmente. Os guizos foram separados e identificados um a um de acordo com a procedência do animal.

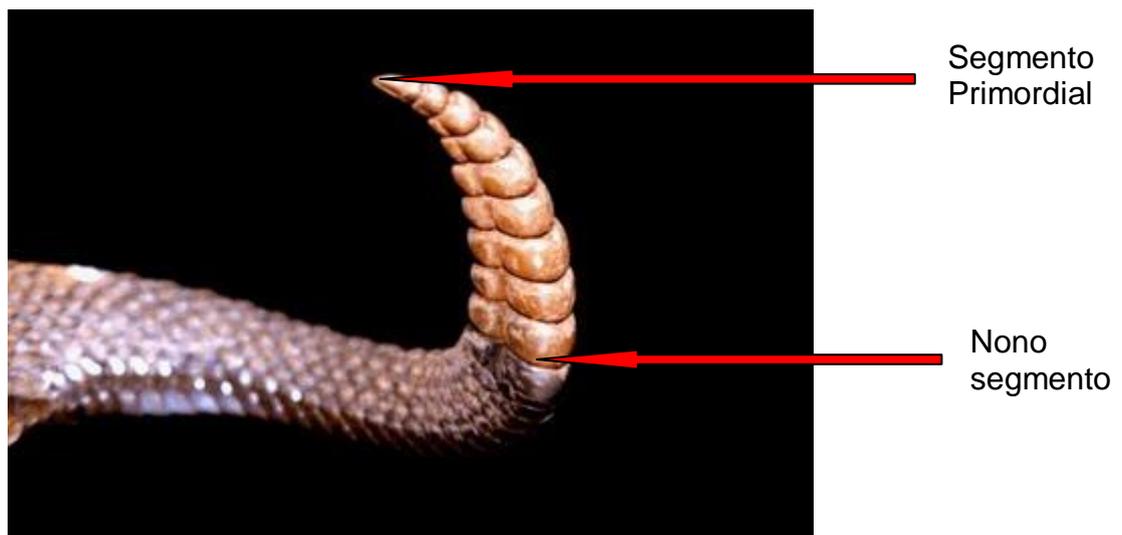


Figura 1: Esquema da contagem dos segmentos dos guizo para a análise dos segmentos.

3.2.4-Roedores mantidos no Biotério do CEVAP

Foram sacrificados dois camundongos que serviriam de alímetos as serpentes do Biotério do CEVAP, com uso de halotano, de acordo com o protocolo aprovado pela comissão de ética em pesquisa, número 658, para posterior análise do teor de carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) na musculatura dos animais.

3.2.5-Ração oferecida aos roedores do CEVAP

Foi analisada isotópicamente ($\delta^{13}\text{C}$) a ração (Labina® da empresa Purina) dos roedores do Biotério do CEVAP. (as especificações estão no anexo 2).

3.2.6-Roedores mantidos no Biotério do Instituto Butantan

Dois camundongos provenientes do biotério do Instituto Butantan, que serviriam de alimento às serpentes, foram sacrificadas com o uso de halotano (procedimento aprovado pelo Comitê de Ética, para a determinação do teor de carbono -13 na musculatura desses animais.

3.2.7-Ração oferecida aos roedores do Instituto Butantan

Uma amostra da ração oferecida como alimento aos roedores do Biotério do Instituto Butantan foi cedida para se avaliar o teor de carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$). Trata-se, neste caso da ração da marca Nuilab® CR1 irradiada. As especificações do rótulo desta encontra-se descrito no Anexo 3.

3.2.8-Estudo de campo – captura dos animais

O local escolhido para este estudo foi o “Sítio da Moçada”, localizado no município de Pardinho, por ser o local de maior incidência de *Crotalus durissus terrificus*, coletadas e doadas ao serpentário do CEVAP durante os últimos cinco anos.

As coletas de campo foram feitas em local sugerido pelo proprietário do Sítio, por meio de armadilhas de interceptação e queda, do tipo “*Pit fall*”.



Figura 2: Vista geral do “Sítio da Moçada” local onde foram montadas as armadilhas de interceptação e queda.



Figura 3: Fragmento de mata nativa do local de coleta de campo “Sítio da Moçada”.

3.2.9-Montagem das armadilhas de interceptação e queda

Para avaliar o teor de carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) dos roedores provenientes do campo foi utilizada a captura por meio da metodologia de armadilhas de interceptação e queda (AIQs) (22, 23).

Foram instaladas cinco linhas, distantes 200 m cada, de armadilhas de interceptação e queda (AIQs) em cada um dos ambientes estudados. Cada linha de AIQs tinha 45 m de comprimento e um metro de altura. Possuíam quatro baldes plásticos de 60L, instalados a cada 15 m de distância. A cerca-guia era de lona plástica preta de aproximadamente um metro de altura. A cerca foi enterrada 10 cm abaixo do solo e mantida em posição vertical por estacas de madeira. 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 com água para criar um micro ambiente úmido e abrigado do sol evitando-se assim, a morte dos animais por desidratação (Figura 4).

O período de coleta foi de 29/04/2008 a 10/08/2008 com a devida autorização e licença do IBAMA (anexo 1).

As cinco linhas de interceptação e queda foram montadas da seguinte maneira:

- 1- Campo aberto: foram montadas três linhas de armadilhas sendo a primeira próxima a residência do sítio; a segunda no meio do pasto, distante 200 m da primeira; e a terceira no final do pasto. Esta última estava na área de transição entre o pasto e a mata nativa.
- 2- As outras duas linhas foram montadas em campo fechado assim distribuídas: a quarta linha foi montada no meio da lavoura de milho e café; e a quinta próxima ao pomar de frutas próximo a residência.

Após a captura dos roedores estes foram sacrificados de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa, número 658, para posterior análise do valor de carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) na musculatura dos animais.

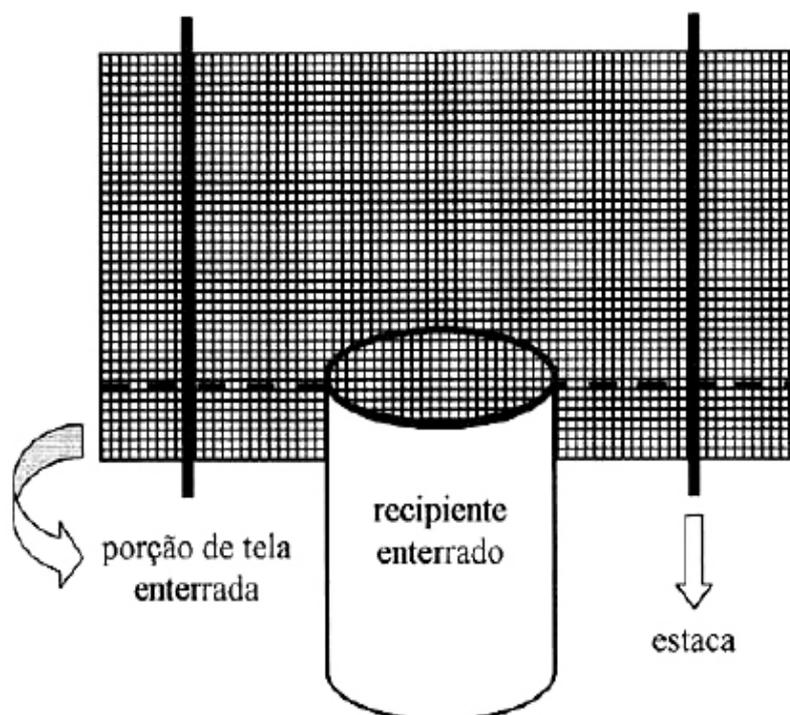


Figura 4. Esquema de um trecho de armadilhas de queda com cerca-guia. A linha tracejada representa o nível do solo (23).



Figura 5: Visão detalhada da linha um de armadilhas em campo aberto (pasto).



Figura 6: Visão detalhada da linha dois de armadilhas em campo aberto (pasto).



Figura 7: Visão detalhada da linha três de armadilhas em campo aberto (área de transição entre o pasto e a mata nativa).



Figura 8: Visão detalhada da linha quatro de armadilhas em campo fechado visualizando-se a lavoura de milho.



Figura 9: Visão detalhada da linha cinco de armadilhas em campo fechado montada entre a lavoura de milho e o pomar.

3.2.10-Análise Isotópica

As amostras de guizo, de camundongos e de ração foram analisadas no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP. Para a mensuração da razão isotópica de carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) foi utilizada aproximadamente 50 μg de material colocado em cápsula de estanho e posteriormente introduzida por meio do amostrador automático no analisador elemental (EA 1108-CHN-Fisions Instruments, Rodano, Itália), no qual, em presença de oxigênio (O_2) e óxido de cobre (CuO) a amostra foi queimada quantitativamente para produção de CO_2 .

Os gases formados foram separados em coluna cromatográfica gasosa e analisados no espectrômetro de massa de razões isotópicas (Delta S-Finnigan MAT, Bremen, Alemanha).

Os valores das razões isotópicas foram expressos em delta per mil relativos ao padrão internacional (PDB) para ^{13}C de acordo com a seguinte equação geral (1):

$$\delta(\text{amostra, padrão}) = [(R_{\text{amostra}} - R_{\text{padrão}})/R_{\text{padrão}}] \times 1000 \quad (1)$$

Onde (1), R representa a razão entre o isótopo mais pesado e o mais leve, em particular $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ para o carbono. Cada amostra foi analisada em duplicata para obtenção dos valores médios. As análises foram repetidas quando o desvio padrão analítico era maior que 0,2‰ para $\delta^{13}\text{C}$.

O conhecimento do fator de fracionamento tecido-dieta é essencial para os estudos sobre as composições isotópicas da dieta e dos tecidos de animais e consumidores. (13), define o grande delta isotópico entre fases isotópicas distintas, através de $\Delta_{a-b} \cong \delta_a - \delta_b$, sendo adaptado para ciências da vida como:

$$\Delta_{\text{tecido} - \text{dieta}} \cong \delta_{\text{tecido}} - \delta_{\text{dieta}}. \quad (2)$$

Segundo Jones *et al*(1979) (24), a alternância da fonte isotópica, depois de determinado intervalo de tempo gera resultados de enriquecimento isotópico relativo (delta per mil) versus tempo em dias, com desenho em forma aproximada de uma onda quadrada específica para cada tecido ou subproduto analisado. Normalmente, a continuidade dos valores isotópicos obtidos nos subprodutos, entre os patamares isotópicos gerados pela Fonte A e posteriormente pela Fonte B é função exponencial do tempo.

A exploração dessa função, (equação 3), abre perspectivas de novas interpretações nestes experimentos tipo sanduíche, visando estudo da síntese e degradação de metabólitos sob regime de dieta à base de plantas C_3 e C_4 , ou misturas isotópicas, com valores de delta per mil distintas entre si. A equação isotópica do *turnover* (equação 3) exprime o enriquecimento isotópico ($\delta^{13}\text{C}$), versus o tempo (t).

$$\delta^{13}\text{C}(t) = \delta^{13}\text{C}(f) + [\delta^{13}\text{C}(i) - \delta^{13}\text{C}(f)]e^{-kt} \quad (3)$$

Na equação (3), a simbologia empregada significa:

$\delta^{13}\text{C}(t)$ = enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo (t).
Adimensional.

$\delta^{13}\text{C}(f)$ = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final. Adimensional.

$\delta^{13}\text{C}(i)$ = enriquecimento isotópico do tecido, na condição inicial. Adimensional.

k = constante de troca (*turnover*) em dia^{-1}

t = tempo (em dias) a partir da substituição da dieta.

Na condição de metade de concentração inicial e metade de concentração final, pode-se pela da equação (3) exprimir o conceito de meia vida (T), em unidades de tempo, equação (4).

$$T = \ln 2 / k \quad (4)$$

Dessa forma, a constante k apresenta unidade de tempo⁻¹ e fornece a idéia da “velocidade” do processo de eliminação ou troca dos isótopos no tecido.

Como cada tecido, apresenta taxa de entrada e taxa de saída peculiar, a constante k será diferente para cada tecido estudado, assim como o valor da meia vida (T) será distinto para o tecido de cada animal (20).

Sobre estas considerações, o *turnover*, a constante de troca (k) e a meia vida (T) poderão ajudar na elucidação do comportamento das serpentes no meio ambiente e no cativeiro.

3.2.11-Definição de ambiente de plantas do ciclo C₃ e plantas do ciclo C₄

Nas rotas bioquímicas das plantas quando o primeiro composto orgânico sintetizado for um açúcar com 3 átomos de carbono, estas plantas são denominadas de plantas do ciclo fotossintético C₃. Quando os primeiros açúcares formados apresentam 4 átomos de carbono, estas são denominadas de plantas do ciclo fotossintético C₄. No grupo C₃ encontram-se cerca de 86% das espécies vegetais em nível mundial, tais como, as madeiras de lei,

leguminosas, árvores frutíferas, enquanto que no grupo das plantas C₄, destacam-se principalmente as gramíneas, milho e cana-de-açúcar. (14).

Os valores em $\delta^{13}\text{C}$, PDB das plantas C₃ e C₄, são mostrados na Figura 10, onde o $\delta^{13}\text{C}$ das plantas C₃ variam de -22‰ a -33‰ com valor modal de -26,7‰, e nas plantas C₄, sofre uma variação de -9‰ à -16‰, determinando um valor modal de -12,6‰ e média amostral de -12,5‰.

Assim as variações isotópicas do $\delta^{13}\text{C}$ encontradas na matéria orgânica, podem ser utilizadas no controle de qualidade e autenticidade de produtos alimentícios, desde que estes sejam de origem de plantas C₃ e C₄. (15)

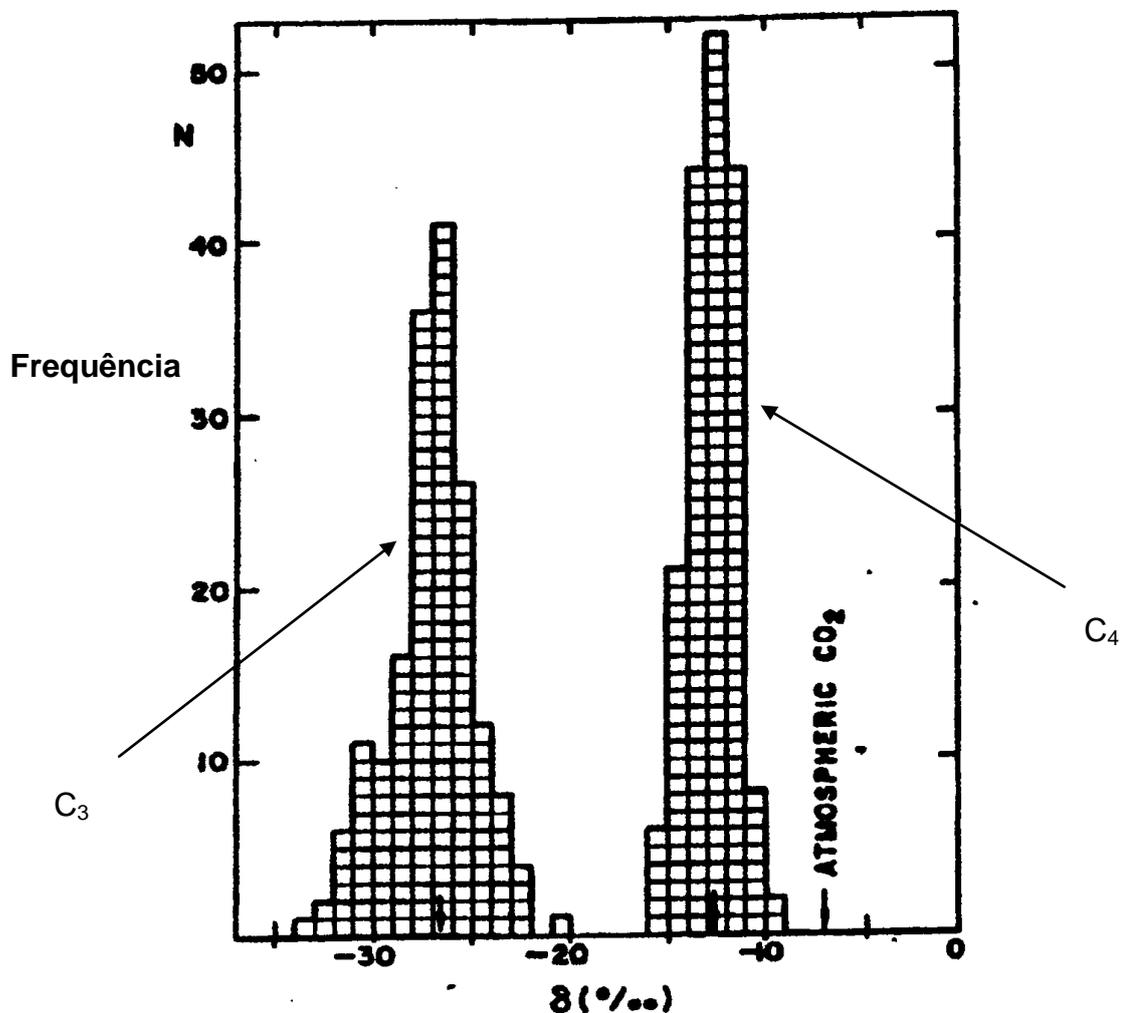


Figura 10: Variação dos valores naturais de $\delta^{13}\text{C}$, PDB em 351 espécies de plantas. A distribuição bimodal reflete os caminhos fotossintéticos C₃ e C₄. (15).

3.2.12-Análise estatística

Todos os dados foram analisados estatisticamente pelo método de equações de regressão, Oring® 6.0 Professional (Microcal Software, 1999) (25).

4-Resultados

4.1- Captura de camundongos no campo

Foram coletados 17 camundongos da espécie *Mus musculus* assim distribuídos: na linha um foram capturados 5, na dois 6, na três 4 e 2 na cinco. Além disso, três serpentes filhotes de *Crotalus durissus terrificus*, foram capturados, sendo dois na linha quatro e um na cinco. De todos eles foi retirado o guizo e a seguir realizada a soltura do animal no mesmo ambiente. Todos possuíam o guizo primordial.



Figura 11: Ausência de animais após uma noite de intensa precipitação.



Figura 12: Captura de camundongos *Mus musculus*.

4.2- Análise isotópica do $\delta^{13}\text{C}$ no guizo das serpentes doadas ao CEVAP

O registro dos animais, com data de entrada e a procedência, estão contidos no Anexo 5. Os demais resultados assim como os gráficos dos animais estudados no CEVAP, estão expressos no Anexo 6. A seguir descreve-se os resultados dos animais 1, 4, 6, 8 e dos filhotes 1 e 2.

A análise da figura 13 revela os resultados obtidos da serpente número um, procedente de Botucatu e coletada em lavoura de milho. Verifica-se que o primeiro segmento, também denominado guizo primordial, apresentou valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ igual a $-13,98\text{‰}$. O quinto segmento apresentou valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ igual a $-18,56\text{‰}$ e o sexto apresentou valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ igual $-13,28\text{‰}$. A partir deste último a serpente foi capturada e mantida em

cativeiro com alimentação à base de camundongos criados no biotério do CEVAP. Os resultados observados no sétimo, oitavo e nono segmentos foram respectivamente -17,34 ‰, -17,96‰ e -17,51 ‰.

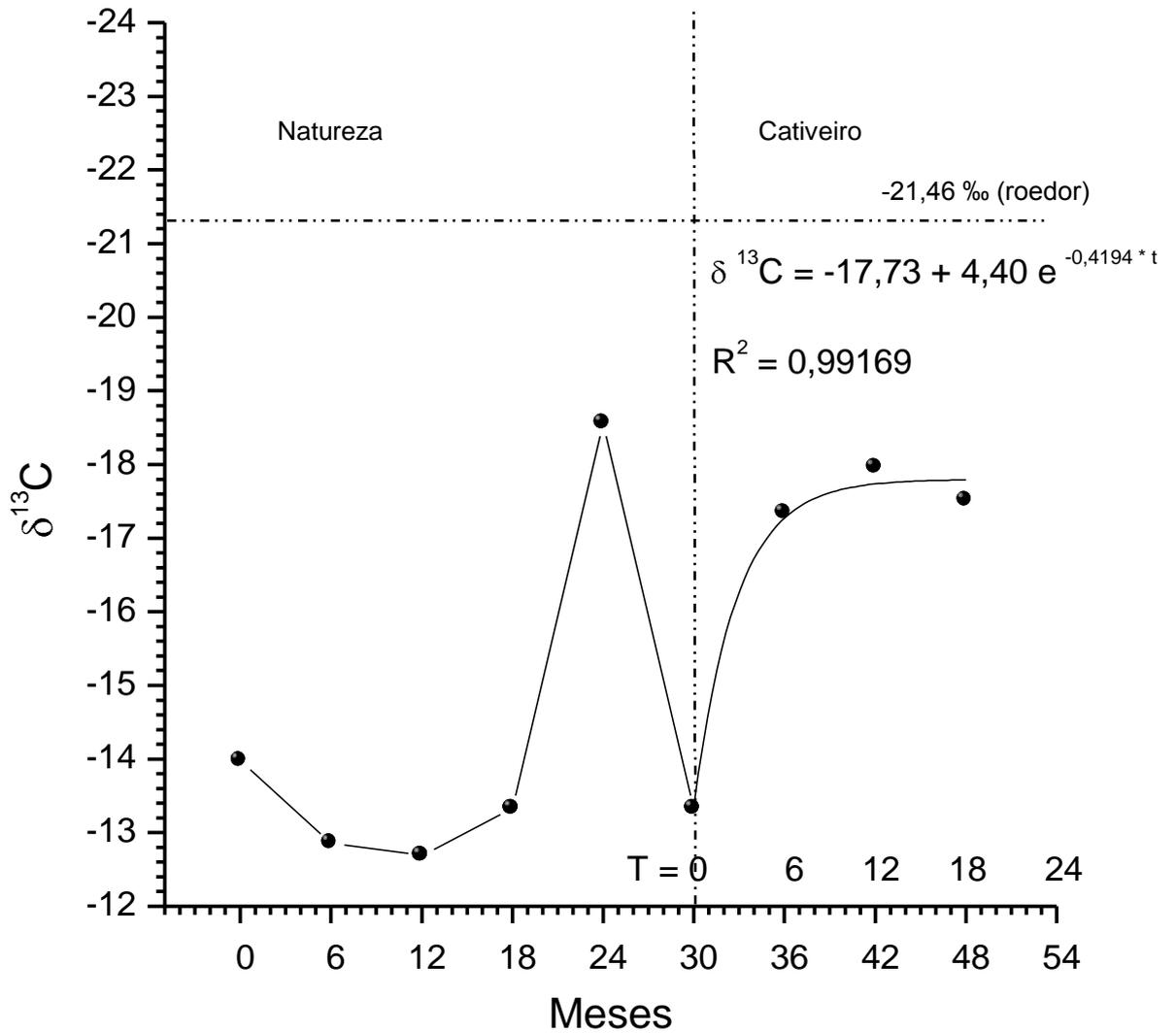


Figura 13: Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no guizo da serpente número um.

A análise da figura 14 revela os resultados obtidos da serpente número quatro. Verifica-se que o primeiro segmento, (guizo primordial), apresentou valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ igual a $-20,77\text{‰}$. O segundo segmento apresentou valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ igual a $-14,5\text{‰}$, o terceiro apresentou valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ igual a $-13,46\text{‰}$. A partir deste último a serpente foi capturada e mantida em cativeiro com alimentação à base de camundongos criados no biotério do CEVAP. Os resultados observados no quarto, quinto, sexto, sétimo e oitavo segmentos foram respectivamente $-17,26\text{‰}$, $-18,28\text{‰}$, $-19,44\text{‰}$, $-19,9\text{‰}$ e $-20,53\text{‰}$.

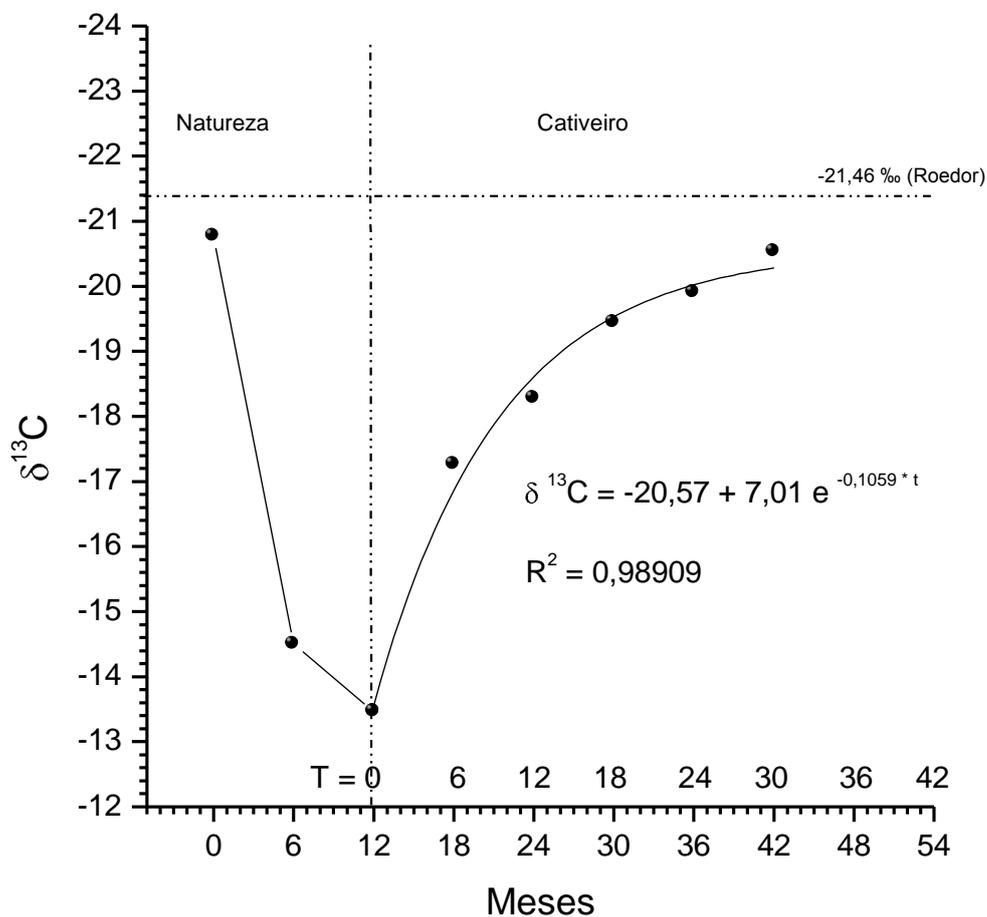


Figura 14: Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no guizo da serpente número quatro.

A análise da figura 15 revela os resultados obtidos da serpente número seis. Verifica-se que o primeiro segmento (guizo primordial), apresentou valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ igual a $-12,06\text{‰}$. O segundo segmento apresentou valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ igual a $-12,26\text{‰}$. A partir deste a serpente foi capturada e mantida em cativeiro com alimentação à base de camundongos criados no biotério do CEVAP. Os resultados observados no terceiro, quarto, quinto, sexto, sétimo, oitavo e nono segmentos foram respectivamente $-15,14\text{‰}$, $-20,27\text{‰}$, $-20,57\text{‰}$, $-20,91\text{‰}$, $-20,56\text{‰}$, $-20,30\text{‰}$, $-20,98\text{‰}$.

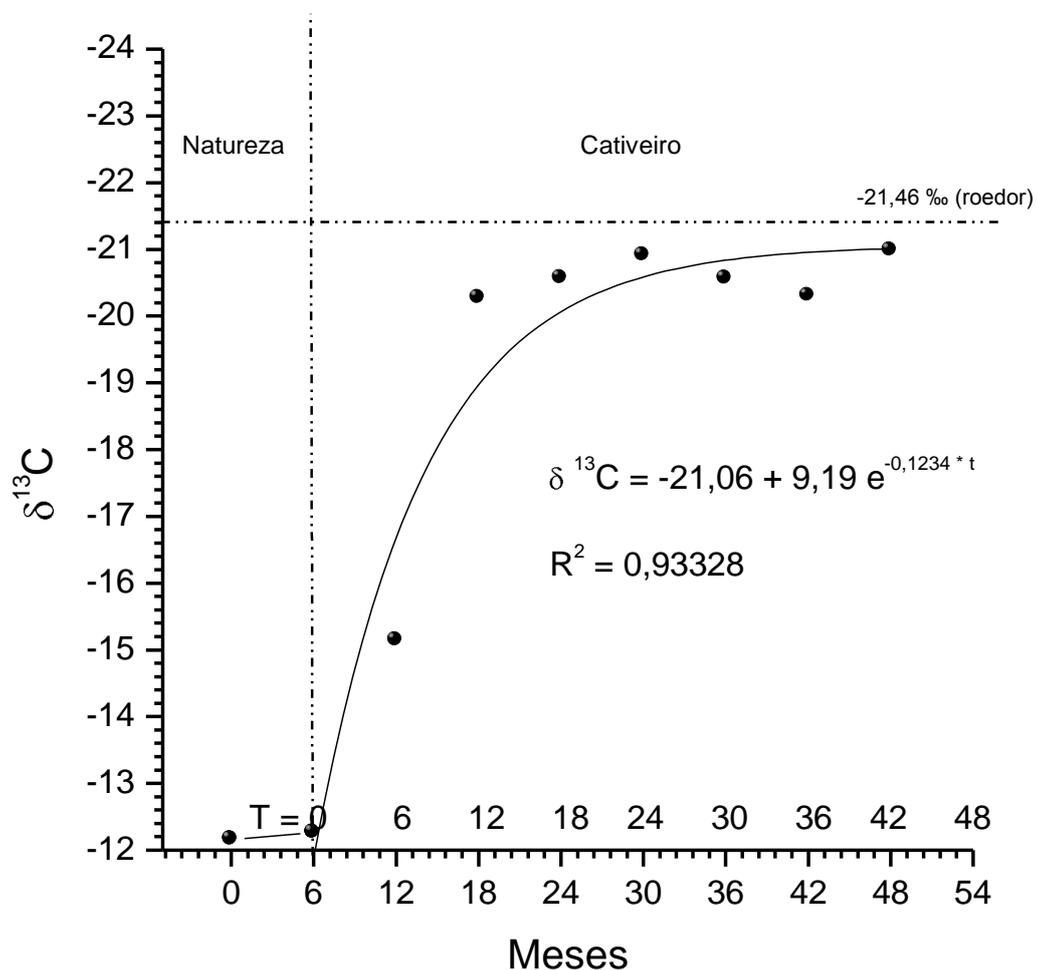


Figura 15: Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no guizo da serpente número seis.

A análise da figura 16 revela os resultados obtidos da serpente número oito. O primeiro segmento, (guizo primordial), apresentou valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ igual a $-16,76\text{‰}$. O segundo segmento apresentou valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ igual a $-14,03\text{‰}$, o terceiro segmento apresentou valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ igual a $-14,00\text{‰}$. A partir deste último a serpente foi capturada e mantida em cativeiro com alimentação à base de camundongos criados no biotério do CEVAP. Os resultados observados no quarto, quinto, sexto, sétimo, oitavo e nono segmentos foram respectivamente $-16,08\text{‰}$, $-17,95\text{‰}$, $-19,04\text{‰}$, $-19,00\text{‰}$, $-19,87\text{‰}$ e $-20,10\text{‰}$.

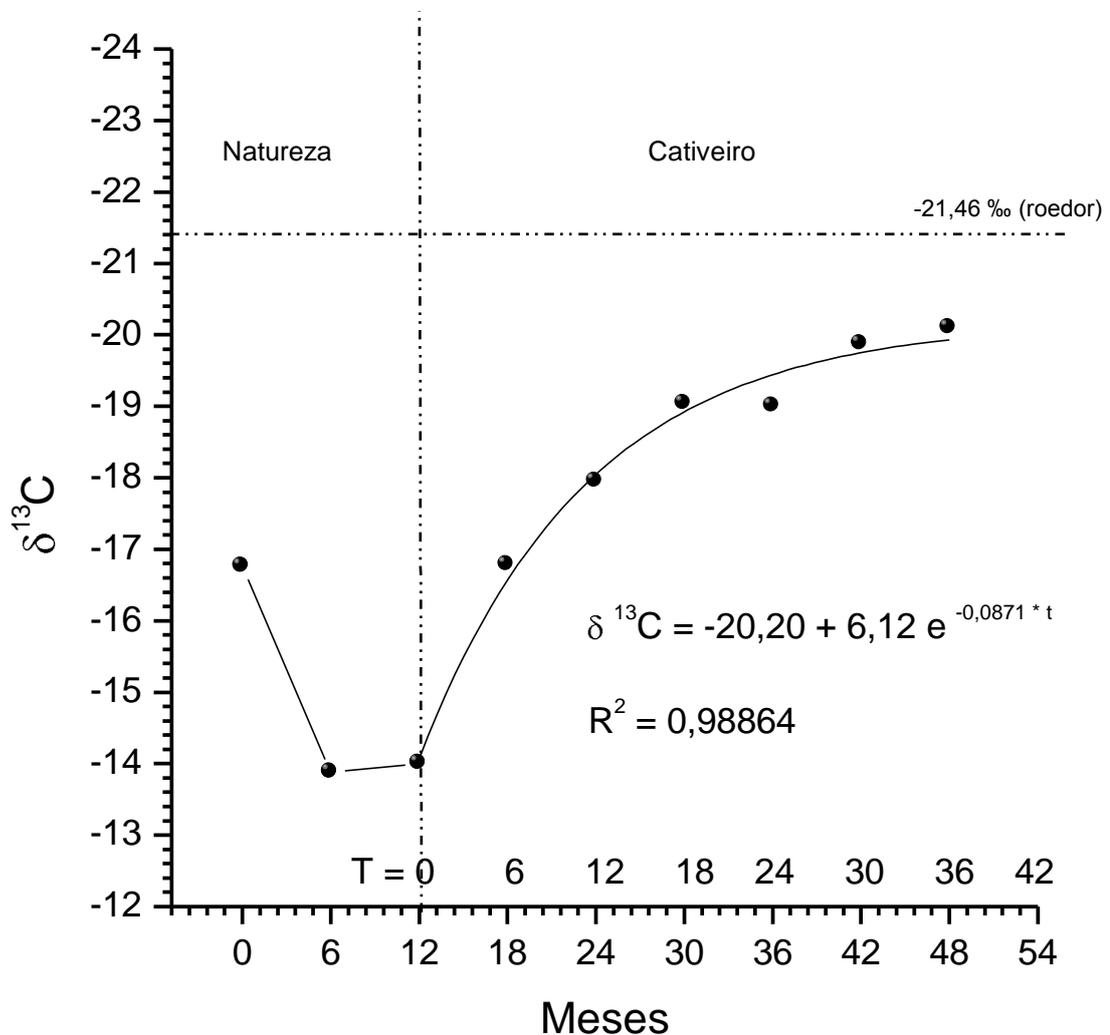


Figura 16: Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no guizo da serpente número oito.

4.3- Análise isotópica do $\delta^{13}\text{C}$ no guizo dos filhotes nascidos no CEVAP

A análise da figura 17 revela os resultados obtidos do filhote número um. Visualisa-se que o primeiro segmento, o qual a serpente já nasceu com ele, apresentou valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ igual a $-16,2\text{‰}$. Os resultados observados em cativeiro, no segundo, terceiro e quarto segmento foram respectivamente $-18,83\text{‰}$, $-20,37\text{‰}$ e $-20,52\text{‰}$.

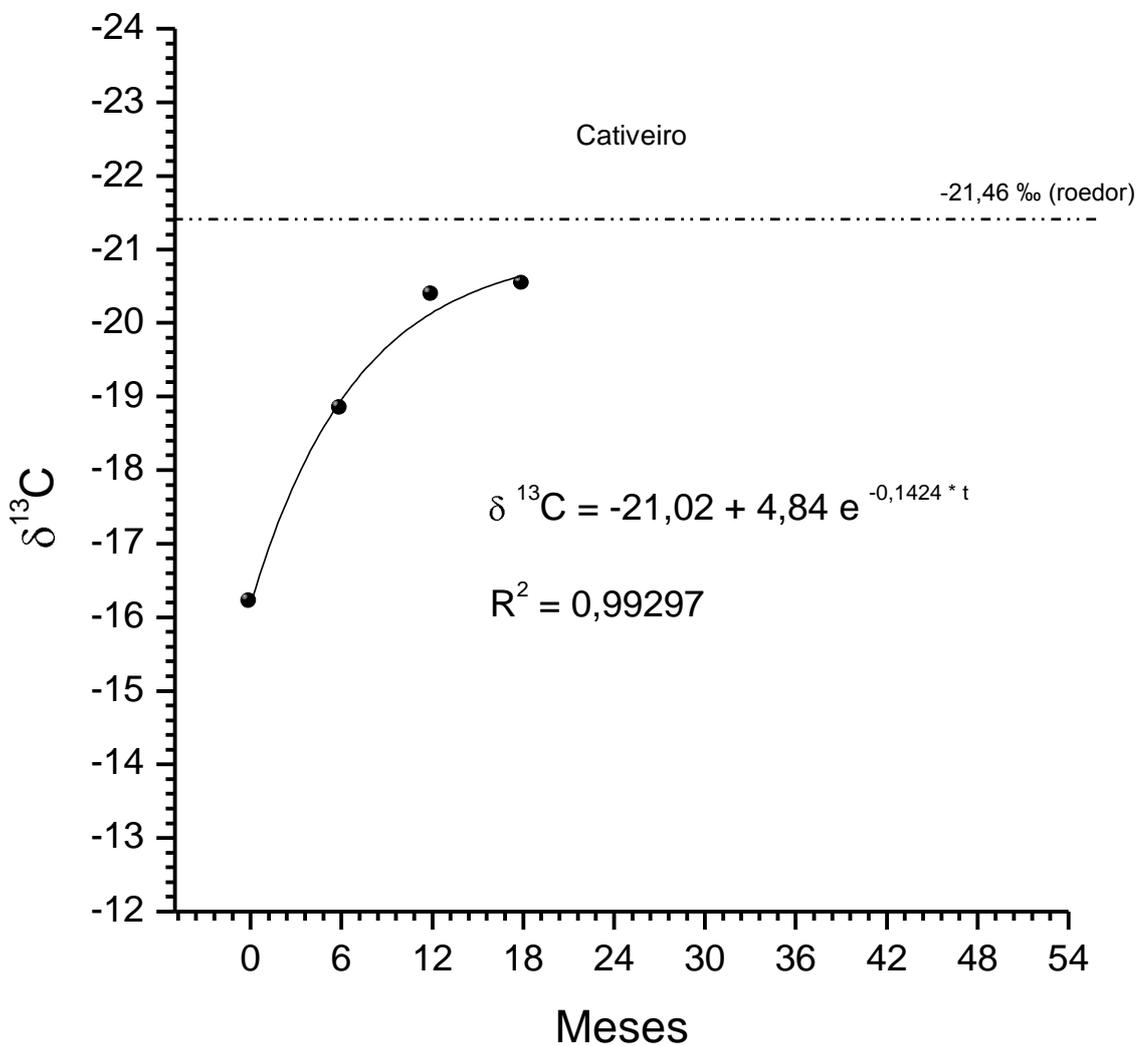


Figura 17: Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no guizo do filhote número um.

A análise da figura 18 revela os resultados obtidos do filhote número dois. O primeiro segmento, apresentou valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ igual a $-16,07\text{‰}$. Os resultados observados em cativeiro, no segundo, terceiro, quarto, quinto e sexto segmento foram respectivamente $-18,61\text{‰}$, $-19,15\text{‰}$, $-19,26\text{‰}$, $-20,23\text{‰}$ e $-20,57\text{‰}$.

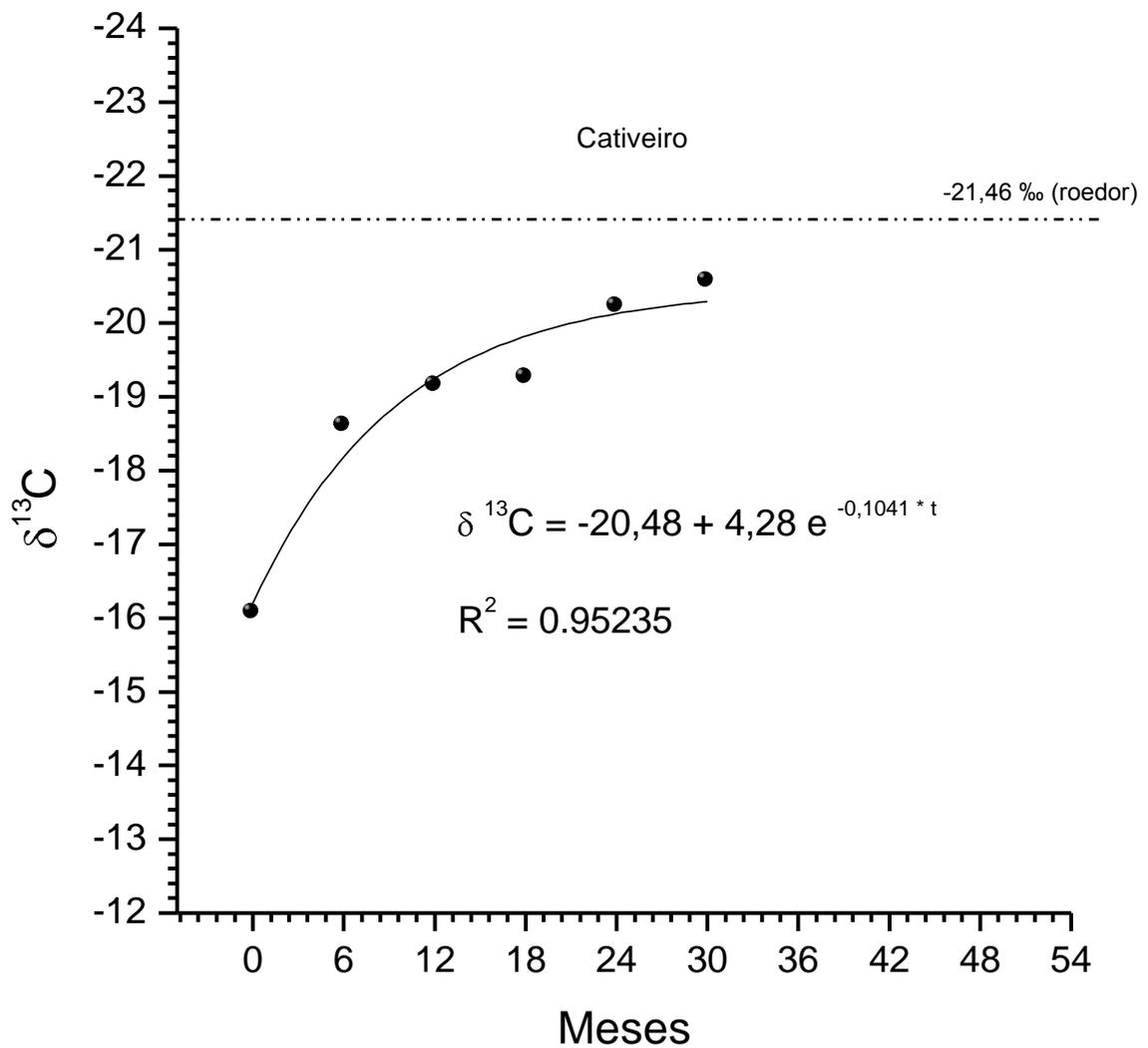


Figura 18: Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no guizo do filhote número dois.

4.4-A análise isotópica do $\delta^{13}\text{C}$ dos guizos das serpentes doadas ao Instituto Butantan

O registro dos animais, com data de entrada e a procedência dos animais, estão contidos no Anexo 7. Os demais resultados assim como o gráfico dos animais estudados no Instituto Butantan estão expressos no Anexo 8. A seguir explica-se os resultados dos animais 3, 4 e 6 e das duas serpentes mães e seus filhotes.

A análise da figura 19 revela os resultados obtidos no guizo da serpente número três, procedente de Itumbiara - GO. Verifica-se que o primeiro segmento, apresentou valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ igual a $-20,86\text{‰}$. Como esse animal nasceu em cativeiro, ele então passou a receber alimentação de camundongos criados no biotério do Instituto Butantan desde o seu nascimento. Os resultados observados no segundo, terceiro, quarto e quinto segmentos foram respectivamente $-21,19\text{‰}$, $-21,67\text{‰}$, $-21,60\text{‰}$ e $-21,02\text{‰}$.

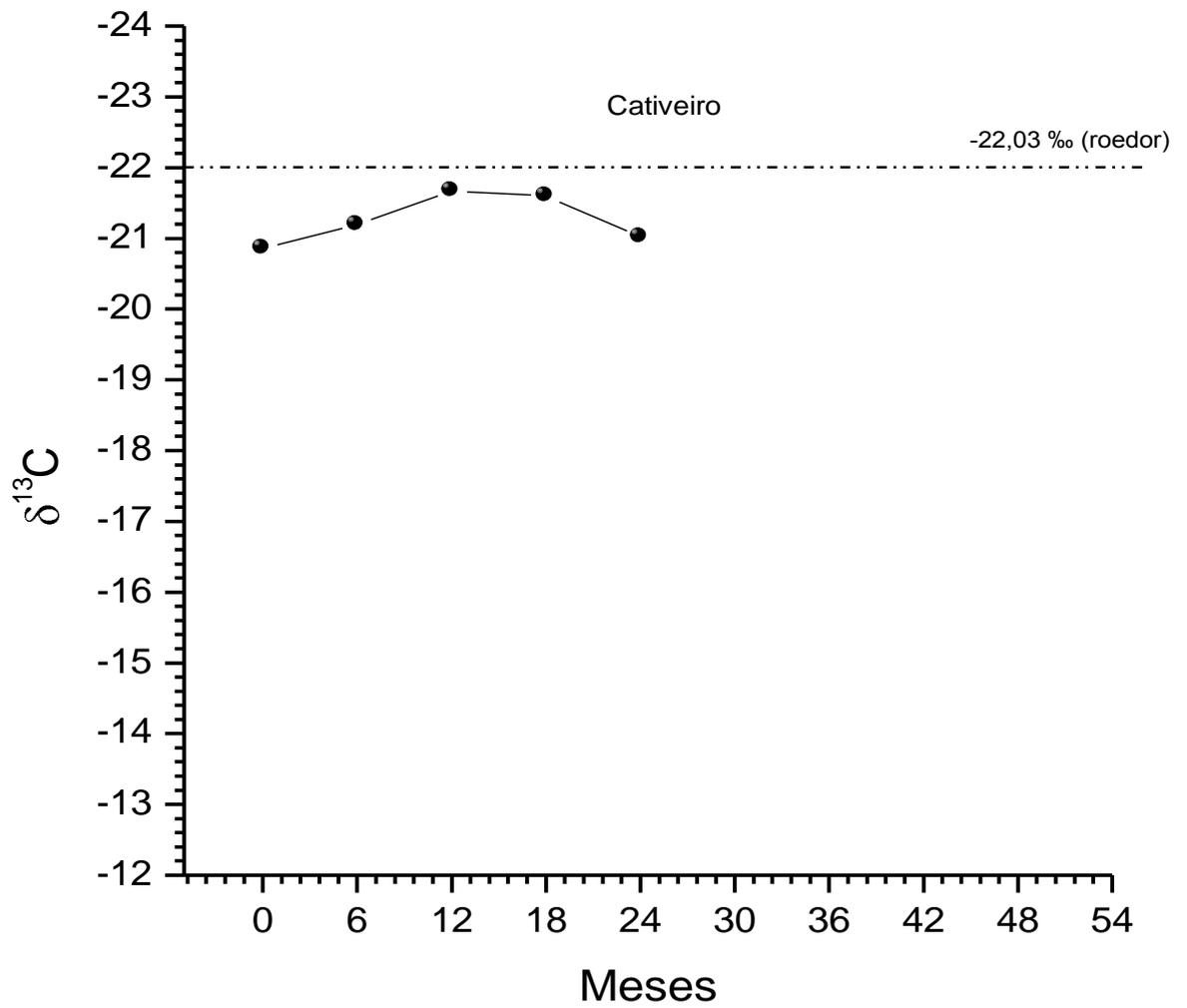


Figura 19: Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no guizo da serpente número três.

A análise da figura 20 revela os resultados obtidos no guizo da serpente número quatro, procedente de Campo Limpo Paulista -SP. Verifica-se que o primeiro segmento, apresentou valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ igual a $-19,86\text{‰}$. Como esse animal nasceu em cativeiro, ele então passou a receber alimentação de camundongos criados no biotério do Instituto Butantan desde o seu nascimento e os resultados observados no segundo, terceiro, quarto, quinto e sexto segmentos foram repectivamente $-20,01\text{‰}$, $-20,46\text{‰}$, $-20,68\text{‰}$, $-21,03\text{‰}$ e $-21,14\text{‰}$.

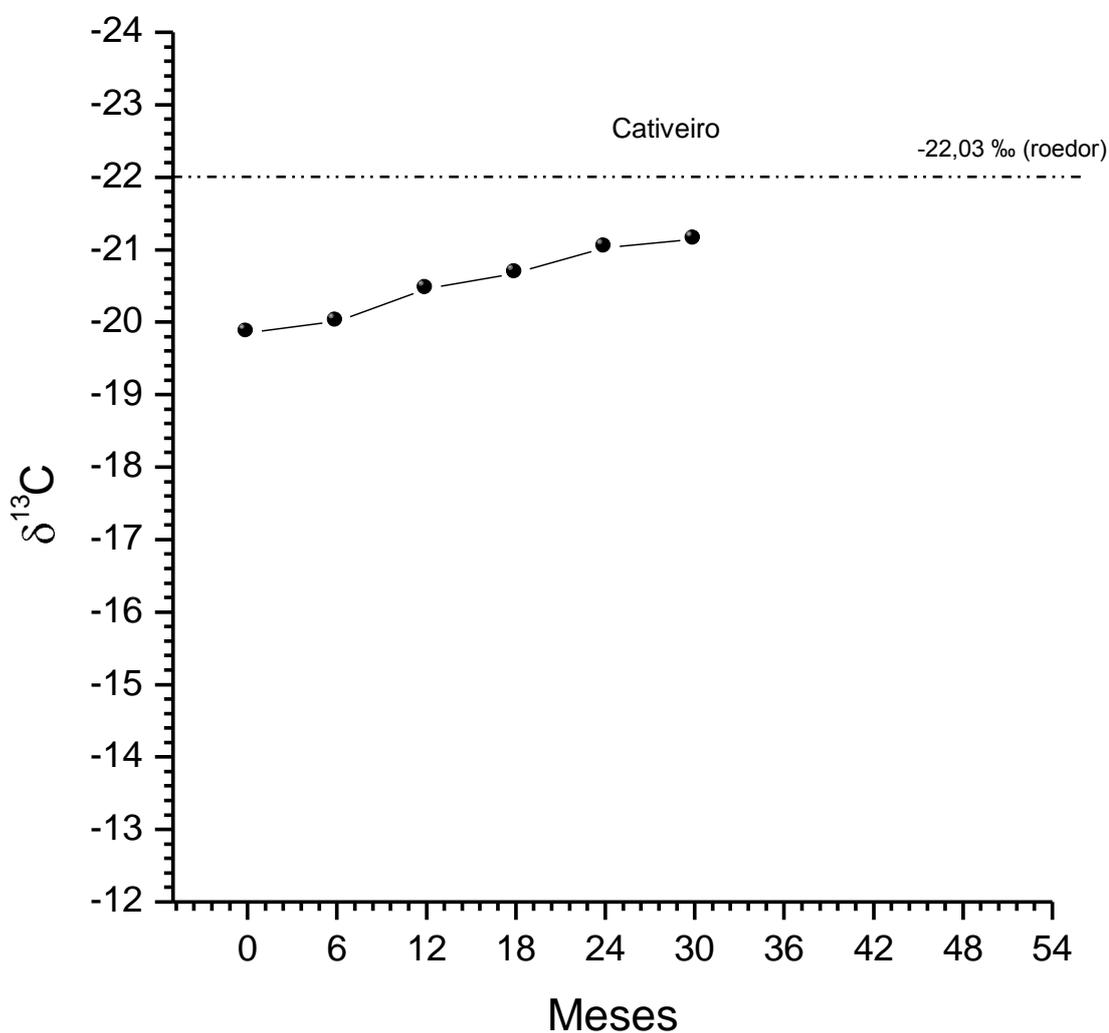


Figura 20: Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no guizo da serpente número quatro.

A análise da figura 21 revela os resultados obtidos no guizo da serpente número cinco procedente de Campo Limpo Paulista -SP. Verifica-se que o primeiro segmento, apresentou valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ igual a $-15,07\text{‰}$. Como esse animal nasceu em cativeiro, ele então passou a receber alimentação de camundongos criados no biotério do Instituto Butantan desde o seu nascimento e os resultados observados no segundo, terceiro, quarto, quinto, sexto e sétimo segmentos foram repectivamente $-20,38\text{‰}$, $-20,65\text{‰}$, $-20,81\text{‰}$, $-21,34\text{‰}$, $-21,19\text{‰}$ e $-20,49\text{‰}$.

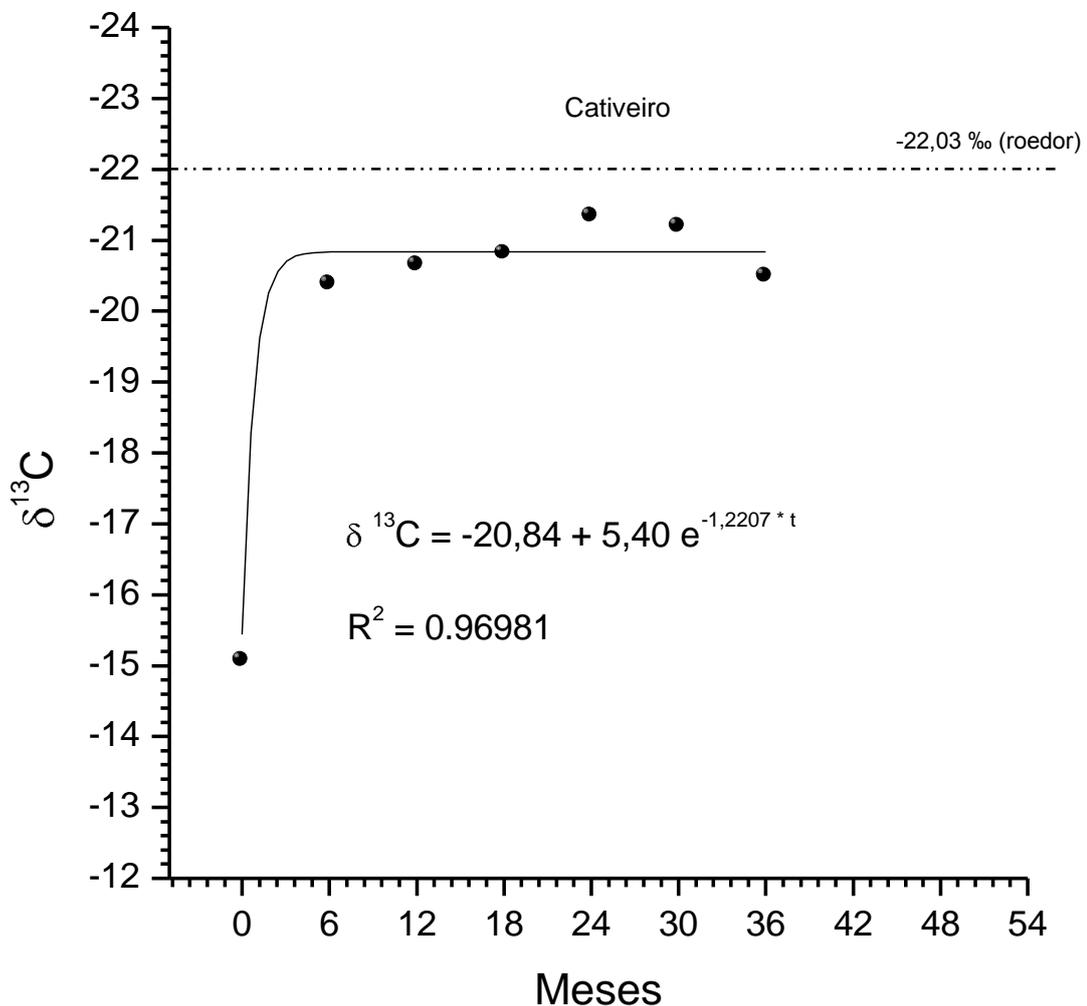


Figura 21: Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no guizo da serpente número cinco.

A análise da figura 22 revela os resultados obtidos no guizo da serpente chamada de mãe um e seus três filhotes, procedentes de Machado - MG. Verifica-se que o primeiro segmento, da serpente mãe, o qual não era o segmento primordial, apresentou o valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ igual a $-17,45\text{‰}$. Esta manteve-se na natureza até o sexto segmento, a partir da qual, foi capturada e levada ao Instituto Butantan. Após um mês da sua entrada no cativeiro, deu a luz a três filhotes. O segundo, terceiro quarto, quinto e sexto segmentos da serpente mãe, apresentaram valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ igual a $-14,67\text{‰}$, $-16,38\text{‰}$, $-14,98\text{‰}$, $-16,09\text{‰}$ e $-16,62\text{‰}$. Já os filhotes 1, 2 e 3, que nasceram em cativeiro, apresentaram os valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ $-17,55\text{‰}$, $-17,09\text{‰}$ e $-17,90\text{‰}$.

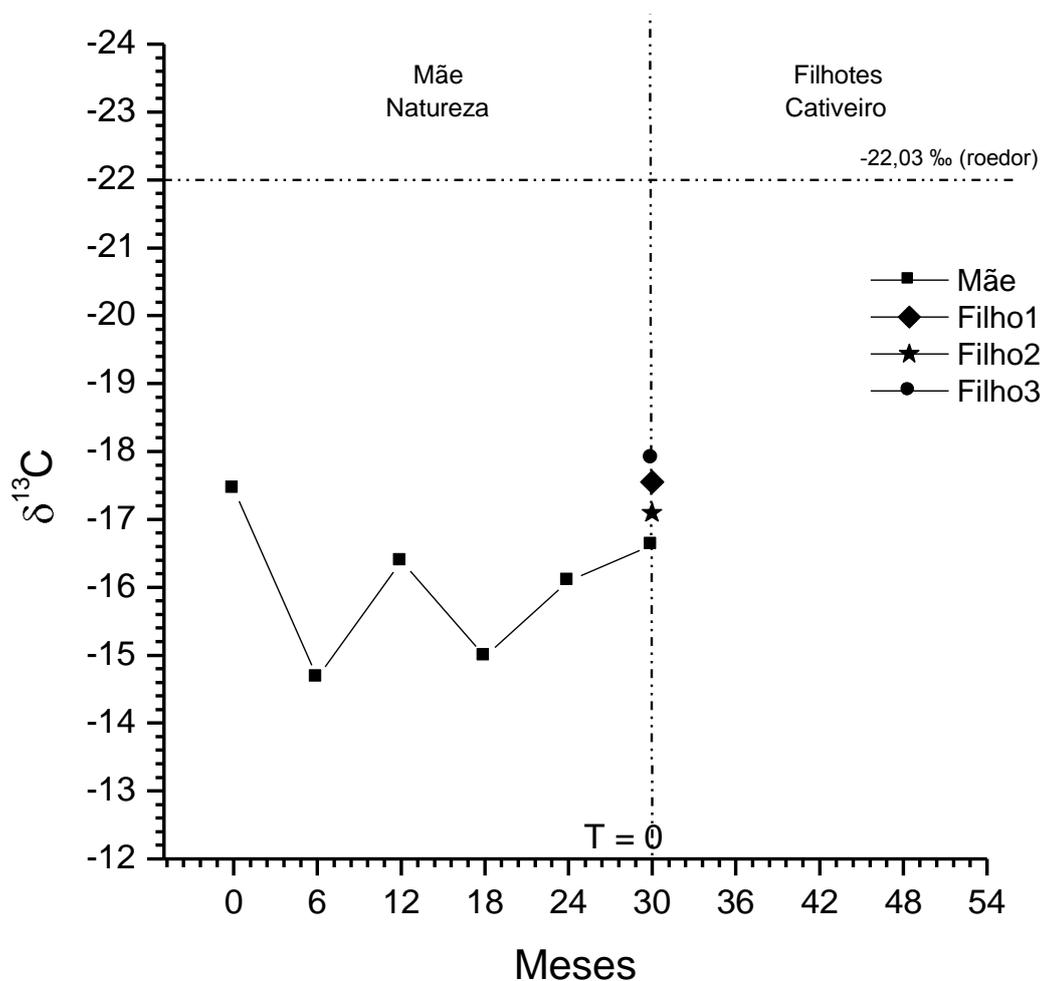


Figura 22: Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ da mãe um e os três filhotes.

A análise da figura 23 revela os resultados obtidos no guizo da serpente chamada de mãe dois e seus cinco filhotes, procedentes de Itú - SP. Verificamos que o primeiro segmento da serpente mãe o qual não era o segmento primordial, apresentou o valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ igual a $-12,65\text{‰}$. Esta manteve-se na natureza até o quarto segmento. A seguir foi capturado e levada ao Instituto Butantan, onde após um mês da sua entrada no cativeiro, deu a luz a cinco filhotes. O segundo, terceiro e quarto segmentos da serpente mãe, obteve os seguintes resultados observados respectivamente, com os valores isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ igual a $-14,97\text{‰}$, $-13,26\text{‰}$, $-12,21\text{‰}$. Já os filhotes um, dois, três, quatro e cinco, nasceram em cativeiro. Os resultados do segmento primordial de cada um obtiveram os valores isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ respectivamente igual a $-12,59\text{‰}$, $-12,51\text{‰}$, $-12,94\text{‰}$, $-13,65\text{‰}$, e $-12,72\text{‰}$.

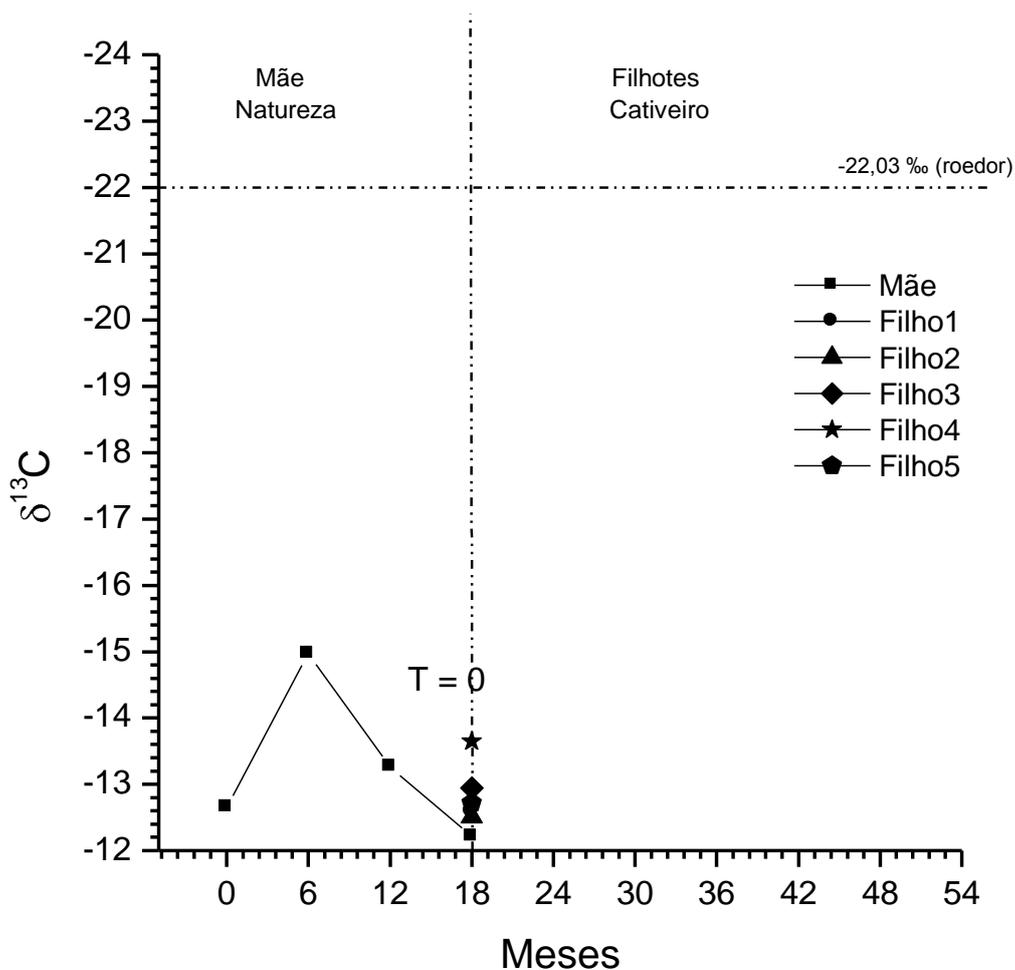


Figura 23: Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ da mãe dois e seus cinco filhotes.

4.5- Roedores mantidos no CEVAP

Os valores isotópicos médios de carbono-13 dos roedores mantidos no Biotério do CEVAP foram de $-21,46\text{‰}$, com o desvio padrão de $\pm 0,15\text{‰}$.

4.6-Ração oferecida aos roedores no CEVAP.

Os valores isotópicos médios de carbono-13 da ração dos roedores mantidos no Biotério do CEVAP foram de $-21,56\text{‰}$, com o desvio padrão de $\pm 0,08\text{‰}$.

4.7- Roedores mantidos no Instituto Butantan.

Os valores isotópicos médios de carbono-13 da ração dos roedores mantidos no Biotério do Instituto Butantan foi de $-22,03\text{‰}$, com o desvio padrão de $\pm 0,07\text{‰}$.

4.8- Ração oferecida aos roedores no Instituto Butantan

Os valores isotópicos médios de carbono-13 da ração dos roedores mantidos no Biotério do Instituto Butantan foram de $-22,56\text{‰}$, com o desvio padrão de $\pm 0,02\text{‰}$.

4.9-Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ dos roedores capturados no estudo de campo

A análise da figura 24 revela os resultados obtidos dos camundongos capturados nas armadilhas de interceptação e queda e dos três filhotes de serpentes *Crotalus durissus terrificus*. Todos possuíam dois segmentos do guizo, bem como o primordial. Os círculos em negro representam os camundongos. A estrela, o losango e o quadrado representam o valor das análises dos segmentos dos guizos das serpentes

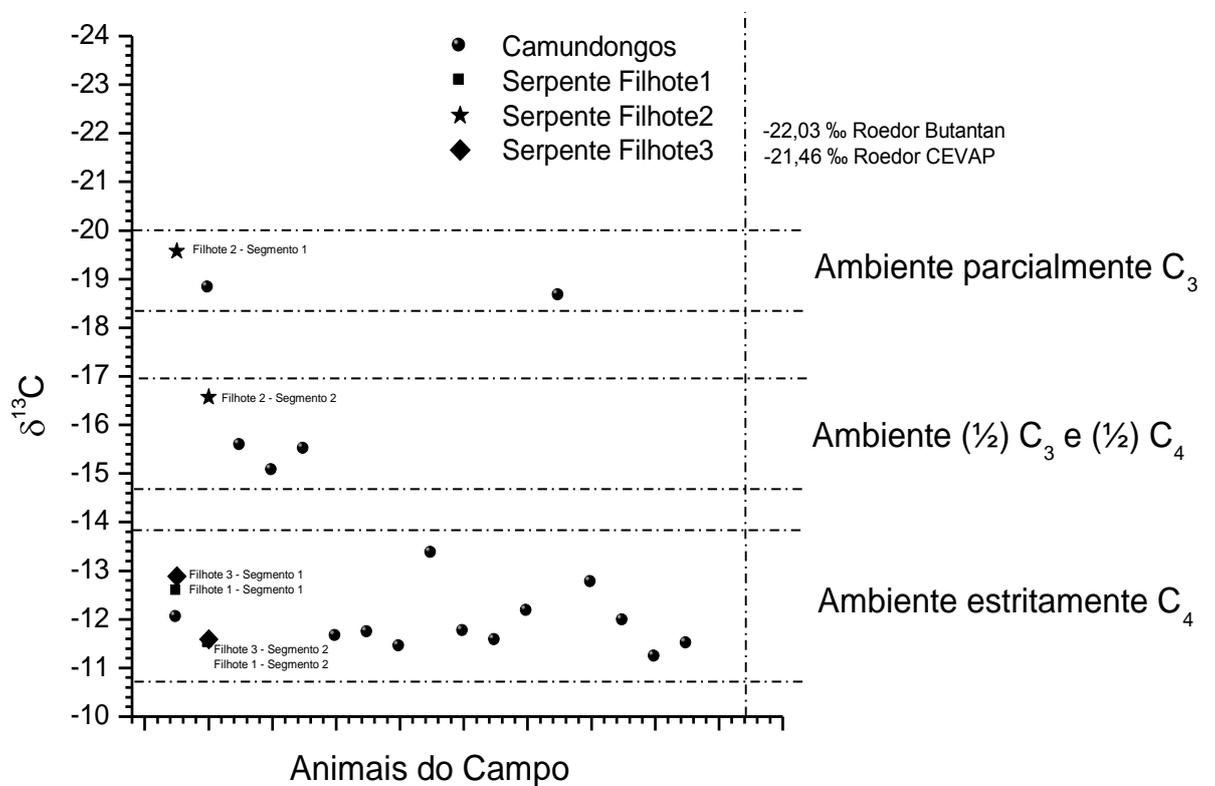


Figura 24: Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ das três serpentes com análise dos guizos e dos 17 comundongos coletados nas armadilhas de inteceptação e queda, montadas em Pardinho.

4.10 - Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ dos segmentos dos guizos de todas as serpentes estudadas

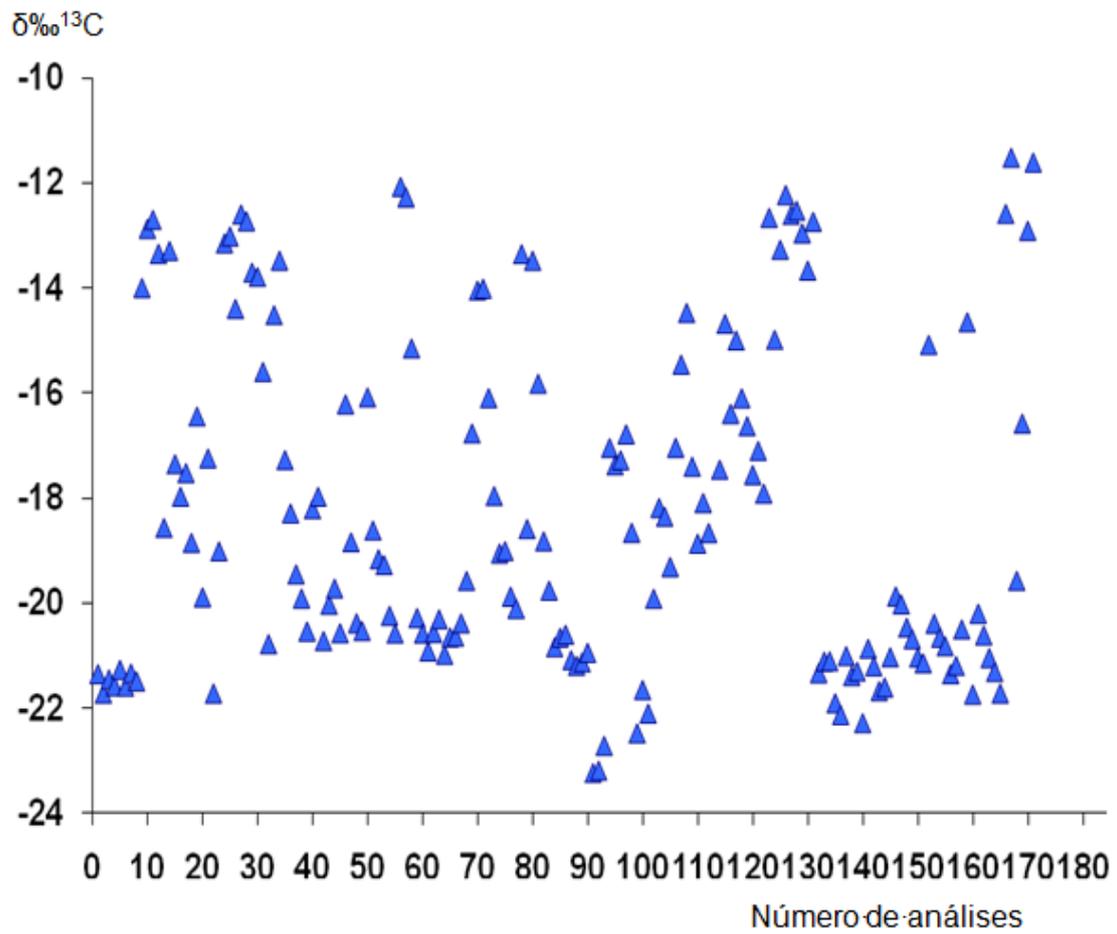


Figura 25: Dispersão de 172 análises do $\delta^{13}\text{C}$ dos segmentos dos guizos das serpentes *Crotalus durissus terrificus*.

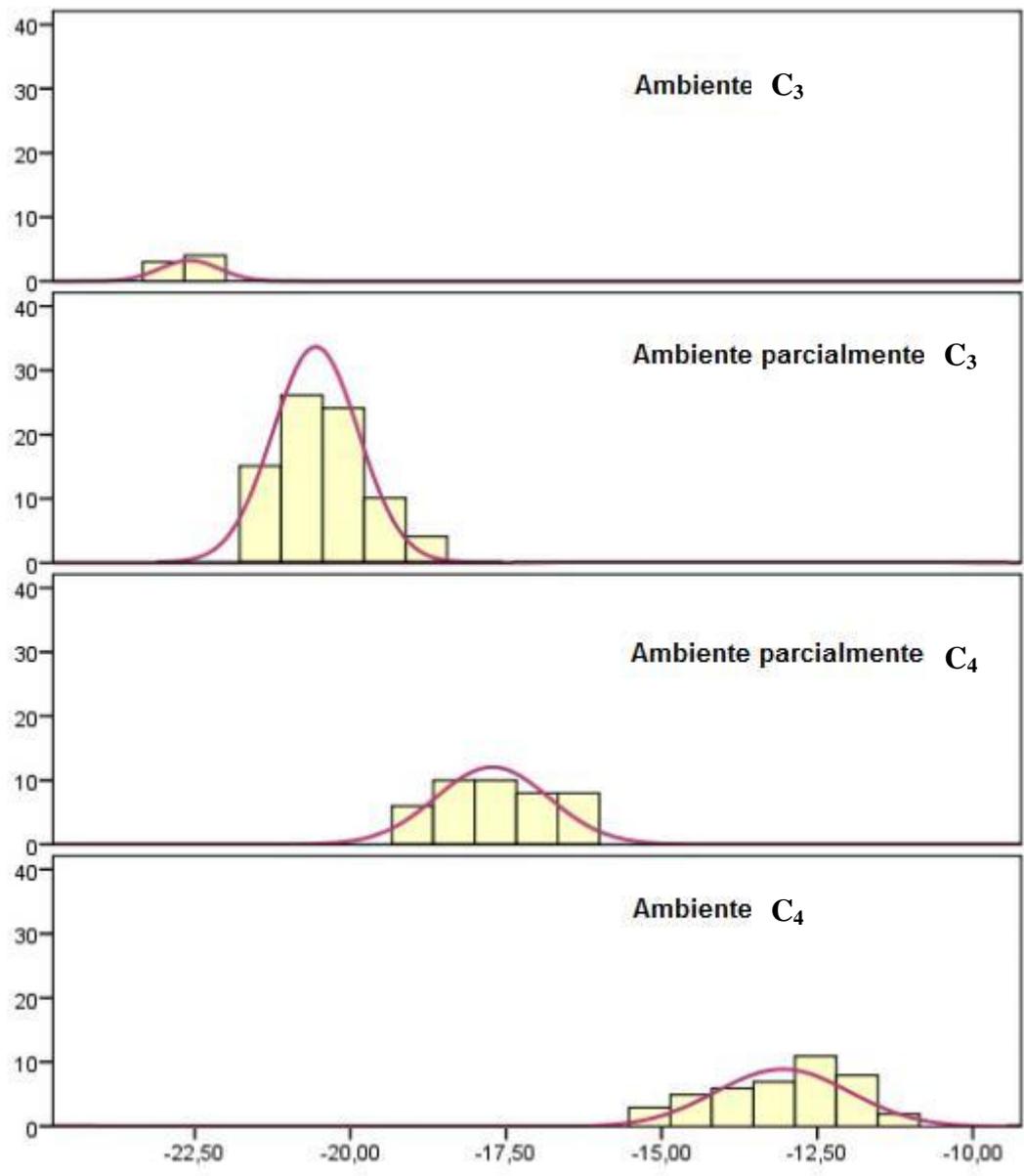


Figura 26: Histograma dos valores do $\delta^{13}\text{C}$ em 172 análises dos segmentos dos guizos das serpentes *Crotalus durissus terrificus* de acordo com os ambientes.

5- Discussão

As serpentes *Crotalus durissus terrificus* encontram-se em expansão no Estado de São Paulo, uma vez que em determinadas regiões tais como Botucatu (6), Ribeirão Preto (8) e Marília (9) o número de acidentes em seres humanos chega ao redor de 20%, contrastando com o resto do país onde este número gira em torno de 10% (3). Esta hipótese pode ser reforçada uma vez que no Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP – CEVAP o maior contingente de serpentes que são doadas, cerca de 67%, pertencem à espécie *Crotalus durissus terrificus* (26). A grande questão que se coloca é: Por que está aumentando o número de acidentes e, por conseguinte, o número destas serpentes na nossa região?

Na tentativa de responder esta questão montou-se este experimento no qual verificou-se o histórico alimentar e o possível caminho que o animal percorre em busca do alimento. Neste sentido, além das serpentes já doadas ao CEVAP, montou-se e estudou-se um experimento de campo para capturar serpentes e roedores, escolhendo-se para tal o Sítio da Moçada, município de Pardinho, região de Botucatu, Estado de São Paulo. Além disso, estudou-se serpentes doadas ao Instituto Butantan, bem como os roedores criados em biotério para alimentação e uma amostra de ração servida aos mesmos.

A análise empregada no presente estudo, ou seja, nos guizos, nos roedores e na ração foi a do isótopo do carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$), obtida por espectrometria de massa. Para a devida compreensão dos resultados antes, porém, descreveu-se os dados da literatura a respeito dos valores de carbono-13 e os valores observados em plantas que serviriam indiretamente de alimento às serpentes. Assim, os ambientes encontrados na natureza são basicamente de plantas do ciclo fotossintético C_3 e C_4 de acordo com Licatti (14). Segundo autores (14, 15) a composição isotópica das plantas depende do ciclo fotossintético e do meio ambiente. O padrão utilizado (PDB) das plantas C_3 variam entre -22‰ e -33‰, com média de -26,7‰ e os valores das plantas C_4 , sofrem variação entre -9‰ e -16‰, com média de -12,5‰.

A seguir analisaremos os quatro animais adultos doados ao CEVAP. Os resultados da figura 13 revelaram que a serpente estudada apresentou no segmento primordial valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ compatível com alimentação em um ambiente estritamente C_4 . Este valor refletiu a alimentação da serpente mãe na natureza, ou seja, ela se alimentava a partir de animais que ingeriam alimentos à base de gramíneas, cana de açúcar ou milho. Observa-se também que os valores isotópicos dos segundo, terceiro e quarto segmentos são compatíveis com o ambiente estritamente C_4 . Neste caso, a serpente permaneceu por um período de aproximadamente 18 meses, alimentando-se de animais provenientes de ambientes estritamente C_4 . A partir de então, o quinto segmento apresentou valor isotópico compatível com ambiente parcialmente C_3 , ou seja, neste caso a alimentação do animal variou entre os ambientes C_4 e C_3 . Neste último caso, os alimentos eram provenientes provavelmente de frutas, arroz, café e árvores de grande porte. No sexto segmento a serpente passou a se alimentar de animais provenientes do ambiente estritamente C_4 . A partir de então foi capturada e doada ao CEVAP, iniciando uma alimentação controlada, ou seja, à base de roedores de biotério que se alimentavam unicamente de ração balanceada produzida a partir de ingredientes parcialmente C_3 . Houve, portanto a troca da alimentação antiga da natureza, pela nova alimentação em cativeiro, iniciando assim a troca isotópica de um ambiente estritamente C_4 para um parcialmente C_4 . Neste caso o *turnover* foi incompleto e de aproximadamente 18 meses não alcançando o patamar de equilíbrio isotópico totalmente.

Analisando-se o animal descrito na figura 14 verificou-se que este nasceu em um ambiente parcialmente C_3 , foi para o ambiente estritamente C_4 , permaneceu neste por aproximadamente 6 meses e a seguir foi capturado e levado ao CEVAP. A seguir passou a se alimentar de roedores do biotério. No cativeiro, esta serpente, trocou toda a alimentação antiga pela nova alimentação, atingindo o patamar de equilíbrio, ou seja valor isotópico próximo ao do roedor do biotério. Para que ocorresse o *turnover* completo, esse animal precisou ser mantido no cativeiro, com a mesma alimentação, durante pelo menos 33 meses. Observa-se, portanto um *turnover* lento em animais de metabolismo lento e em tecidos de troca lenta tais como o guizo. Estes dados concordam com os postulados por Mizutani *et al* (18) que propõe que animais

de metabolismo lento possuem *turnover* lento; animais de metabolismo rápido possuem *turnover* rápido.

Ducatti *et al* (20) postularam que o conhecimento do fator de fracionamento tecido/dieta é essencial para os estudos sobre as composições isotópicas. Estes autores observaram que as concentrações isotópicas dos tecidos dos animais refletem a assinatura isotópica da dieta ingerida. No presente estudo estas variáveis são a ração, o roedor e a serpente. Neste caso, o valor da composição isotópica em valores de $\delta^{13}\text{C}$ passa de um animal para o outro com um pequeno fator de fracionamento. Segundo Tieszen *et al* (17), este valor gira em torno de 1‰ para o $\delta^{13}\text{C}$, embora Ducatti *et al* (20) acrescenta que isso também dependerá, em parte da taxa de *turnover*, ou seja, da síntese e da degradação isotópica dos mesmos. Concluindo, os tecidos com *turnover* rápidos apresentam metabolismo rápido e indicam dietas recentes; tecidos com *turnover* lentos, indicam dietas a longo prazo e animais de metabolismos lentos. A escolha do tecido e da dieta dependerá então da questão de interesse, de acordo com Heyer *et al* (22). Como se pode observar o animal descrito na figura 15 possui um comportamento oposto ao animal descrito na figura 14.

Analisando-se o animal da figura 15 verificou-se que este nasceu em um ambiente C_4 permanecendo nele até a sua captura, quando a partir de então passou a receber dieta de roedores de biotério obtendo um *turnover* completo depois de 37 meses. $[t = (-1/0,1234)\ln(1-0,99) = 37 \text{ meses}]$, ou seja, após esse tempo houve a troca de 99% dos átomos de ^{13}C da antiga alimentação, pelos átomos da nova alimentação; assim como, não houve fracionamento isotópico entre a dieta e o animal, uma vez que: $\epsilon = (\alpha - 1) \cdot 10^3 = \delta_{\text{tecido}} - \delta_{\text{dieta}}$, com valor de $\alpha - 1 = 0,45/10^3$; $\alpha = 1,00045$. Este *turnover* observado é compatível com o *turnover* do animal da figura 16, mostrando novamente que a taxa de troca isotópica é lenta nos segmentos dos guizos estudados.

O animal estudado na figura 16 revela que este nasceu em um ambiente parcialmente C_4 , migrou para um ambiente estritamente C_4 permanecendo neste por aproximadamente 6 meses, onde foi capturado e doado ao CEVAP. Este permaneceu no cativeiro durante 33 meses havendo assim um *turnover* completo de carbono 13. Conclui-se assim que o *turnover* em ambiente de cativeiro é de aproximadamente 33 meses.

A seguir analisaremos os dois filhotes nascidos no CEVAP, que infelizmente não dispomos dos registros das respectivas mães. A análise isotópica revelou que o segmento primordial das figuras 17 e 18 possuem os mesmos valores isotópicos iniciais, ou seja, -16,2 ‰. Ambos passaram a receber desde o nascimento alimentação de roedores de biotério. Por tratar-se de animais em fase de crescimento verificou-se que o *turnover* é mais rápido do que o dos animais adultos adquirindo, portanto, um equilíbrio isotópico mais precocemente. Neste caso o primeiro animal alcançou o patamar de equilíbrio em torno de 18 meses e o segundo em torno de 28 meses. Além disso, é possível sugerir, baseado nos valores isotópicos dos segmentos primordiais de ambos, que possivelmente tratam-se de serpentes irmãs.

A partir de agora analisaremos os valores isotópicos dos guizos obtidos junto ao Instituto Butantan. As serpentes adultas e nascidas em cativeiro observadas respectivamente nas figuras 19, 20 e 21 revelam que o segmento primordial novamente reflete a alimentação da mãe, variando de ambientes estritamente C₄ (figura 21) a parcialmente C₃ (figura 22 e 23). Todas foram alimentadas com roedores de biotério e atingiram o patamar de equilíbrio isotópico respectivamente com 18, 24 e 18 meses estando estas observações compatíveis com as verificadas nos filhotes nascidos no CEVAP. Novamente observa-se que pelo fato destes animais estarem em fase de crescimento o *turnover* é mais rápido do que para os animais adultos.

A análise das mães um e dois (figuras 22 e 23) e de seus respectivos filhotes revelaram que as mães eram provenientes de ambientes parcialmente C₄ e estritamente C₄, ou seja, alimentavam-se de animais que comiam possivelmente gramíneas, cana de açúcar, algumas frutíferas, café e arroz.

Por outro lado, os filhotes da primeira mãe mostraram valores isotópicos provenientes do ambiente parcialmente C₄. Estas serpentes mães estavam prenhas na natureza até a captura e doação ao Instituto Butantan. Após um período de aproximadamente um mês a primeira serpente deu a luz a três filhotes; e a segunda a cinco. Todos os filhotes nasceram com o segmento primordial. A análise isotópica do carbono-13 dos três filhotes da primeira serpente são próximos ao último segmento do guizo da mãe, ou seja, aquele que é mais próximo da cauda, refletindo a alimentação que a mãe teve na natureza. Esta possivelmente transferiu o valor isotópico da alimentação para

todos os seus filhotes no período gestacional. Ocorreu também um pequeno fator de fracionamento entre mãe e filhotes o redor de $\pm 1\text{‰}$ para o $\delta^{13}\text{C}$. A análise dos filhotes da mãe dois revela resultados semelhantes aos observados para a primeira mãe. É possível sugerir que os valores isotópicos do segmento primordial dos filhotes são próximos aos valores do último segmento da mãe.

Analisaremos a seguir o conjunto dos resultados dos animais coletados na natureza capturados por meio das armadilhas de interceptação e queda. Os 17 camundongos analisados revelaram três valores isotópicos distintos e observados na Figura 24. Os valores observados dos camundongos capturados variaram desde alimentação estritamente do tipo C_4 (12 animais, 70,58%), parcialmente C_4 (3 animais, 17,64%) e parcialmente C_3 . (dois animais, 11,78%) Já as três serpentes *Crotalus durissus terrificus* que caíram nas armadilhas de interceptação e queda eram todas filhotes com dois segmentos no guizo de cada uma delas. A análise isotópica revelou valores distintos, principalmente no segmento primordial que refletia a alimentação da mãe na natureza em seu período gestacional. Neste caso, como já abordado anteriormente, a mãe transferiu todo o seu conteúdo isotópico para os filhotes. O filhote número um além do segmento primordial, com valor isotópico proveniente de um ambiente estritamente C_4 , também apresentava um segundo segmento do mesmo ambiente. Isto mostra que possivelmente a sua alimentação foi proveniente de camundongos do mesmo ambiente. Isto porque dos 17 camundongos capturados 12 (70,58%) eram provenientes do ambiente estritamente C_4 .

O filhote número dois além do segmento primordial com valor isotópico proveniente de um ambiente parcialmente C_3 , também apresentava um segundo segmento com valores intermediários entre os ambientes parcialmente C_3 e parcialmente C_4 . Neste caso, possivelmente este animal se alimentava de camundongos provenientes dos dois ambientes.

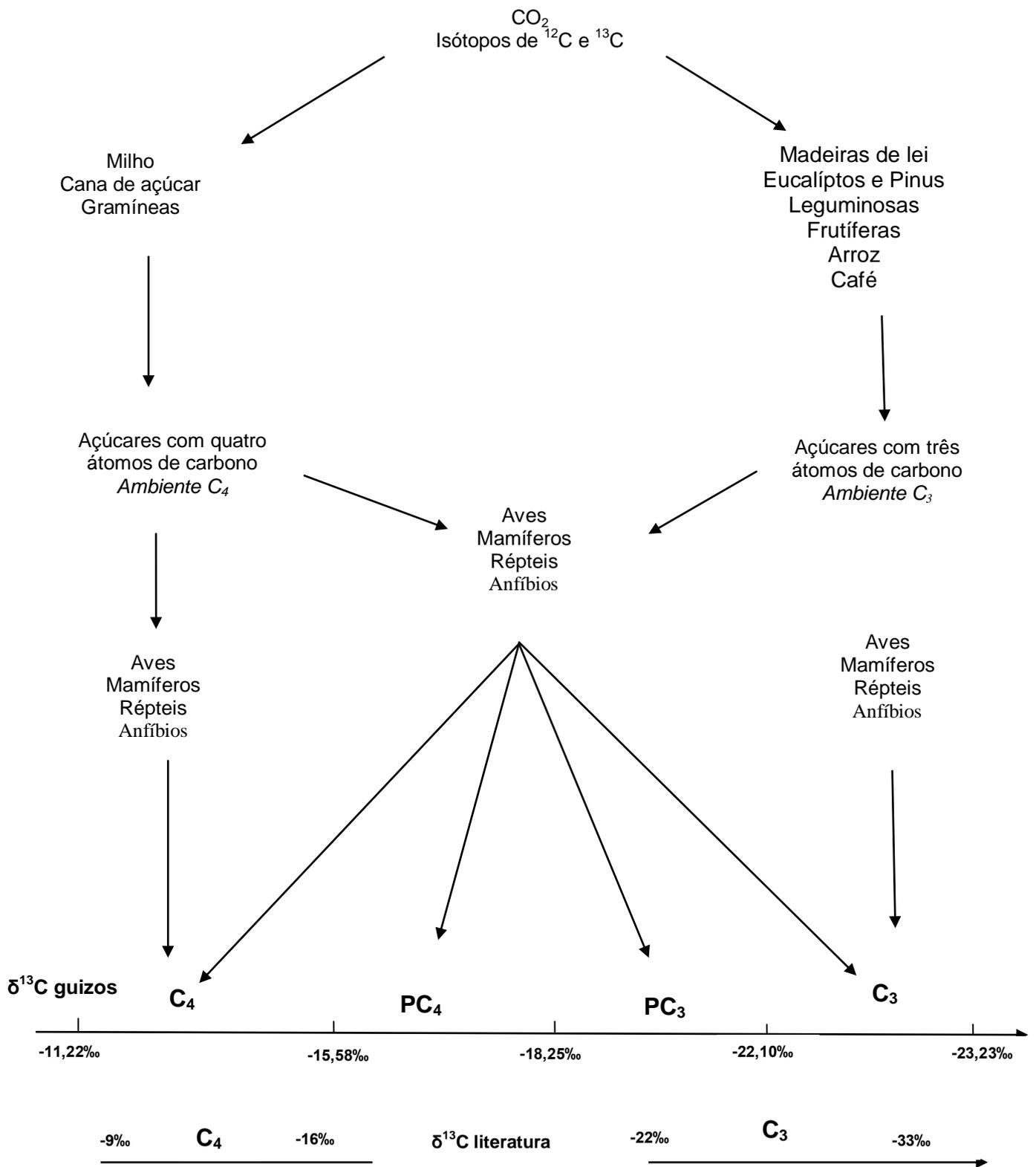
O filhote número três, que continha dois segmentos no guizo, apresentou as mesmas características do filhote número um.

Deve ser salientado que a maioria dos animais, tanto serpentes, quanto roedores foram capturados no ambiente estritamente C_4 , ou seja, onde há predomínio de pasto e de culturas tais como cana de açúcar e milho.

Com base nas observações da literatura, nos resultados obtidos do valor do $\delta^{13}\text{C}$ para 172 guizos analisados, e para melhor entender os resultados obtidos no presente trabalho, foi proposto o organograma a seguir com suas possíveis divisões descrito na figura 27.

Assim, inserimos os valores do isótopo de carbono 13 da literatura (14 e 15) e os valores experimentais observados neste trabalho. Estamos propondo quatro ambientes, sendo dois tradicionais (ambientes C_3 e C_4) e dois de subdivisão entre C_3 e C_4 onde expressamos respectivamente como *ambiente parcialmente C_4* e *parcialmente C_3* . Esta proposta visa o melhor entendimento dos valores isotópicos dos guizos das serpentes e dos roedores coletados na natureza.

A análise destas observações em seu conjunto permitem sugerir que o aumento de serpentes *Crotalus durissus terrificus* na região de Botucatu se deve possivelmente ao fato de que estes animais se adaptaram muito facilmente aos diversos ambientes, apesar de muitos deles devastados pelos seres humanos. Neste sentido, é possível que esta adaptação também ocorreu no tipo de alimentação ingerida. Assim, é possível especular que além dos tradicionais roedores as serpentes possam estar se alimentando de aves. Neste último caso, as culturas extensivas dos tipos cana de açúcar, milho, café e soja, muito presentes na região de Botucatu e no Estado de São Paulo, permitiram que determinadas espécies de aves começassem a fazer os seus ninhos no chão, facilitando assim a captura dos filhotes pelas serpentes. Além disso, haveria a possibilidade de no futuro haver modificação no tipo de veneno das serpentes provenientes de diferentes ambientes aumentando ou diminuindo determinadas frações tais como o que ocorreu nas serpentes *Bothrops insularis* habitantes da ilha Queimada Grande. Futuros estudos poderão responder estas questões intrigantes....(27).



Legendas: C₄ (ambiente C₄), PC₄ (ambiente parcialmente C₄), PC₃ (Ambiente Parcialmente C₃), C₃ (ambiente C₃).

Figura 27: Proposta de organograma do isótopo do $\delta^{13}\text{C}$ para os ambientes C_3 e C_4 , bem como suas subdivisões.

6. Conclusões

A análise dos resultados em seu conjunto permite tecer as seguintes considerações:

- As serpentes *Crotalus durissus terrificus* se alimentam de animais provenientes tanto do ambiente C_3 quanto C_4 ;
- A taxa de *turnover* completo dos filhotes nascidos em cativeiro até atingir o patamar de equilíbrio varia entre 18 e 24 meses;
- A taxa de *turnover* completo dos adultos mantidos em cativeiro até atingir o patamar de equilíbrio varia entre 33 e 37 meses;
- O guizo primordial dos filhotes reflete o ambiente da alimentação da mãe durante o período gestacional, que pode ser comprovado pela análise isotópica do último segmento do guizo próximo ao corpo da mãe;
- Estudos futuros poderão responder total ou parcialmente estas observações, aliado as análises de outros isótopos estáveis, como por exemplo, o $\delta^{15}\text{N}$.

7. Resumo

As serpentes *Crotalus durissus terrificus* possuem cabeça triangular, olhos pequenos com pupila em fenda, fosseta loreal e guizo na cauda. O veneno é uma mistura complexa constituído de cátions metálicos, enzimas, peptídeos e toxinas. Os acidentes em seres humanos e em animais no Estado de São Paulo, Brasil estão em ascensão. Apesar da devastação ambiental, o número de serpentes que são capturadas e doadas aos Institutos de pesquisa também está aumentando. A questão é: Como estes animais conseguiram se adaptar e procriar apesar destas novas condições ambientais adversas? Para responder esta questão avaliou-se o nível de Carbono 13 ($\delta^{13}\text{C}$), por meio de técnica de espectrometria de massa, nos segmentos dos guizos de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) adultas e filhotes, bem como no alimento oferecido.

Esta pesquisa foi baseada no conhecimento de que as plantas existentes na terra apresentam rotas bioquímicas diversas, absorvendo isótopos estáveis nas suas moléculas principalmente o Carbono (^{12}C , ^{13}C), o Hidrogênio (^1H , ^2H), o Oxigênio (^{16}O , ^{17}O , ^{18}O), o Nitrogênio (^{14}N , ^{15}N) e o Enxofre (^{32}S , ^{33}S , ^{34}S , ^{36}S). Durante a síntese dos açúcares, quando o primeiro composto orgânico sintetizado for açúcar contendo três átomos de carbono, estas são denominadas de plantas do ciclo fotossintético C_3 . Quando os primeiros açúcares formados apresentam quatro átomos de carbono, estas são denominadas de plantas do ciclo fotossintético C_4 . No grupo C_3 encontram-se aproximadamente 86% das espécies vegetais, tais como, as madeiras de lei, as leguminosas e as árvores frutíferas. No grupo C_4 , destacam-se principalmente as gramíneas, milho e cana-de-açúcar. A análise dos resultados em seu conjunto permitiu tecer as seguintes considerações: as serpentes *Crotalus durissus terrificus* se alimentam de animais provenientes tanto do ambiente C_3 quanto C_4 ; a taxa de *turnover* completo dos filhotes nascidos em cativeiro até atingir o patamar de equilíbrio variou entre 18 e 24 meses; a taxa de *turnover* completo dos animais adultos mantidos em cativeiro até atingir o patamar de equilíbrio variou entre 33 e 37 meses; o guizo primordial dos filhotes reflete o ambiente da alimentação da mãe durante o período gestacional, que pode ser comprovado pela análise isotópica do último

segmento do guizo próximo ao corpo da mãe; estudos futuros poderão responder total ou parcialmente estas observações, aliado às análises de outros isótopos estáveis, como por exemplo, o $\delta^{15}\text{N}$.

Palavras chave: alimentação, carbono-13, *Crotalus durissus terrificus*, isótopos estáveis

8. Abstract

The *Crotalus durissus terrificus* serpents possess triangular head, small eyes with pupil in crack, little loreal pit and rattle in its tail. The poison is a complex mixture constituted of metallic cations, enzymes, peptides and toxins. The accidents with human beings and animals in Sao Paulo State, Brazil are in ascension. Although the environment devastation, the number of serpents captured and donated to the research institutes is also increasing. The question is: How these animals had managed to adapt themselves and to procreate in spite of these new adverse environmental conditions? To answer this question it was evaluated the Carbon 13 level ($\delta^{13}\text{C}$), through of mass spectrometry technique, in the segments of the rattles of adults and nestlings *Crotalus durissus terrificus* serpents (Cdt), as well as in the offered food. This research was based on the knowledge of that the existing plants in the world present diverse biochemists routes, absorbing stables isotopes in its molecules mainly the Carbon (^{12}C , ^{13}C), the Hydrogen (^1H , ^2H), the Oxygen (^{16}O , ^{17}O , ^{18}O), the Nitrogen (^{14}N , ^{15}N) and the Sulphur (^{32}S , ^{33}S , ^{34}S , ^{36}S). During the sugars synthesis, when the first synthesized organic composition was sugar contained three carbon atoms, these are called of plants of the C_3 photosynthetic cycle. When the first formed sugars present four carbon atoms, these are called of plants of the C_4 photosynthetic cycle. About 86% of the vegetal species are found in the C_3 group, such as, the hardwoods, the vegetables species and fruitful trees. In the C_4 group, the grass species, maize and sugar cane are mainly distinguished. The analysis of the results allowed the following considerations: the *Crotalus durissus terrificus* serpents eat animals proceeding from the C_3 and C_4 ambient; the complete turnover tax of the nestlings born in captivity until reaching the balance level varied between 18 and 24 months; the complete turnover tax of the adult animals kept in captivity until reaching the balance level varied between 33 and 37 months; The primordial rattles of the nestlings reflects the feeding ambient of the mother during its gestation period, which can be proved by the isotopic analysis of the last segment of the rattle near to the body of the mother; future studies will be able to answer total or

partially these observations, jointly with the analyses of other stables isotopes, as for example the $\delta^{15}\text{N}$.

Keywords: Feeding, Carbon-13, *Crotalus durissus terrificus*, Stables isotopes

9-Referências

- 1- Barraviera B, Ferreira Junior RS. Acidentes por animais peçonhentos. Botucatu: CEVAP-UNESP; 2007.
- 2- Uetz P. The EMBL reptile database [database on the Internet]. 2002 [cited 2002 jun 10]. Available from: www.embl-idelberg.de/uetz/livingreptiles.html
- 3- Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 1998.
- 4- Sifuentes DN. Acidentes por escorpiões e serpentes no Brasil: avanços e perspectivas futuras. Conferência ministrada durante o XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 8 a 12 de março de 2009, Recife, PE, Brasil.
- 5- Ribeiro AL, Jorge TM, Iverson BL. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas: estudo de caso em 1988. Rev. Saúde Pública 29:1-380-8; 1995.
- 6- Barraviera B, Bonjorno Jr, Arakaki JC, Domingues D, Marque PC, Rinaldo P, et al - A retrospective study of 40 victims of *Crotalus* snake bites. Analysis of the hepatic necrosis observed in one patient. Rev. Soc. bras Med trop 22:5-12; 1989.
- 7- Barraviera B. Acidentes por serpentes do gênero *Crotalus*. Arq Bras Med 64:14-20; 1990
- 8- Azevedo-Marques MM, Cupo P, Hering SE. Acidentes por animais peçonhentos Medicina 25:539-54; 1992.
- 9- Sgarbi LPS, Ilias M, Machado T, Alvarez L, Barraviera B. Human envenomations due to snakes bites in Marília, state of São Paulo, Brazil. A retrospective epidemiological study. J Venom Anim Toxins. 1:70-8; 1995

¹Segundo normas Vancouver: "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal" (International Comittee of Medical Journals editors, 1993) (138) e por deliberação do Programa de pós-Graduação em doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

- 10- Ducatti C. Medidas de variação natural da relação isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em amostras orgânicas [dissertação]. Piracicaba (SP): Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"; 1977.
- 11- Ducatti C. Isótopos estáveis ambientais. Curso de pós graduação em Zootecnia. Botucatu: UNESP; 1997.
- 12- Kenned BV, Krouse HR. Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. *Can J Physiol Pharmacol*, 68 960-72 1990
- 13- Ducatti C. Isótopos estáveis ambientais [Apostila]. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2004.
- 14- Licatti F. Isótopos estáveis do carbono ($^{12}\text{C};^{13}\text{C}$) em plantas dos ciclos fotossintéticos C_3 e C_4 [Monografia]. Botucatu: Instituto de Biociências, Departamento de Física e Biofísica, Universidade Estadual Paulista; 1997.
- 15- Vogel JC. Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis In: Ehleringer JR, Hale A, Farquhar GD, editors. *Stable isotopes and plants carbon-water relations*. San Diego: Academic Press; 1993 p.29-46
- 16- De Niro MJ, Epstein S. Influence of on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta*. 42 495-506; 1978.
- 17- Tieszen LL, Boutton TN, Tesdahl KG, Slade NA. Fractionation and turnover of stable carbon isotope in animal tissues: implications for $\delta^{13}\text{C}$ analyses of diet. *Oecologia*. 57 32-7; 1983.
- 18- Mizutani H., Kubaya Y., Wada E. Nitrogen and carbon isotope composition relates linearly in cormorants tissues and its diets *Isotopenpraxis*; 4 166-168; 1991.
- 19- Hobson Ka, Clark RG. Assessing avian diets using stables II: factores influencing diet- tissue fractionation. *The Condor*. 94 189-97; 1992.
- 20- Ducatti C, Carrijo AS, Pezzato AC, Mancera PFA. Modelo teórico e experimental da reciclagem do Carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. *Scient Agríc*. 59 29-33; 2002.
- 21- Kelly JF. Stable isotope of carbon and nitrogen n the study of avian and mammalian trophic ecology. *Can J Zool*. 78 1-27; 2000.

- 22- Heyer WR, Donnely RW, Mcdiarmid RW, Hayek LC, Foster MS, editors. Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians. Washington: Smithsonian Institution Press; 1994.
- 23- Cechin S Z, Martins M Eficiencia nas armadilhas de queda (*pitfall traps*) em amostragens de anfíbios e répteis no Brasil. Rev Bras Zool. 17 729-40; 2000.
- 24- Jones RJ, Ludlow MM, Troughton JH and Blunt CG. Estimation of the proportion of C₃ and C₄ plant species in diet of animal from the ratio natural ¹²C and ¹³C isotopes in the faeces. J Agri Sci Cam, 92, 91-100, 1997.
- 25- Microcal Software Orig 6.0. Professional oring data análýsis and technical graphics. Northampton: Microcal software, Inc; 1999.
- 26- Lourenço Junior A, Barros LC, Campagner MV, Barraviera B, Ferreira Junior RS. Aspectos ecológicos das espécies de serpentes recebidas pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos capturadas na região de Botucatu – SP no ano de 2008. In: 33 Congresso da Sociedade de Zoológicos do Brasil; Brasil; 2009, Bauru, SP. Anais: 2009
- 27- Mercadante OA, Moura LFHA. Island serpents: in Acatrazes and Queimada Grande, São Paulo. Magma Editora Cultural, 2005.

10. APÊNDICE

Anexo 1

Autorização e licença do IBAMA para a coleta de campo.



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 13999-1	Data da Emissão: 29/04/2008 11:39	Data de Validade: 29/04/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2282293	Nome: Melissa Gaste Martinez	CPF: 277.343.228-24
Título do Projeto: Determinação da possível rota migratória alimentar das serpentes <i>Crotalus durissus terrificus</i> da região de Botucatu por meio da análise dos isótopos estáveis do carbono (δ13C)		
Nome da Instituição : Universidade Estadual Paulista-Faculdade de Medici		CNPJ: 48.031.918/0019-53

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação de pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT).
2	Esta autorização não exige o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br/cites . Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NAO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BOTUCATU	SP	Regional do município de Botucatu(propriedades privada)	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Anura, Rattus novaeguineae, Rattus norvegicus, Rattus nitidus, Rattus nativitatis, Mus musculus, Crotalus durissus, Rattus rattus
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Anura, Mus musculus, Rattus nativitatis, Rattus nitidus, Rattus norvegicus, Rattus novaeguineae, Rattus rattus, Crotalus durissus
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Anura (*Qtde: 25), Mus musculus (*Qtde: 15), Rattus nativitatis (*Qtde: 15), Rattus nitidus (*Qtde: 15), Rattus norvegicus (*Qtde: 15), Rattus rattus (*Qtde: 15), Rattus novaeguineae (*Qtde: 15)
4	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Rattus rattus, Rattus novaeguineae, Rattus norvegicus, Rattus nitidus, Rattus nativitatis, Mus musculus, Anura

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

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Animal morto ou partes (carcaça)/osso/pele
2	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Animal morto ou partes (carcaça)/osso/pele
3	Amostras biológicas (Répteis)	Fragmento de tecido/órgão
4	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Armadilha de queda "pit fall"
5	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Outros métodos de captura/coleta(Armadilhas de queda "Pit Fall")
6	Método de captura/coleta (Répteis)	Armadilha de queda "pit fall"

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

Código de autenticação: 62374471





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 13999-1	Data da Emissão: 29/04/2008 11:39	Data de Validade: 29/04/2009
------------------------	--	-------------------------------------

Dados do titular

Registro no Ibama: 2282293	Nome: Melissa Gaste Martinez	CPF: 277.343.228-24
Título do Projeto: Determinação da possível rota migratória alimentar das serpentes <i>Crotalus durissus terrificus</i> da região de Botucatu por meio da análise dos isótopos estáveis do carbono ($\delta^{13}C$)		
Nome da Instituição : Universidade Estadual Paulista-Faculdade de Medici		CNPJ: 48.031.918/0019-53

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Universidade Estadual Paulista-Faculdade de Medici	todo o material coletado será destinado para a própria pesquisa, não havendo outro destino

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

Código de autenticação: 62374471



Anexo 2:

Ração oferecida aos roedores do Biotério do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos - CEVAP

RAÇÃO PURINA – NOME COMERCIAL – LABINA

Ração oferecida aos roedores do Centro de Estudos de venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) (alimento completo para ratos e camundongos).

COMPOSIÇÃO BÁSICA DO PRODUTO:

Magnésio – 0,006 mg
Ferro – 180 mg
Cobre – 30 mg
Zinco – 110 mg
Manganês – 110 mg
Iodo – 1 mg
Selênio – 0,2 mg
Cobalto – 2 mg
Vitamina A – 25.577 UI
Vitamina D3 – 4.000 UI
Vitamina E – 82 mg
Vitamina K – 6,40 mg
Ácido Fólico – 13 mg
Biotina – 0.16 mg
Colina – 2.800 mg
Niacina – 220 mg
Pantotenato de cálcio – 90 mg
Tiamina – 11 mg
Riboflavina – 12 mg
Piridoxina – vit. B6 HCl – 11 mg
Antioxidante – 200 mg
Ácido propiônico 1.486 mg
Umidade máxima – 13%
Proteína bruta (min.) – 23%
Extrato etéreo (min.) – 4%
Matéria fibrosa (max.) – 7%
Matéria mineral (max.) – 10%
Cálcio (máx.) – 1,30%
Fósforo (min.) – 0,85%

Validade de 3 meses após a data de fabricação.

O telefone de atendimento ao consumidor da Purina é: 0800-7041241, e o site é:

www.nestle.com/purina/matrxcotainer/default.aspx

ANEXO 3

Ração oferecida aos roedores do Biotério do Instituto Butantan.

NUVILAB CR1 IRRADIADA

Ração dos roedores de biotério do Instituto Butantan (Alimento completo para camundongos e ratos).

COMPOSIÇÃO BÁSICA DO PRODUTO: Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, gordura vegetal, premix vitamínico mineral aminoácido.

NÍVEIS DE GARANTIA POR QUILOGRAMA DO PRODUTO:

Umidade (máx.) 12,50%

Proteína Bruta (min.) 22,00%

Extrato Etéreo (min.) 5,00%

Matéria Mineral (máx.) 10,00%

Matéria Fibrosa (máx.) 8,00%

Cálcio (máx.) 1,40%

Fósforo (min.) 0,60%

ENRIQUECIMENTO POR QUILOGRAMA DO PRODUTO:

VITAMINAS: Vitamina A 13.000 UI, vitamina D3 2.000 UI, vitamina B1 5 mg, vitamina B12 22 mcg, vitamina B2 6 mg, vitamina B6 7 mg, vitamina E 34 mg, vitamina K3 3 mg, niacina 60 mg, biotina 0,05 mg, ácido fólico 1 mg, ácido pantotênico 21 mg, colina 650 mg.

MICROELEMENTOS MINERAIS: Cobre 10 mg, cobalto 1,5 mg, ferro 50 mg, iodo 2 mg, manganês 60 mg, selênio 0,05 mg, zinco 60 mg.

AMINOÁCIDOS: Lisina 100 mg, metionina 300 mg.

ADITIVOS: Antioxidante 100 mg

INDICAÇÃO: Alimento irradiado para camundongos e ratos de laboratório.

USO: Administração a vontade através de comedouros suspensos.

CONSERVAÇÃO: Conservar o produto em ambiente seco e arejado, evitando luz e calor excessivos.

PRAZO DE VALIDADE: 3 meses após data de fabricação

Anexo 4:

Relação das serpentes doadas ao CEVAP contendo seu histórico e procedência até a retirada do guizo para as análises

Guizo 9

RG: 887

Entrada no CEVAP: 08/06/05

Comprimento: 80 cm

Cauda: 06 cm

Peso: 410g

Fêmea

Procedência : Fazenda Haras Braido – Cerqueira César

Ambiente de coleta: pasto

Primeira Biometria: 79cm/5,5 cm/ 270g

Alimentações: 16

Guizo 10

RG: 882

Entrada no CEVAP: 08/06/05

Comprimento: 99cm

Cauda: 7,5 cm

Peso: 500g

Macho

Procedência : Itatinga

Ambiente de coleta: estrada

Primeira Biometria: 90cm/07 cm/ 540g

Alimentações: 17 (1 regurgito, 1 não comeu)

Guizo 11

RG: 879

Entrada no CEVAP: 01/05/05

Comprimento: 117 cm

Cauda: 10 cm

Peso: 1.800g

Fêmea

Procedência : Pardinho

Primeira Biometria: 114cm/07 cm/ 950g

Alimentações: 20

Guizo 12

RG: 889

Entrada no CEVAP: 23/05/05

Comprimento: 85 cm

Cauda: 07 cm

Peso: 590g

Fêmea

Procedência :Bofete

Primeira Biometria: 80cm/6,5 cm/ 540g

Alimentações: 16 (2 não comeu)

Guizo 13

RG: 852

Entrada no CEVAP: 19/04/05

Comprimento: 87 cm

Cauda: 11 cm

Peso: 440g

Macho

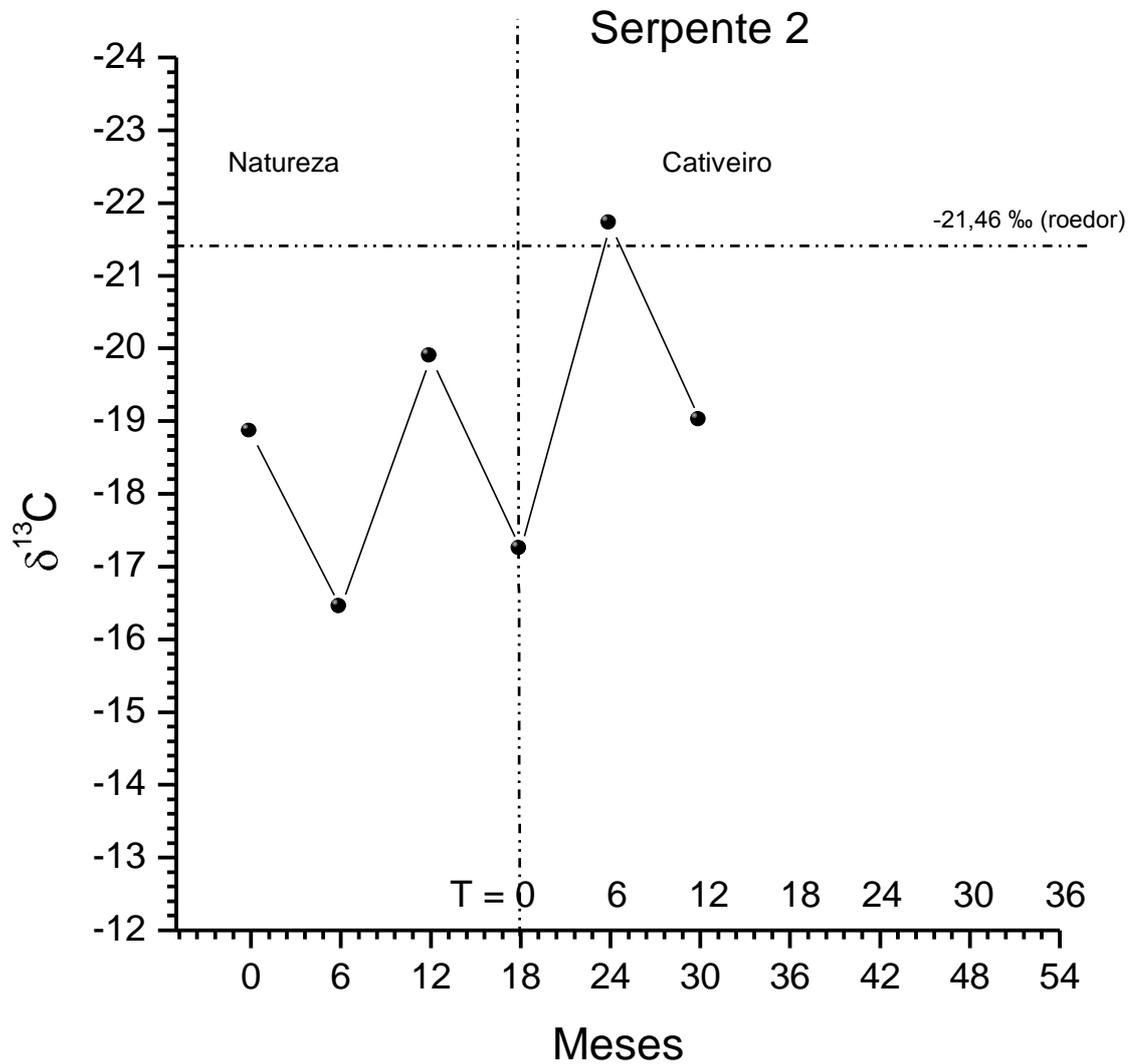
Procedência : Pardinho

Primeira Biometria: 85cm/10 cm/ 480g

Alimentações: 17 (2 não comeu)

Anexo 5:

Resultados das análises do $\delta^{13}\text{C}$ dos guizos das serpentes doadas ao CEVAP que não estão no corpo da dissertação, mas foram estudados e analisados.



Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no guizo da serpente dois.

Os valores dos segmentos dos guizos da serpente dois são:

Gomo 1: -18,84‰

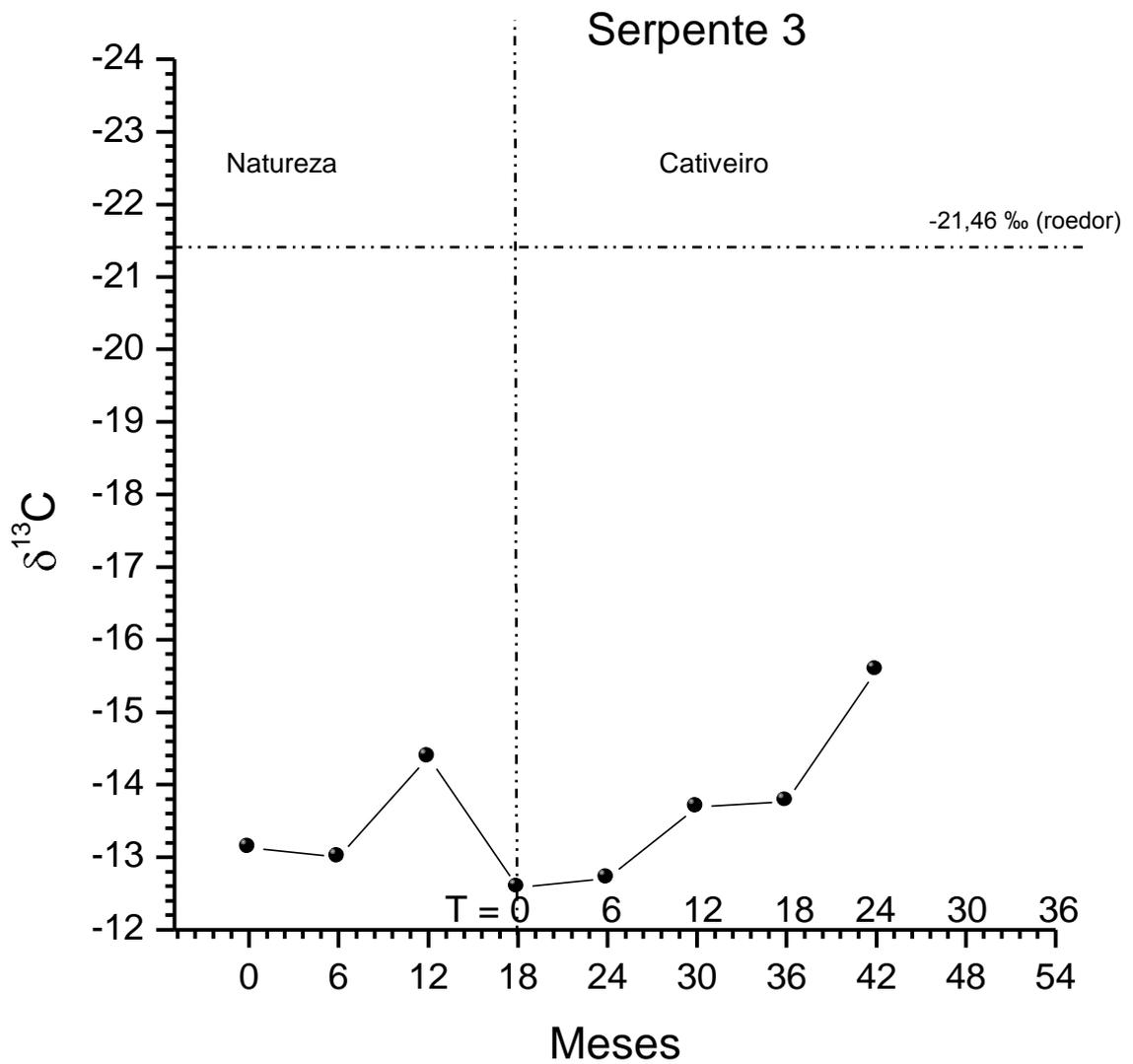
Gomo 2: -16,43‰

Gomo 3: -19,96‰

Gomo 4: -17,23‰

Gomo 5: -21,71‰

Gomo 6: -19,00‰



Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no guizo da serpente três

Os valores dos segmentos dos guizos da serpente três são:

Gomo 1: -13,13‰

Gomo 2: -13,00‰

Gomo 3: -14,50‰

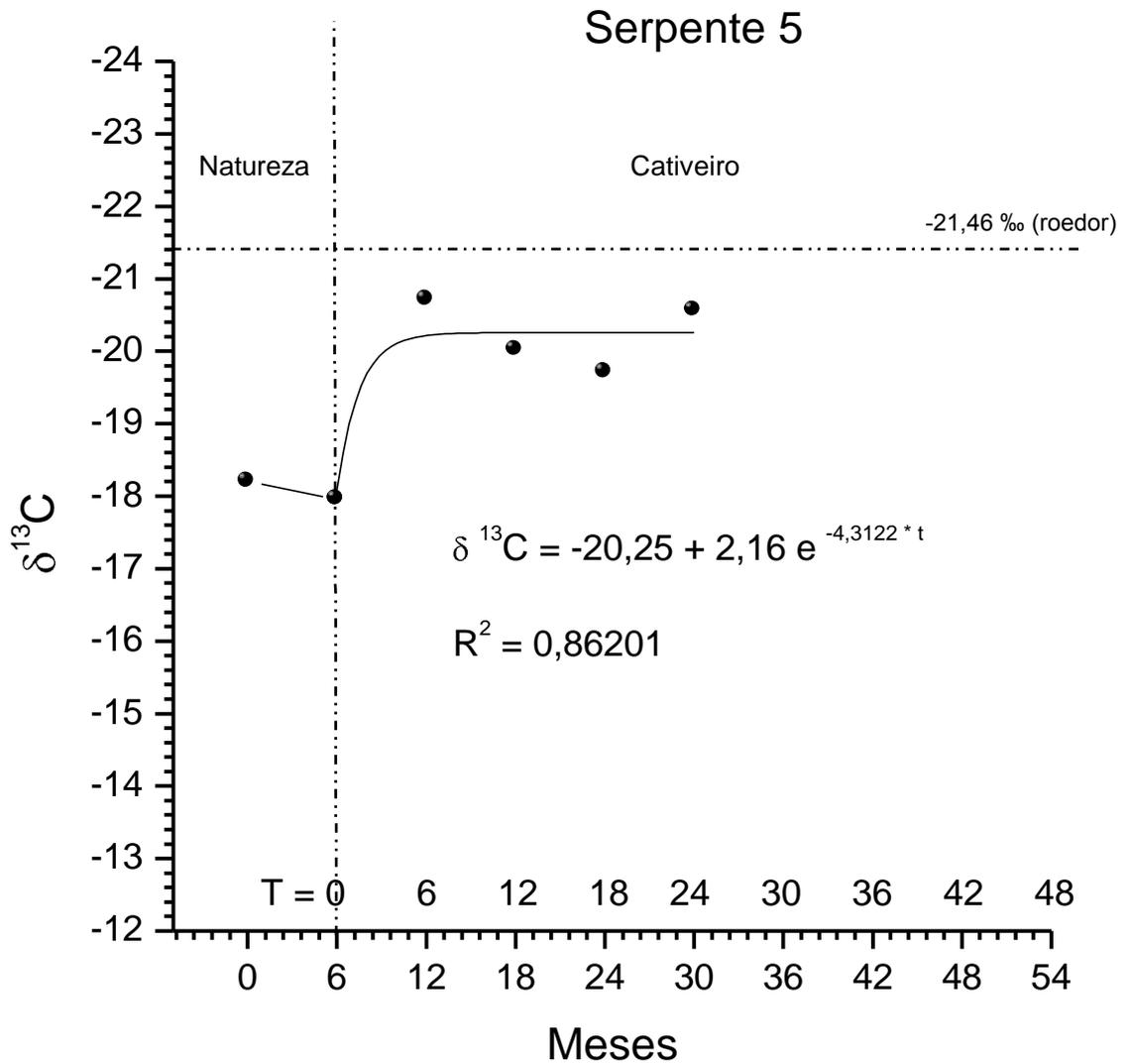
Gomo 4: -12,58‰

Gomo 5: -12,71‰

Gomo 6: -13,69‰

Gomo 7: -13,77‰

Gomo 8: -15,58‰



Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no guizo da serpente cinco.

Os valores dos segmentos dos guizos da serpente cinco são:

Gomo 1: -18,02‰

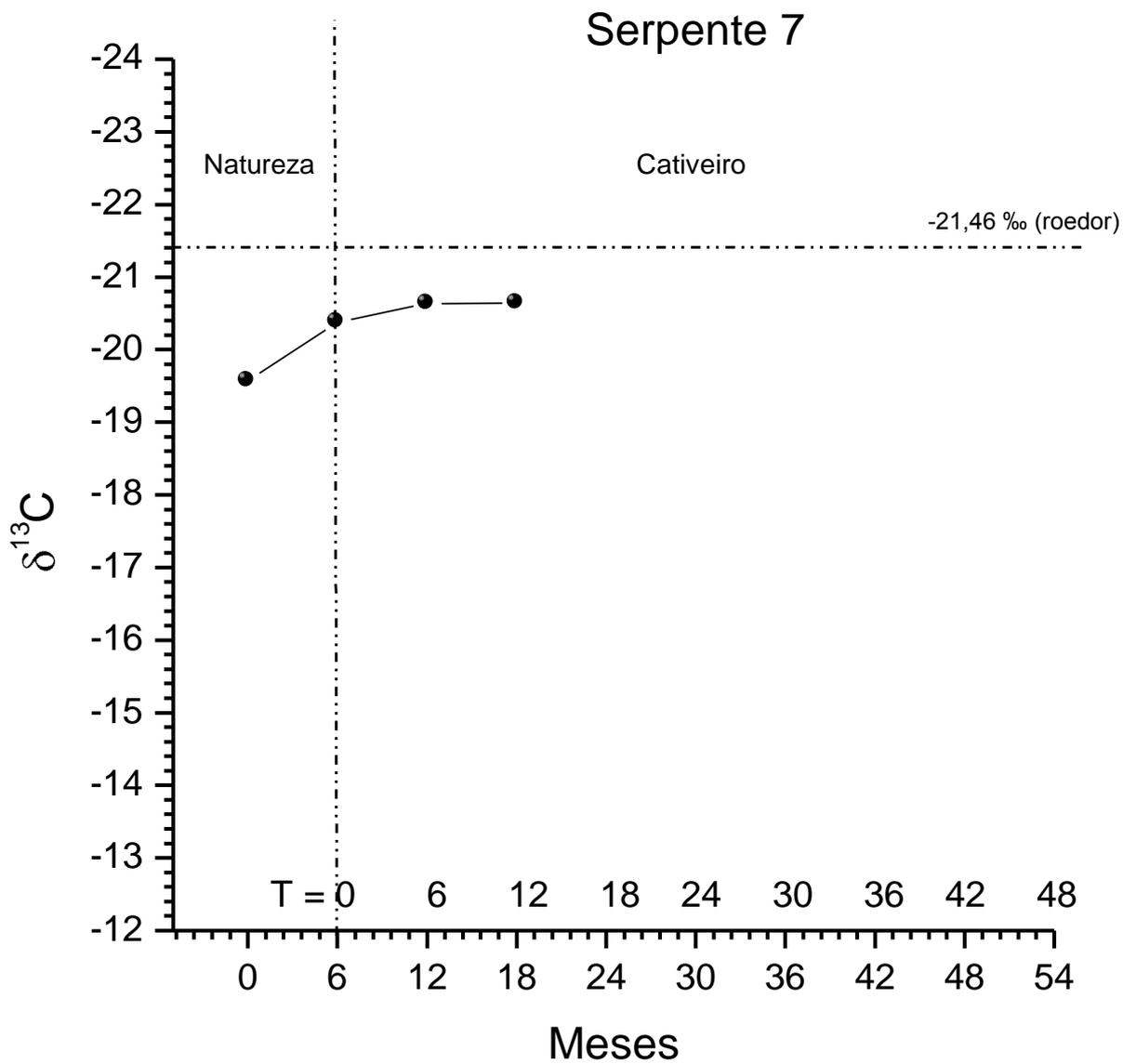
Gomo 2: -17,96‰

Gomo 3: -20,71‰

Gomo 4: -20,02‰

Gomo 5: -19,71‰

Gomo 6: -13,69‰



Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no guizo da serpente sete.

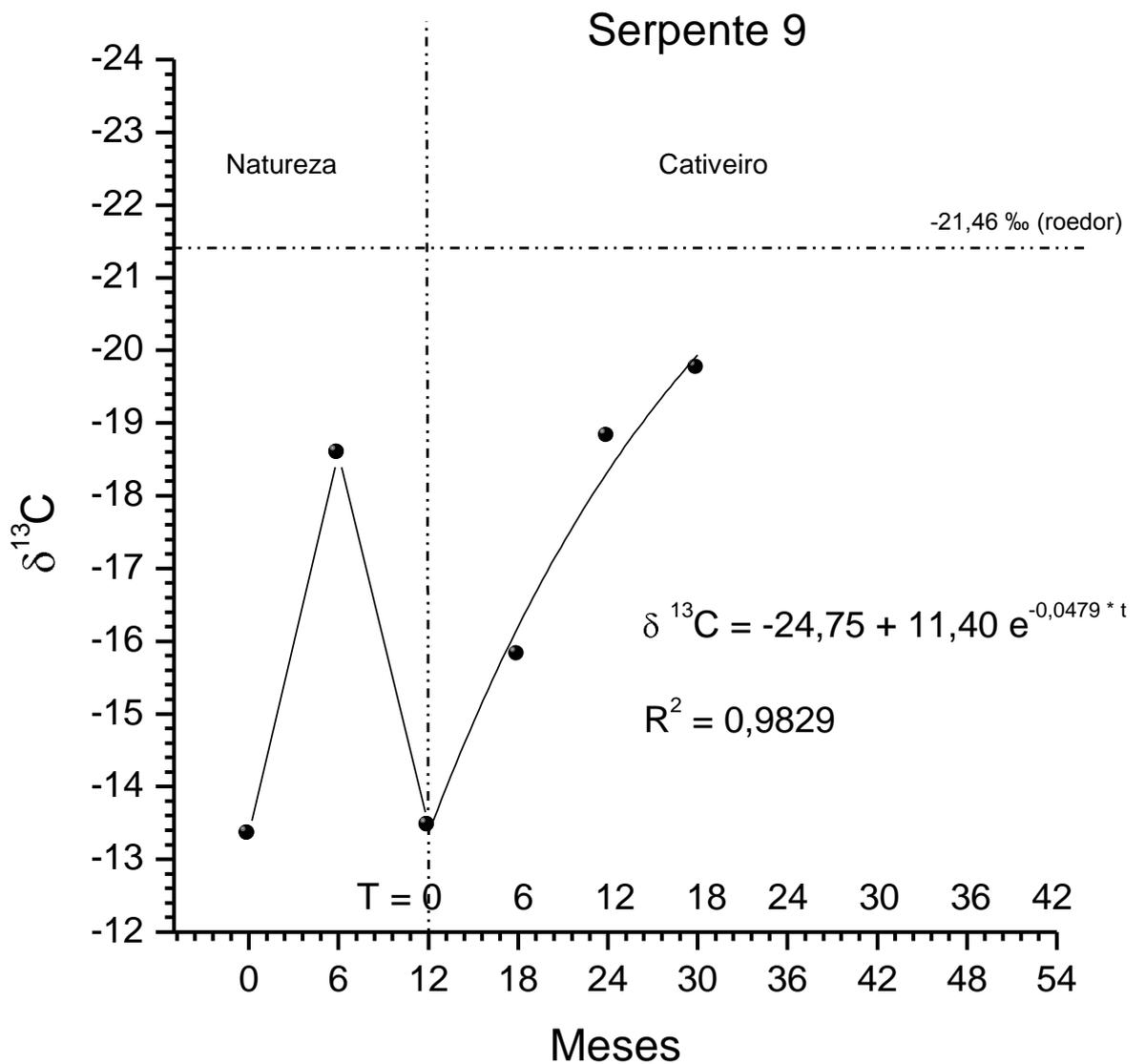
Os valores dos segmentos dos guizos da serpente três são:

Gomo 1: -19,57‰

Gomo 2: -20,38‰

Gomo 3: -20,63‰

Gomo 4: -20,64‰



Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no guizo da serpente nove.

Os valores dos segmentos dos guizos da serpente nove são:

Gomo 1: -13,34‰

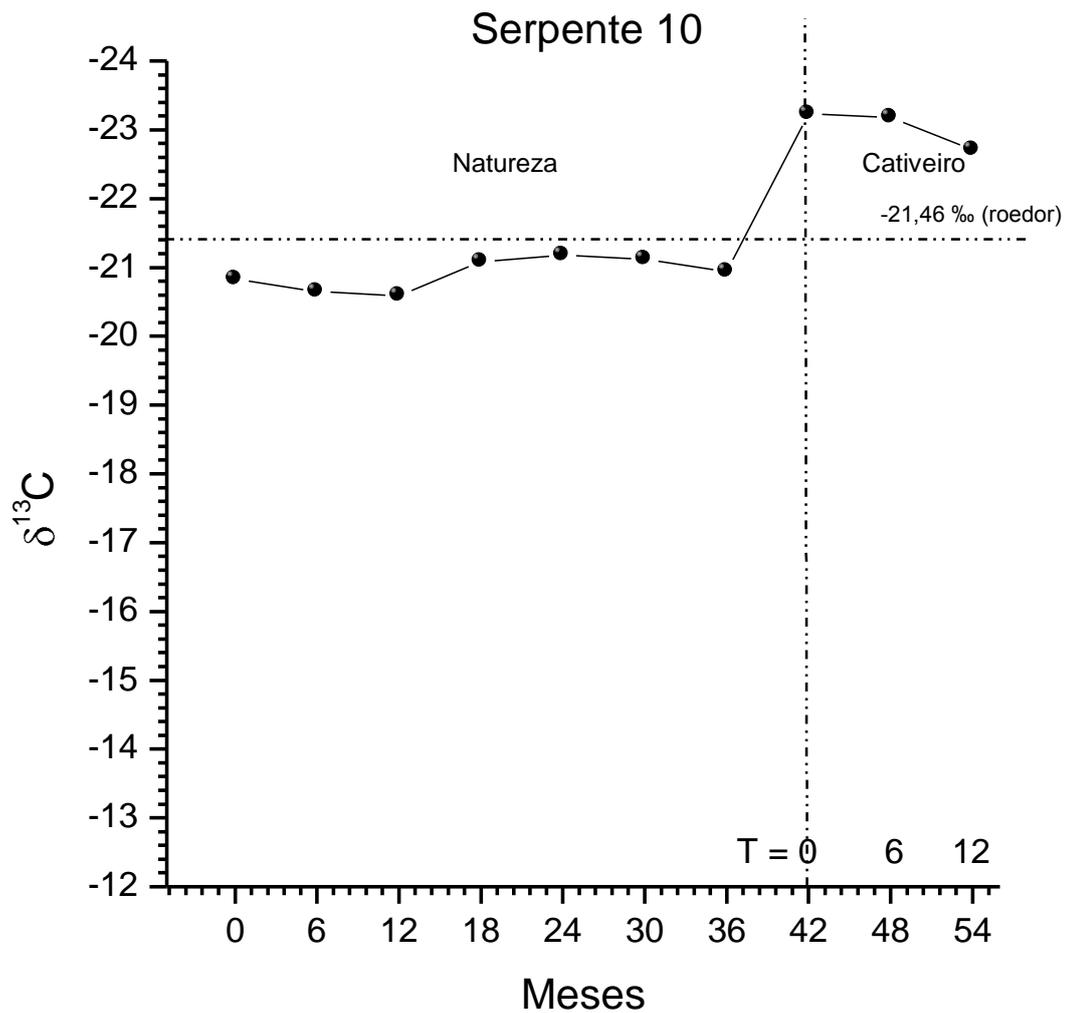
Gomo 2: -18,54‰

Gomo 3: -13,46‰

Gomo 4: -15,86‰

Gomo 5: -18,81‰

Gomo 6: -19,75‰



Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no guizo da serpente 10.

Os valores dos segmentos dos guizos da serpente 10 são:

Gomo 1: -20,83‰

Gomo 2: -20,68‰

Gomo 3: -20,59‰

Gomo 4: -21,08‰

Gomo 5: -21,18‰

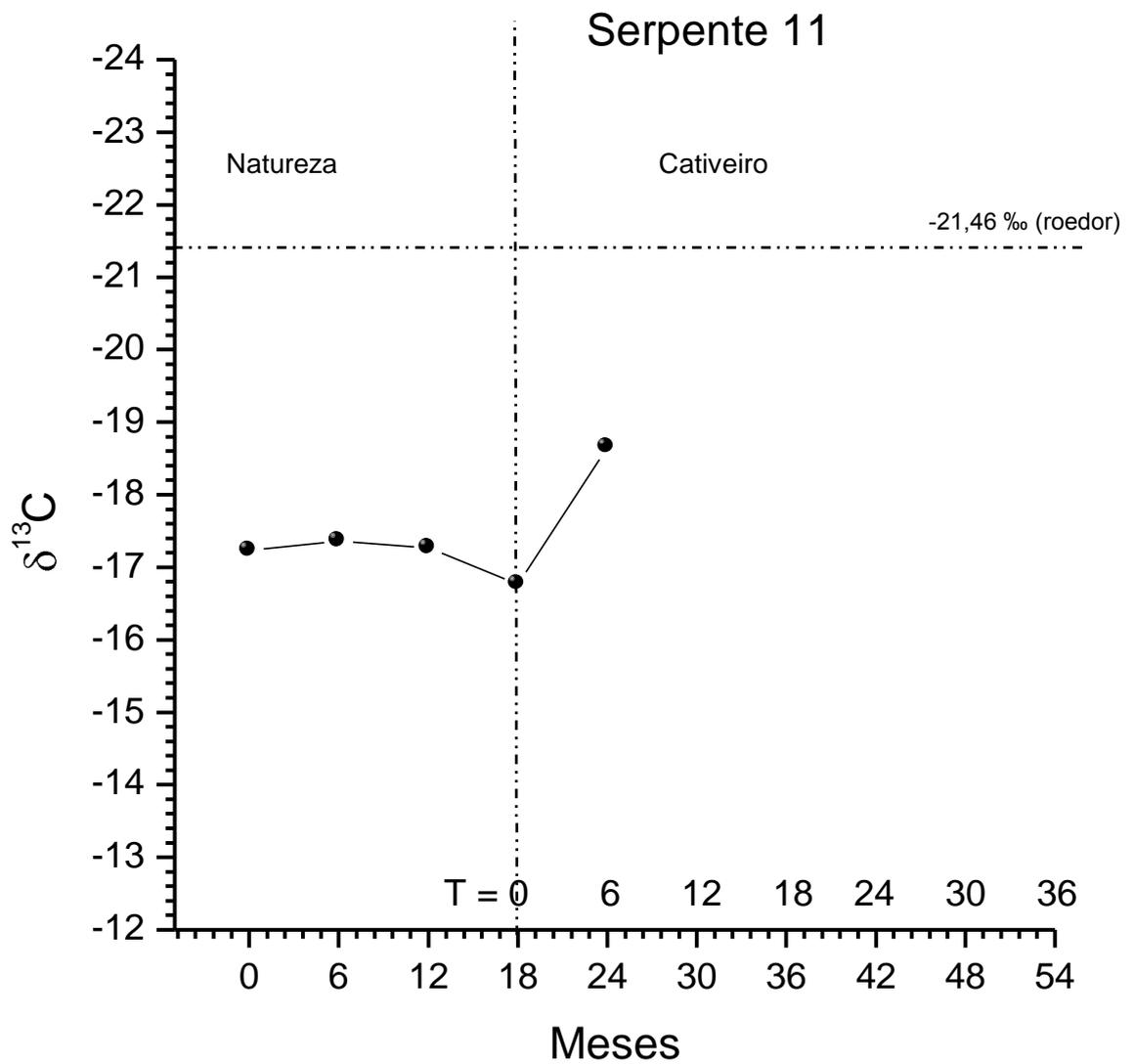
Gomo 6: -21,12‰

Gomo 7: -20,94‰

Gomo 8: -23,23‰

Gomo 9: -23,18‰

Gomo 10: -22,72‰



Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no guizo da serpente 11.

Os valores dos segmentos dos guizos da serpente 11 são:

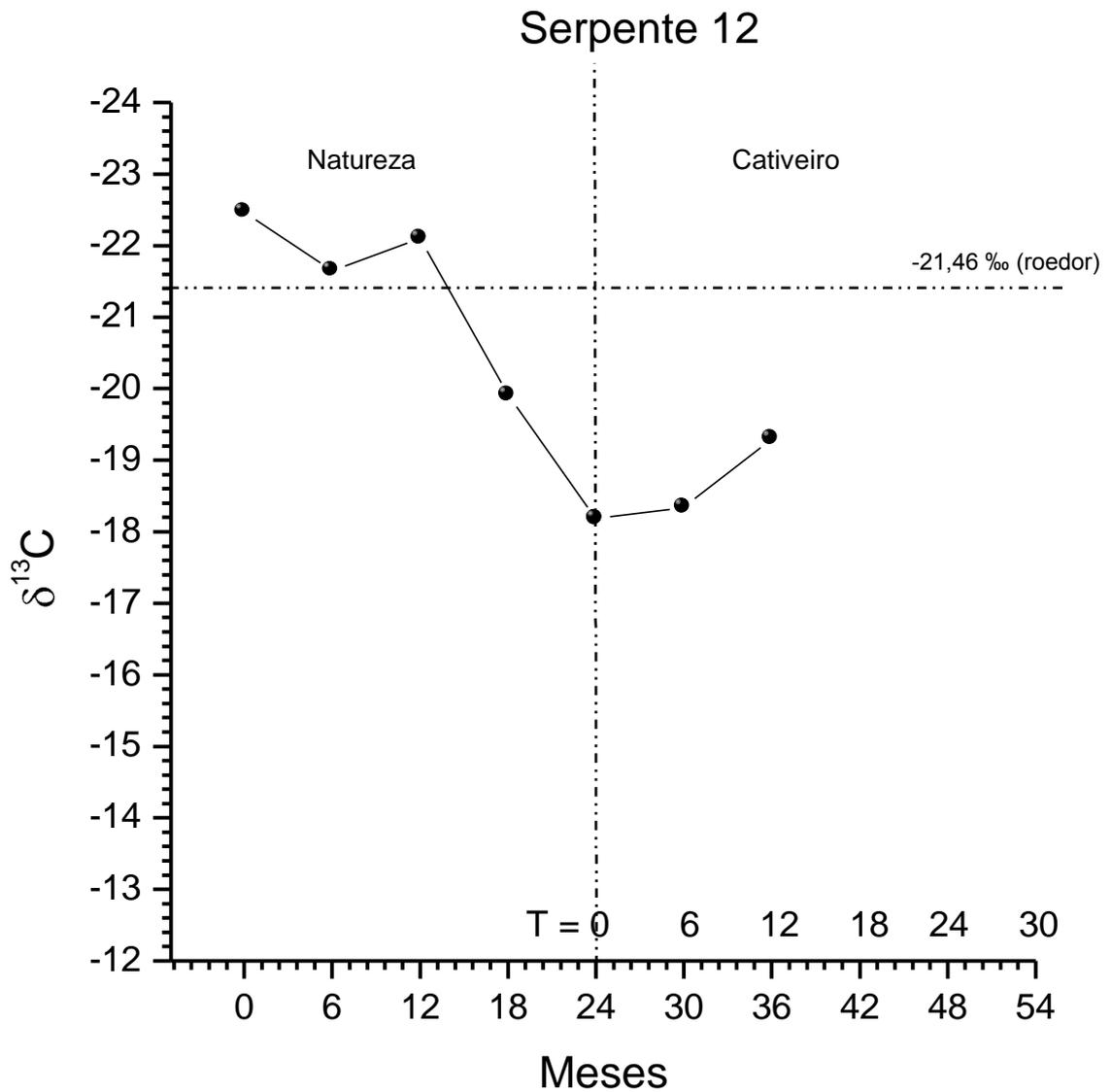
Gomo 1: -17,03‰

Gomo 2: -17,36‰

Gomo 3: -17,27‰

Gomo 4: -16,77‰

Gomo 5: -18,65‰



Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no guizo da serpente 12.

Os valores dos segmentos dos guizos da serpente 12 são:

Gomo 1: -22,47‰

Gomo 2: -21,65‰

Gomo 3: -22,10‰

Gomo 4: -19,91‰

Gomo 5: -18,98‰

Gomo 6: -18,34‰

Gomo 7: -19,30‰

Anexo 6:

Relação das serpentes doadas ao Instituto Butantan contendo seu histórico e procedência até a retirada do guizo para as análises.

Serpentes doadoras dos Guizos – Butantan

GUIZO 01

Espécie: *C.d.t.* – 0701-03

Procedência: Jataí – Goiás (GO)

Peso: 60 g

Comprimento Real do Corpo (CRC): 46 cm

Comprimento Total do Corpo (CT): 50 cm

Sexo: Macho

Número de Alimentações: 18

Nascimento: 27/11/2006

*Nascido em cativeiro. 5 gomos com o primordial.

GUIZO 02

Espécie: *C.d.t.* 0701-1

Procedência: Itumbiara – Goiás (GO)

Peso: 115 g

Comprimento Real do Corpo (CRC): 60 cm

Comprimento Total do Corpo (CT): 65 cm

Sexo: Macho

Número de Alimentações: 25

Nascimento: 10/11/2006

*Nascido em cativeiro. 4 gomos com o primordial.

GUIZO 03

Espécie: *C.d.t.* 0701-22

Procedência: Itumbiara – Goiás (GO)

Peso: 130 g

Comprimento Real do Corpo (CRC): 58 cm

Comprimento Total do Corpo (CT): 63 cm

Sexo: Macho

Número de Alimentações: 24

Nascimento: 10/11/2006

*Nascido em cativeiro. 5 gomos com o primordial.

GUIZO 04

Espécie: *C.d.t.* 0606-05

Procedência: Campo Limpo paulista - SP

Peso: 235 g

Comprimento Real do Corpo (CRC): 72,5 cm

Comprimento Total do Corpo (CT): 78 cm

Sexo: Fêmea

Número de Alimentações: 35

Nascimento: 10/02/2006

*Nascido em cativeiro. 7 gomos sem o primordial.

GUIZO 05

Espécie: *C.d.t* 0606-01

Procedência: Campo Limpo Paulista - SP

Peso: 240 g

Comprimento Real do Corpo (CRC): 69 cm

Comprimento Total do Corpo (CT): 76 cm

Sexo: Macho

Número de Alimentações: 35

Nascimento: 10/02/2006

*Nascido em cativeiro. 7 gomos com o primordial.

GUIZO 06

Espécie: *C.d.t.* 0606-02

Procedência: Campo Limpo Paulista - SP

Peso: 250 g

Comprimento Real do Corpo (CRC): 70,5 cm

Comprimento Total do Corpo (CT): 76 cm

Sexo: Fêmea

Número de Alimentações: 33 alimentações

Nascimento: 10/02/2006

*Nascido em cativeiro. 7 gomos com o primordial.

Guizo 01- Mãe 01 – sem o guizo primordial

Espécie: *Crotalus durissus terrificus* - *C.d.t.*

Mãe da ninhada: 01

Procedência: Machado -MG

Data de entrada: 10/01/2008.

Peso: 295 g. Após parto

Comprimento real do corpo (CRC): 77 cm (da cabeça até a cloaca)

Comprimento total do Corpo (CT): 82 cm (da Cabeça até ao final da cauda)

Data do nascimento da ninhada: 12/01/2008.

Observações: três filhotes da mesma mãe - todos com apenas o guizo primordial

Crotalus durissus terrificus - C.d.t. – **Triagem 01 – Filhote 01**

Comprimento real do corpo (CRC): 28 cm (da cabeça até a cloaca)

Comprimento total do Corpo (CT): 30,5 cm (da cabeça até ao final da cauda)

Peso: 13 g

Sexo: Fêmea

Crotalus durissus terrificus - C.d.t. – **Triagem 02 – Filhote 02**

Comprimento real do corpo (CRC): 32,5 cm (da cabeça até a cloaca)

Comprimento total do Corpo (CT): 36,5 cm (da cabeça até ao final da cauda)

Peso: 22 g

Sexo: Macho

Crotalus durissus terrificus - C.d.t. – **Triagem 03 – Filhote 03**

Comprimento real do corpo (CRC): 30 cm (da cabeça até a cloaca)

Comprimento total do Corpo (CT): 33 cm (da cabeça até ao final da cauda)

Peso: 19 g

Sexo: Macho

Guizo 02- Mãe 02– sem o guizo primordial

Espécie: *Crotalus durissus terrificus* - C.d.t.- 0805

Mãe da ninhada: 02

Procedência: Itu-SP

Data de entrada: 24/01/2008.

Peso: 475 g. Após o parto

Comprimento real do corpo (CRC): 88,5cm (da cabeça até a cloaca)

Comprimento total do Corpo (CT): 96cm (da Cabeça até ao final da cauda)

Data do nascimento da ninhada: 25/02/2008.

Ninhada: *Crotalus durissus terrificus* – C.d.t. -0806-00

Observações: cinco filhotes da mesma mãe

Crotalus durissus terrificus - C.d.t. – **0806-01 – Filhote 01**

Comprimento real do corpo (CRC): 30 cm (da cabeça até a cloaca)

Comprimento total do Corpo (CT): 32 cm (da cabeça até ao final da cauda)

Peso: 27 g

Sexo: Fêmea

Crotalus durissus terrificus - C.d.t. – **0806-02 – Filhote 02**

Comprimento real do corpo (CRC): 32,5 cm (da cabeça até a cloaca)

Comprimento total do Corpo (CT): 35 cm (da cabeça até ao final da cauda)

Peso: 23 g

Sexo: Fêmea

Crotalus durissus terrificus - C.d.t. – **0806-03 – Filhote 03**

Comprimento real do corpo (CRC): 31 cm (da cabeça até a cloaca)

Comprimento total do Corpo (CT): 34 cm (da cabeça até ao final da cauda)

Peso: 22 g

Sexo: Macho

Crotalus durissus terrificus - C.d.t. – **0806-04 – Filhote 04**

Comprimento real do corpo (CRC): 29 cm (da cabeça até a cloaca)

Comprimento total do Corpo (CT): 32 cm (da cabeça até ao final da cauda)

Peso: 17 g

Sexo: Macho

Crotalus durissus terrificus - C.d.t. – **0806-05 – Filhote 05**

Comprimento real do corpo (CRC): 32 cm (da cabeça até a cloaca)

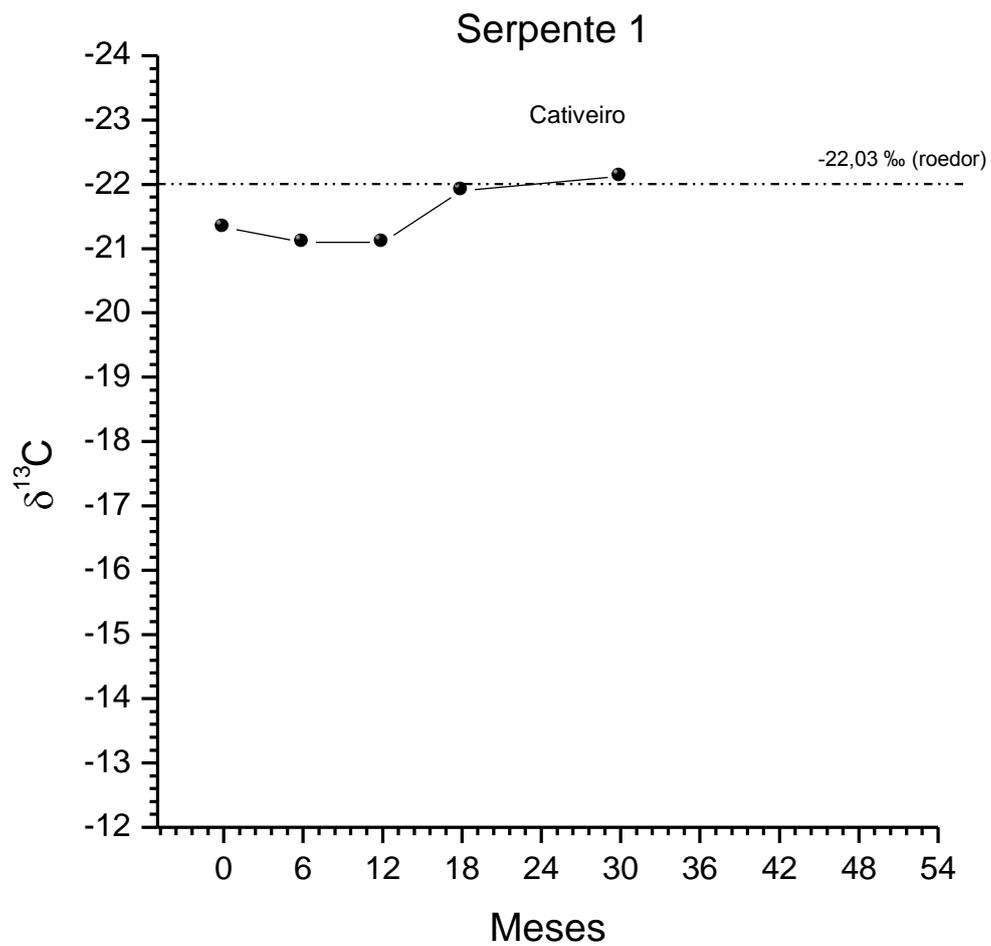
Comprimento total do Corpo (CT): 35,5 cm (da cabeça até ao final da cauda)

Peso: 24 g

Sexo: Macho

Anexo 7:

Resultados das análises do $\delta^{13}\text{C}$ dos guizos das serpentes doadas ao Instituto Butantan que não estão no corpo da dissertação, mas foram estudados e analisados.



Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no guizo da serpente um.

Os valores dos segmentos dos guizos da serpente um são:

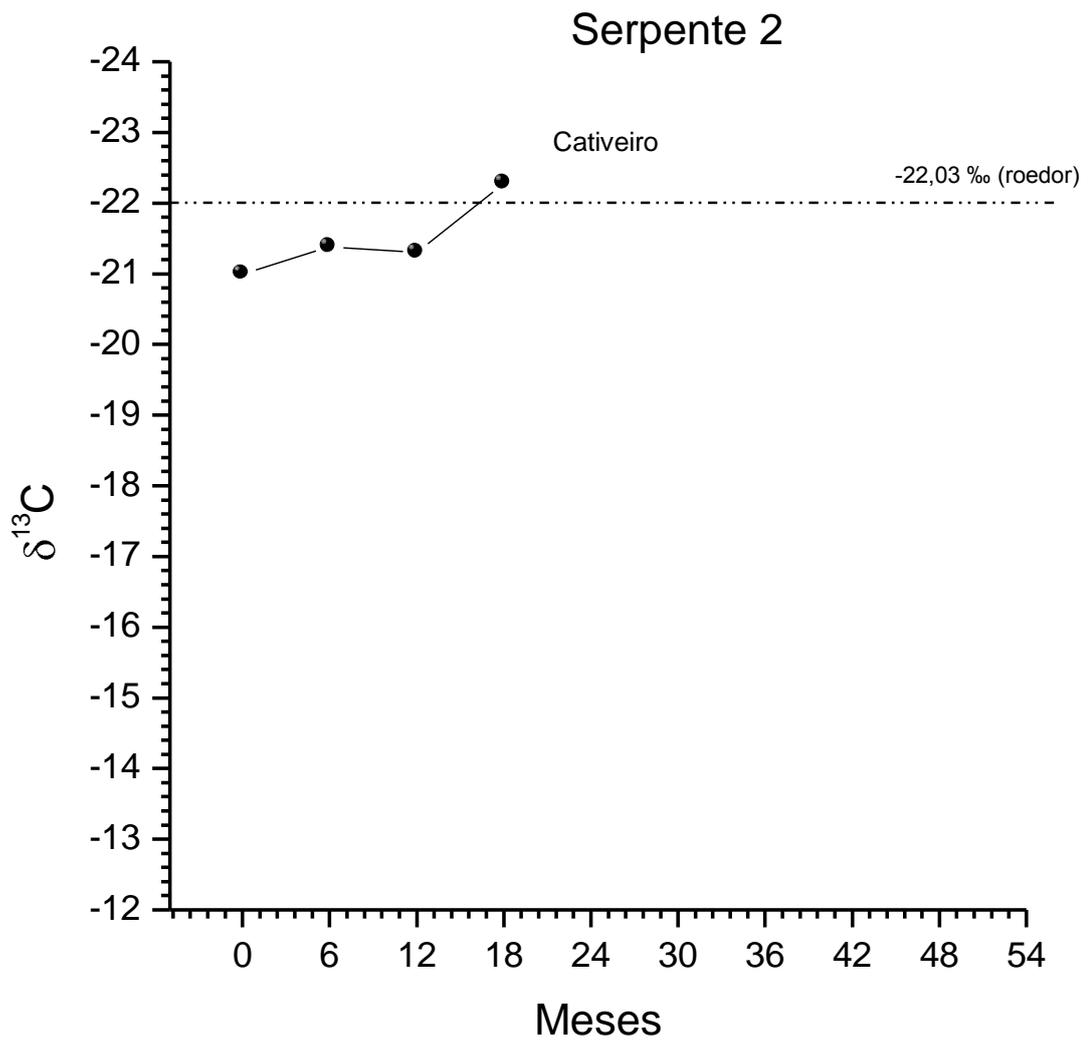
Gomo 1: -21,33‰

Gomo 2: -21,10‰

Gomo 3: -21,10‰

Gomo 4: -21,90‰

Gomo 5: -22,12‰



Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no guizo da serpente dois.

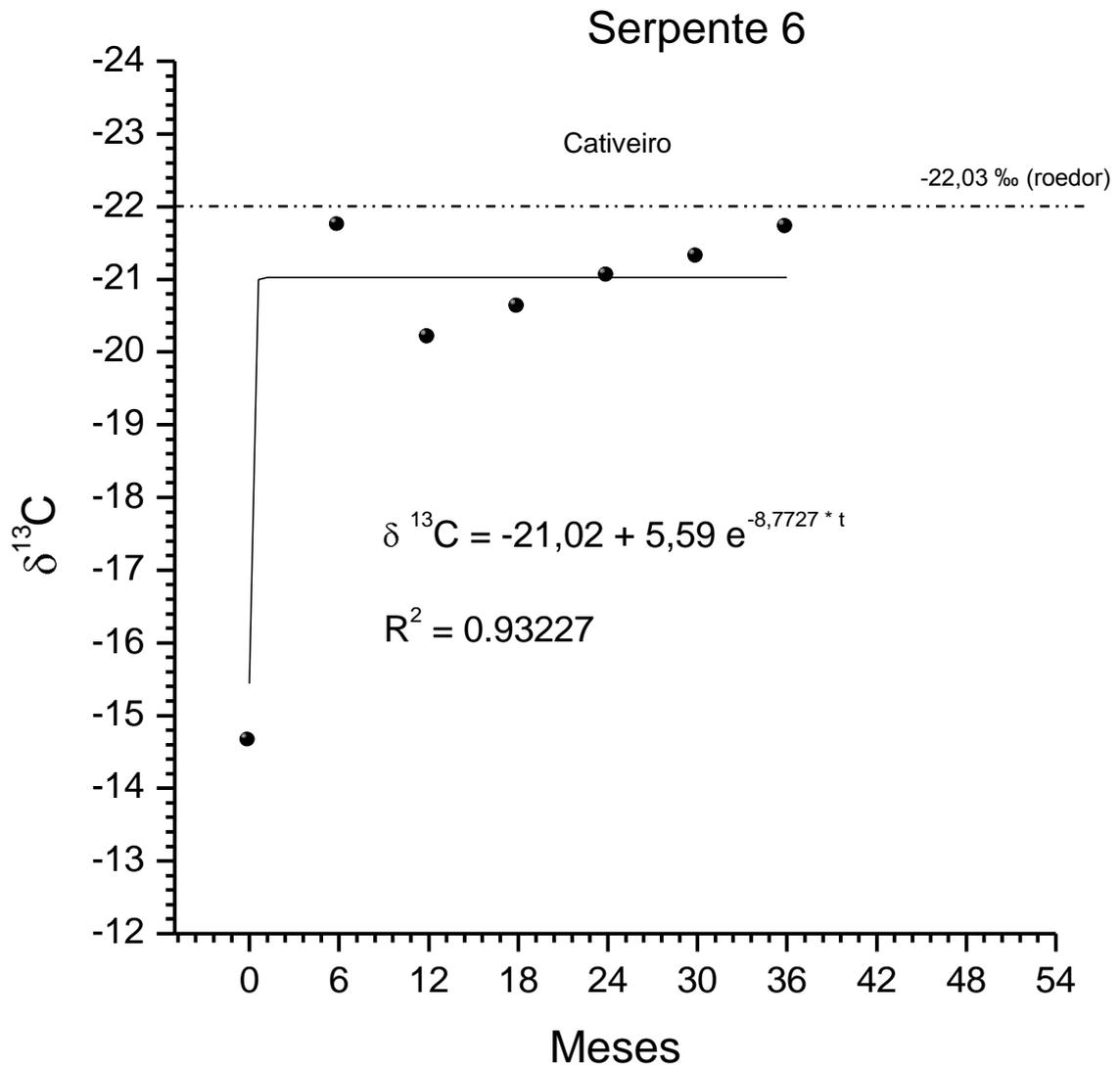
Os valores dos segmentos dos guizos da serpente dois são:

Gomo 1: -21,00‰

Gomo 2: -21,38‰

Gomo 3: -21,30‰

Gomo 4: -22,28‰



Distribuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no guizo da serpente seis.

Os valores dos segmentos dos guizos da serpente seis são:

Gomo 1: -14,64‰

Gomo 2: -21,73‰

Gomo 3: -20,19‰

Gomo 4: -20,61‰

Gomo 5: -21,04‰

Gomo 7: -21,30‰

Gomo 7: -21,71‰

ANEXO 8:

Resultados das coletas de campo por meio das armadilhas de interceptação e queda no Sítio da Moçada em Pardinho, SP. Camundongos (*Mus musculus*) e serpentes (*Crotalus durissus terrificus*).

Início da coleta: 29/04/2008. Término da coleta: 10/08/2008.

Coleta de campo – Camundongos silvestres

01- Camundongo silvestre – campo aberto

Linha 2 – balde 03

Data de coleta – 05/05/2008

Sexo- macho

$\delta^{13}\text{C} = -12,03\text{‰}$

02- Camundongo silvestre – campo aberto

Linha 2 – balde 02

Data de coleta – 10/05/2008

Sexo– fêmea

$\delta^{13}\text{C} = -18,81\text{‰}$

03- Camundongo silvestre – campo aberto

Linha 1 – balde 02

Data da coleta: 29/04/2008

Sexo : macho

$\delta^{13}\text{C} = -15,57\text{‰}$

04- Camundongo silvestre – campo aberto

Linha 01 – balde 02

Data da coleta: 29/04/2008

Sexo: macho

$\delta^{13}\text{C} = -15,05\text{‰}$

05- Camundongo silvestre – campo aberto

Linha 2 – balde 01

Data de coleta: 29/04/2008

Sexo: macho

$\delta^{13}\text{C} = -15,49\text{‰}$

06- Camundongo silvestre – campo aberto

Linha 2 - balde 02

Data da coleta: 29/05/2008

Sexo: macho

$\delta^{13}\text{C} = -11,64\text{‰}$

07- Camundongo silvestre – campo aberto

Linha 1 - balde 03

Data da coleta: 29/05/2008

Sexo: macho

$\delta^{13}\text{C} = -11,72\text{‰}$

08- Camundongo silvestre – campo aberto

Linha 2 balde 02

Data da coleta: 01/06/2008

Sexo: macho

$\delta^{13}\text{C} = -11,43\text{‰}$

09- Camundongo silvestre – campo aberto

Linha 3 - balde 01

Data da coleta: 05/06/2008

Sexo: macho

$\delta^{13}\text{C} = -13,35\text{‰}$

10- Camundongo silvestre – campo aberto

Linha 3 - balde 03

Data da coleta: 10/06/2008

Sexo: macho

$\delta^{13}\text{C} = -11,74\text{‰}$

11- Camundongo silvestre – campo aberto

Linha 3 - balde 02

Data da coleta: 08/05/2008

Sexo: macho

$\delta^{13}\text{C} = -11,56\text{‰}$

12- Camundongo silvestre – campo fechado

Linha 5 - balde 01

Data da coleta: 10/06/2008

Sexo: fêmea

$\delta^{13}\text{C} = -12,16\text{‰}$

13- Camundongo silvestre – campo aberto

Linha 2 - balde 01

Data da coleta: 07/07/2008

Sexo: macho

$\delta^{13}\text{C} = -18,65\text{‰}$

14- Camundongo silvestre – campo fechado

Linha 5 - balde 03

Data da coleta: 15/07/2008

Sexo: fêmea

$\delta^{13}\text{C} = -12,75\text{‰}$

15- Camundongo silvestre – campo aberto

Linha 3 - balde 04

Data da coleta: 21/06/2008

Sexo: macho

$\delta^{13}\text{C} = -11,96\text{‰}$

16- Camundongo silvestre – campo aberto

Linha 1 - balde 03

Data da coleta: 10/07/2008

Sexo: macho

$\delta^{13}\text{C} = -11,22\text{‰}$

17- Camundongo silvestre – campo aberto

Linha 1 - balde 3

Data da coleta: 10/07/2008

Sexo: macho

$\delta^{13}\text{C} = -11,49\text{‰}$

Coleta de campo – guizos de *Crotalus durissus terrificus* – C.d.t.

Guizo 01

Espécie: *Crotalus durissus terrificus* – C.d.t.

Procedência: “Sítio da Moçada” – Milton Bruder

Lavoura – Pardinho -SP

Data de coleta: 24/05/2008

Linha 5 balde 02

Sexo: Fêmea

Gomo 1- $\delta^{13}\text{C} = -12,57\text{‰}$

Gomo 2 - $\delta^{13}\text{C} = -11,50\text{‰}$

Observação: Coletados na natureza – 02 gomos como primordial

Guizo 02

Espécie: *Crotalus durissus terrificus* – C.d.t.

Procedência: “Sítio da Moçada” – Milton Bruder

Lavoura – Pardinho -SP

Data de coleta: 07/06/2008

Linha 4 balde 03

Sexo: macho

Gomo 1 - $\delta^{13}\text{C} = -19,57\text{‰}$

Gomo 2 - $\delta^{13}\text{C} = -16,57\text{‰}$

Observação: Coletados na natureza - 02 gomos com o primordial

Guizo 03

Espécie: *Crotalus durissus terrificus* – C.d.t.

Procedência: “Sítio da Moçada” – Milton Bruder

Lavoura – Pardinho -SP

Data de coleta: 26/07/2008

Linha 4 balde 01

Sexo: macho

Gomo 1 - $\delta^{13}\text{C} = -13,89\text{‰}$

Gomo 2 - $\delta^{13}\text{C} = -11,59\text{‰}$

Observação: Coletados na natureza - 02 gomos com o primordial

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)