

Estudo da Herpetofauna Brasileira

Daiane Patricia Oldiges
(Organizadora)



 **Atena**
Editora

Ano 2018

Daiane Patricia Oldiges
(Organizadora)

Estudo da Herpetofauna Brasileira

Atena Editora
2018

2018 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Geraldo Alves e Natália Sandrini

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall'Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Profª Drª Juliane Sant'Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

E82 Estudo da herpetofauna brasileira [recurso eletrônico] / Organizadora Daiane Patricia Oldiges. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2018.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
ISBN 978-85-85107-61-1
DOI 10.22533/at.ed.611182310

1. Anfíbios – Ecologia – Brasil. 2. Répteis – Ecologia – Brasil.
3. Zoologia. I. Oldiges, Daiane Patricia.

CDD 591.5

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

O conteúdo do livro e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2018

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

www.atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A herpetologia trata do ramo da zoologia responsável pelo estudo de répteis e anfíbios, abordando temas como classificação, fisiologia e comportamento, entre outros. Atuando tanto como presa quanto como predador na complexa rede de interações ecológicas, os répteis e anfíbios são fundamentais para o funcionamento adequado dos ecossistemas - aquático e terrestre.

Dentro da herpetologia, o estudo ecológico de répteis e anfíbios é um campo bastante amplo, no qual são analisadas características como interações sociais, comportamento no ambiente, distribuição e conservação das espécies. Tais animais são capazes de povoar uma ampla gama de ambientes, com grande variedade de concentração de solutos, temperatura e fontes de alimentos. Por serem bastante sensíveis a alterações nos mesmos, em sua grande maioria decorrentes da intervenção humana, e dada a grande área de povoamento se tornam importantes bioindicadores ambientais.

Estudar esses organismos é fundamental para promover sua conservação, e, conseqüentemente, a manutenção do equilíbrio do ecossistema como um todo. Não devemos, no entanto, esquecer do impacto direto que a pesquisa de répteis e anfíbios exerce sobre o desenvolvimento do estudo científico. Estes animais apresentam um grande potencial biotecnológico, tendo em vista que as secreções por eles produzidas são uma inestimável fonte de novas moléculas, ou mesmo de análogos de moléculas já existentes, que podem auxiliar o desenvolvimento de novos fármacos.

A presente obra se trata de uma coletânea de textos, e apresenta em seus 6 capítulos novas informações na área de herpetologia, tendo como foco a ecologia destes animais e o potencial biotecnológico do estudo dos mesmos. Por fim, esperamos que este livro possa colaborar e instigar mais estudantes e pesquisadores na constante busca de novas tecnologias para esta interessante área de conhecimento.

Daiane Patricia Oldiges

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE <i>Dermatonotus muelleri</i> UTILIZANDO OS MÉTODOS DE ELETROFORESE (SDS-PAGE) E ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI-TOF)	
Luiz Humberto Guimarães Riquelme Junior	
Marcos Antonio Ferreira	
Breno Emanuel Farias Frihling	
Fernanda de Cássia Gonçalves Alves	
Paula Helena Santa Rita	
Newton Valério Verbisck	
Ludovico Migliolo	
CAPÍTULO 2	12
EFEITO DA FOSFOLIPASE PRESENTE NA TOXINA DE <i>Bothrops moojeni</i> FRENTE A BIOFILME DE <i>Staphylococcus aureus</i>	
Breno Emanuel Farias Frihling	
Patrícia Souza e Silva	
Guilherme Augusto Abrantes	
Odaias Pereira Almeida Filho	
Elizangela de Barros	
Paula Helena Santa Rita	
Luiz Humberto Guimarães Riquelme Junior	
Ludovico Migliolo	
CAPÍTULO 3	27
EVALUATION OF THE OXIDATIVE STRESS USING BIOMARKER MALONDIALDEHYDE IN ATRETIC EGGS OF BRAZILIAN SNAKES FROM <i>Bothrops</i> genus.	
Poliana Garcia Corrêa	
Giuseppe Puerto	
Daniel da Conceição Rabelo	
Rosely Cabette Barbosa Alves	
Durvanei Augusto Maria	
CAPÍTULO 4	42
NOVOS REGISTROS DE OCORRÊNCIA DE <i>Trachemys dorbigni</i> (Emydidae, Testudines) NO BRASIL	
Juliana Rosa Matias Ciccheto	
Carlos Eduardo Vargas Grou	
Sabine Borges da Rocha	
CAPÍTULO 5	51
HISTÓRIA NATURAL DE <i>HEMIDACTYLUS AGRIUS</i> VANZOLINI, 1978 (SQUAMATA: GEKKONIDAE) EM UMA ÁREA DE CARNAUBAL NO MUNICÍPIO DE ACARAÚ, CE	
Francisco Ageu Ribeiro do Nascimento	
Osmalene Mayara de Souza	
Graziella Macêdo Batista	
Raíla Brena Araújo	
Francisco Robson Carvalho de Oliveira	
Maria Juliana Miranda Silva	
Robério Mires de Freitas	
Amaurício Lopes Rocha Brandão	

CAPÍTULO 6 69

EDUCAÇÃO AMBIENTAL COM OS TURISTAS DO PARNA DE UBAJARA SOBRE A HERPETOFAUNA

Raíla Brena Araújo

Graziella Macêdo Batista

Ingrid Andrade Pereira

Amaurício Lopes Rocha Brandão

SOBRE A ORGANIZADORA..... 77

ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE *Dermatonotus muelleri* UTILIZANDO OS MÉTODOS DE ELETROFORESE (SDS-PAGE) E ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI-TOF)

Luiz Humberto Guimarães Riquelme Junior

Universidade Católica Dom Bosco Campo Grande
– MS

Marcos Antonio Ferreira

Universidade Católica Dom Bosco Campo Grande
– MS

Breno Emanuel Farias Frihling

Universidade Católica Dom Bosco Campo Grande
– MS

Fernanda de Cássia Gonçalves Alves

Universidade Católica Dom Bosco Campo Grande
– MS

Paula Helena Santa Rita

Universidade Católica Dom Bosco Campo Grande
– MS

Newton Valério Verbisck

Embrapa Gado de Corte Campo Grande – MS

Ludovico Migliolo

Universidade Católica Dom Bosco Campo Grande
– MS

RESUMO: A eficácia dos antibióticos no combate a infecções nas primeiras décadas do século XX apresentou sucesso, no entanto, as bactérias adaptam-se às mudanças que ocorrem em seu ambiente de forma rápida, desenvolvendo mecanismos de resistência aos antibióticos convencionais. A biotecnologia propõe novas abordagens por meio da bioprospecção de toxinas de animais, como

anfíbios, a qual pode possibilitar a produção de novos fármacos bioinspirados nas moléculas encontradas e caracterizadas bioquimicamente. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi analisar o perfil proteico da secreção cutânea do anuro *Dermatonotus muelleri* utilizando os métodos de Eletroforese SDS-PAGE e Espectrometria de Massa com matriz ácido sinapínico. O perfil eletroforético demonstrou 16 bandas proteicas onde as majoritárias foram de 205, 30, 14 e 21 kDa. Já o perfil obtido por meio de espectrometria demonstrou quatro peptídeos, onde dois foram relacionados com os resultados observados por eletroforese. Diante dos resultados obtidos concluímos que os dois métodos, apresentou o perfil proteico da secreção cutânea do *D. muelleri*, sendo que cada método com suas características é específico para um determinado espectro de massa molecular. Para SDS-PAGE para visualizar moléculas de alto peso molecular e MALDI-ToF para a detecção das massas moleculares menores que 10 kDa. Isso, portanto não descarta nenhuma das técnicas e o uso de forma complementar aumenta a confiabilidade dos resultados.

PALAVRAS CHAVES: Bioprospecção; Proteína; Anfíbio.

ABSTRACT: The effectiveness of antibiotics to combat infections in the first decades of the

twentieth century was successful, however, bacteria adapt to the changes that occur in their environment quickly, developing mechanisms of resistance to conventional antibiotics. Biotechnology proposes new approaches through the bioprospection of animal toxins, such as amphibians, which may enable the production of new bio-inspired drugs in the molecules found and characterized biochemically. Thus, the objective of this work was to analyze the protein profile of the skin secretion of the anuran *Dermatonotus muelleri* using SDS-PAGE Electrophoresis and Mass Spectrometry with synapinic acid matrix. The electrophoretic profile showed 16 protein bands where the majority were 205, 30, 14 and 21 kDa. The profile obtained by means of spectrometry showed four peptides, where two were related to the results observed by electrophoresis. In view of the obtained results, we conclude that the two methods presented the protein profile of the skin secretion of *D. muelleri*, and each method with its characteristics are specific for a given molecular mass spectrum. For SDS- PAGE to visualize high molecular weight molecules and MALDI-ToF for the detection of molecular masses less than 10 kDa. This therefore does not rule out any of the techniques and the use of complementary form increases the reliability of the results.

KEYWORDS: Bioprospection; Protein; Amphibian.

1 | INTRODUÇÃO

A eficácia dos antibióticos no combate a infecções nas primeiras décadas do século XX teve tanto sucesso que levou a uma confiança quase que total, levando a perspectiva que as infecções seriam resolvidas (GARCIA- REY, 2010). No entanto, as bactérias, assim como os demais seres vivos, adequam-se às mudanças que ocorrem em seu ambiente e um dos resultados é a resistência a antibióticos (PEREIRA, 2015).

Isso Fleming já havia percebido ao descobrir a penicilina em 1929, descobrindo que naturalmente os microrganismos são dotados de resistência aos antibióticos (DRAGO, 2007). Essa resistência funciona via trocas de genes onde alguns microrganismos que adquiriram mutações em seu DNA, devido já ter uma sensibilidade a algum fármaco, transferirão a outros microrganismos incorporando no seu conteúdo genético genes que ajudaram a resistir aos antibióticos (BETANCOURT et al., 2003).

Associado a esse fenômeno está o uso indiscriminado de antibióticos via automedicação da população e dentro dos hospitais, muitas vezes devido a diagnósticos imprecisos ou a medicação intensiva (WANNMACHER, 2004). Isso tem intensificado a seleção de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos existentes. Segundo Behzadnia e colaboradores (2014), mundialmente cerca de 9% dos pacientes hospitalizados são afetados por bactérias que apresentam algum tipo de resistência.

Nessa perspectiva, percebe-se a necessidade de novos fármacos antimicrobianos e, a otimização dos princípios ativos das classes já existentes é de suma importância para o combate de microrganismos patogênicos, algo que a biotecnologia, com ênfase na bioquímica e microbiologia, vem propondo: novas abordagens na produção

de novas alternativas a antibióticos provenientes de produtos naturais como proteínas e/ou peptídeos isolados de toxinas animais como serpentes, escorpiões, insetos, aracnídeos e anfíbios (BRITO; CORDEIRO, 2012).

Atualmente são conhecidas 7.886 espécies de anfíbios no mundo (AMPHIBIAWEB, 2018) tendo o Brasil um lugar de destaque na biodiversidade desses animais com 1080 espécies distribuindo-se em 36 Gymnophiona, cinco Caudata e 1039 Anura (SEGALLA et al., 2016). A pele dos anfíbios desempenha funções extremamente importantes para sua sobrevivência em diversos nichos ecológicos, como a respiração, regulação hídrica, excreção, controle de temperatura, dimorfismo sexual, camuflagem, entre outros (CLARKE, 1997), sendo considerados excelentes bioindicadores ecológicos da qualidade do ambiente (STEBBINS; COHEN, 1995; SILVA, 2004). Além disso, a secreção de suas peles demonstra grande diversidade molecular que podem lisar fungos, vírus, protozoários e bactérias que entram em contato com sua pele, permitindo uma proteção química contra esses microrganismos e também predadores (SIMMACO et al., 2009).

O estudo da composição das secreções glandulares de anfíbios não é recente. Segundo Habermehl e colaboradores (1981), desde a década de 80 esses compostos vêm sendo estudados. De acordo com Clarke (1997) e Tyler e colaboradores, (1992) a diversidade de substâncias bioativas encontradas nas secreções cutâneas dos anfíbios inclui além de esteróides e alcalóides, peptídeos bioativos com propriedades antimicrobianas.

Estão presentes também as aminas biogênicas: adrenalina, noradrenalina e dopamina (JARED et al., 2009). Além da atividade antimicrobiana, do ponto de vista farmacológico, esses compostos podem também apresentar efeitos: miotóxicos, neurotóxicos, cardiotoxicos, hemotóxicos, colinomiméticos ou simpatomiméticos e vaso constritores sobre mamíferos de pequeno porte (HABERMEHL, 1981; JARED et al., 2009).

As espécies da família Microhylidae, cujo *Dermatonotus muelleri* faz parte, possuem ampla diversidade morfológica e comportamental tendo como exemplo do próprio *D. muelleri* o nicho fossório. O focinho pontiagudo e a capacidade de movimentar a cabeça para cima e para baixo permite ao animal realizar escavações, além das patas robustas e o corpo arredondado (formato “*orbe-like*”), diferente de outros microhylídeos como do gênero *Elachistocleis*, facilitam a escavação. *Dermatonotus muelleri* é a única espécie do gênero encontrada na América do Sul, tem uma reprodução explosiva, frequentemente com os machos vocalizando por cinco dias em todo o período reprodutivo. Esta espécie apresenta resistência e conseguem sobreviver em temporadas de secas e escassez de alimentos por meio da sua especialização onde os alimentos são retirados do subterrâneo (NOMURA, 2003).

Estudos feitos com anuros da família Microhylidae são escassos, principalmente com a vertente das secreções cutâneas. Como exemplo, pode ser citado a espécie *Dyscophyus guineti* (sapo tomate), onde foi encontrada em sua secreção cutânea

inibidores de peptidase serínicas tipo Kunitz, representando ser um componente da estratégia para defesa desse animal contra micro e/ou macro predadores (CONLON; KIM, 2000).

Com a resistência dos microrganismos as moléculas bioativas adquiridas da exploração bioquímica cutânea de anfíbios anuros representa alternativa para o desenvolvimento de biofármacos com atividade antimicrobiana. Diante do exposto até o momento esse trabalho teve por objetivo analisar o perfil proteico da secreção cutânea do anuro *Dermatonotus muelleri* e comparar as massas moleculares dos resultados apresentados por meio de SDS-PAGE e MALDI-ToF.

2 | METODOLOGIA

Para esse trabalho, foram utilizados três indivíduos de *Dermatonotus muelleri* (Figura 1) doados por populares e acondicionados no Biotério da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB). Os animais foram mantidos juntos em caixas organizadoras da marca Sanremo® com tamanhos de 38,5 X 37 X 56 cm. A caixa conteve como substrato areia com dimensão fina (125 a 250 μm) uma vez que essa espécie tem um nicho fossório, vegetação artificial e um recipiente de 500 ml com água *ad libitum*. A temperatura foi mantida entre 25 e 27°C e a umidade em torno de 60 a 70%. Para alimentação, foram fornecidos artrópodes da ordem Blattodea.

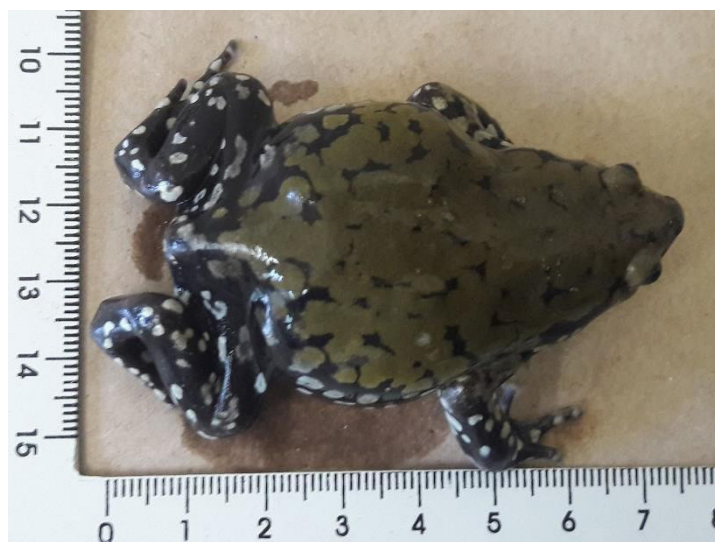


Figura 1. Indivíduo de *D. muelleri* doado ao Biotério/UCDB por populares.

2.1 Extração e obtenção da secreção cutânea

A obtenção da secreção cutânea dos animais foi por meio da eletroestimulação (TYLER et al., 1992) dorsal com uma bateria alcalina de 9V, ligada a dois fios de cobre onde foram tocados no dorso do animal por três vezes sendo cinco segundos cada, fazendo com que por meio da compressão corpórea, estimula-se as glândulas de

veneno, liberando a toxina juntamente com o muco fabricado pelas glândulas mucosas. Toda substância secretada pelo animal foi rapidamente lavada com água Milli-Q até que toda a secreção liberada desprendesse da pele e armazenada em um Becker de 500 mL. Após a extração, a secreção foi transferida para tubos de polietileno de 50 mL e congelados a -80°C (Ultra Freezer) para liofilização.

2.2 Quantificação proteica

Após a liofilização as amostras foram ressuspensas no volume mínimo com água Milli-Q e centrifugadas a 11000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi retirado e armazenado em tubo de polipropileno de 2mL, sendo posteriormente quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

2.3 Perfil eletroforético por SDS-PAGE

A separação das proteínas das toxinas extraídas foi realizada por meio da técnica de eletroforese em SDS-PAGE conforme o método de Laemmli (1970). O gel desnaturante foi preparado nas concentrações de 12%. Para a comparação das massas moleculares, foi utilizado o marcador padrão da PROMEGA[®] (*The Broad Range Protein Molecular Weight Markers*) o qual possui massas moleculares com 205, 116, 97, 80, 66, 55, 45, 30, 21, 14 e 6,5 kDa). A corrida foi realizada nas seguintes condições: 80v, durante aproximadamente 3h. Após o término das corridas, os géis foram corados com a solução de *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Sigma-Aldrich).

2.4 Espectrometria de Massa

O extrato bruto liofilizado foi solubilizado em água Milli-Q, misturados em uma solução saturada de uma matriz constituída por ácido sinapínico (SA), depositado em uma placa do tipo MTP 384 *massive* e secos a temperatura ambiente. Os compostos tiveram suas massas moleculares exatas determinadas, utilizando um espectrômetro de massa do tipo MALDI ToF Smart Bean III (Bruker Daltonics). Os espectros foram calibrados externamente com insulina (5,8 kDa). Os valores de massa molecular obtidos foram plotados em planilha para comparação com os valores experimentais observados em SDS-PAGE.

3 | RESULTADO E DISCUSSÃO

A eletroestimulação leve foi eficiente para a aquisição da secreção dos três *D. muelleri*, onde após a ressuspensão foi obtido 5mL de amostra (Figura 2A), Esse método de extração possibilita que todas as glândulas do animal, mucosas e granulosas, sejam contraídas e estimuladas sem causar lesões, além promover o uso de um indivíduo facilitando a conservação desses animais, uma vez que antigamente eram-se usados

centenas de indivíduos, retirando sua pele para obter a secreção cutânea (KONIG et a., 2015). Além disso, essa extração promoveu pouco manejo do indivíduo diminuindo ainda mais o contato com a mão do manejador. O método convencional de extração, o mecânico, que são massagens feitas no animal a fim de perturba-lo para que saia a secreção, faz com que o manejador tenha muita amostra perdida aderida nas luvas, já a eletroestimulação, onde em seguida o animal é lavado com água, reduz o contato da secreção com as luvas, permitindo perder menos amostras.

Após a extração os animais foram devolvidos ao cativeiro imediatamente onde começaram a escavar e se enterrar, demonstrando nenhuma lesão ou anormalidade em seu comportamento fossório (Figura 2B).



Figura 2. (A) Eletroestimulação branda para aquisição da secreção cutânea de *D. muelleri* por meio de baterias de 9V. (B) Cativeiro semiextensivo do *D. muelleri* com substrato areia (cinco cm de profundidades), vegetação artificial e água *ad libitum*.

Na quantificação proteica pelo método de Bradford, apresentou uma curva de calibração (Figura 3) com cinco pontos e R^2 igual a 0,97. Com a extração utilizando eletroestimulação foi possível obter uma concentração proteica de $190 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

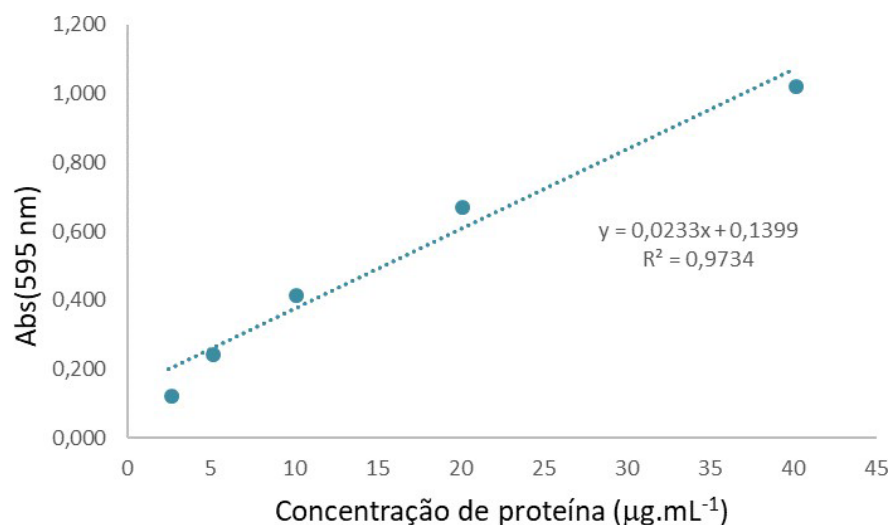


Figura 3. Curva de calibração para quantificação utilizando o método de Bradford, tendo a proteína Albumina como padrão. Os cinco pontos demonstram valores limites para o cálculo do R quadrado. A equação da reta foi utilizada para quantificar as amostras extraídas da secreção cutânea de *D. muelleri*.

Os resultados com SDS-PAGE mostraram 16 bandas proteicas (Figura 4), sendo distribuídas em três zonas de bandejamento proteico: a primeira variando de 55 a 205 kDa, a segunda de 21 a 55 kDa e a terceira abaixo de 21 kDa. As bandas proteicas majoritárias no primeiro grupo foi de 205 kDa. No segundo grupo destacaram-se uma banda de 30 kDa e outra de 50 kDa. No terceiro grupo as mais evidentes foram de 14 e 21 kDa.

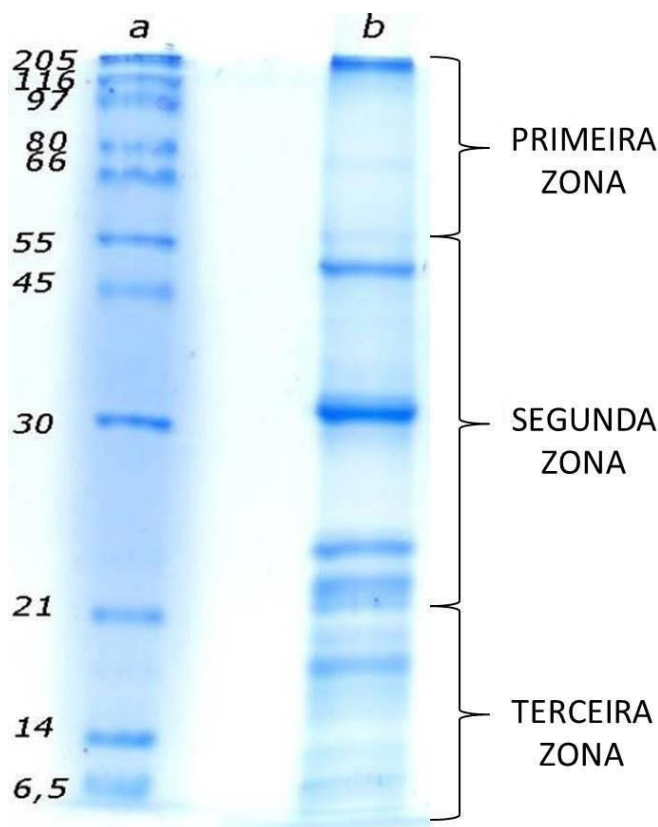


Figura 4. SDS-PAGE 12% corado por *Comanssie Brilliant Blue* e dividido em três zonas de bandejamento proteico: (A) Marcador molecular; (B) Amostra da secreção cutânea de *D. muelleri*, ambos na unidade de kDa.

Na espectrometria de massa os resultados demonstraram quatro massas moleculares de peptídeos sendo 3,13; 3,88; 5,24 e 6,97 kDa os íons que mais se destacaram devido a sua ionização realizada pela matriz ácido sinapínico. Os dois primeiros foram observados no SDS-PAGE, entretanto foi possível visualizar duas massas moleculares menores que 6,5 kDa demonstradas no SDS-PAGE sugerindo que sejam os íons identificados na espectrometria de massa que são o de 5,24 e 6,97 kDa (Figura 5).

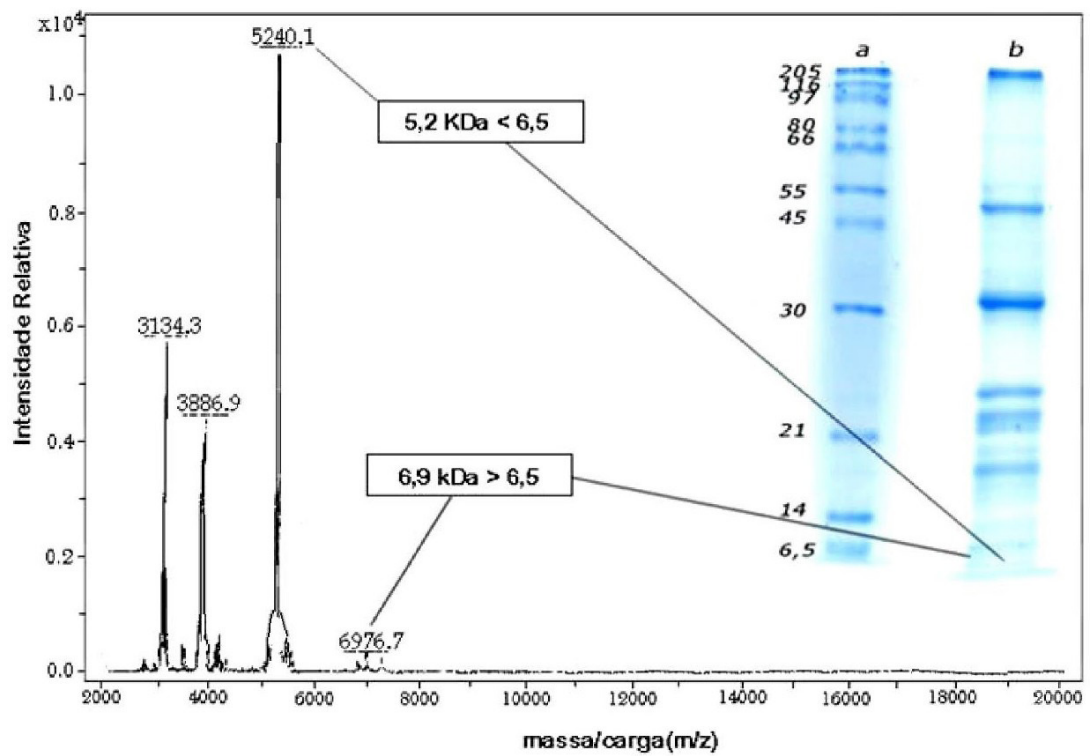


Figura 5. Massas moleculares menores que 6,5 kDa demonstradas no SDS-PAGE, comparada a dois íons identificados na espectrometria de massa da secreção de *D. muelleri*.

Estudos proteômicos com a secreção cutânea de *D. muelleri* são escassos pelo motivo de o nicho dessa espécie dificultar o seu encontro, além de haver uma ausência no banco de dados, recorrendo-se comparar suas massas proteicas com trabalhos realizados com outras classes animais como répteis e/ou com outras famílias de anuros, como Hylidae (Tabela 1).

MASSA TEÓRICA (kDa)	MASSA EXPERIMENTAL (kDa)	
	SDS-PAGE	MALDI ToF
6,1	< 6,5	5,2
6,4		
6,6	> 6,5	6,9
6,7		
8		
10		-
14	14	-
14,4	> 14	-
22	> 21	-
23	> 23	-
44	> 44	-

Tabela 1. Massas moleculares encontradas na literatura (Massa teórica) e comparada com as demonstradas em SDS-PAGE, MALDI-ToF (Massa experimental).

Sendo assim, Cavalcante (2015), demonstrou bandas proteicas da secreção cutânea de *D. muelleri* que variavam entre 110 a 160 kDa. Por meio de banco de

dados, identificou-se que a proteína *Octapeptide Repeat Protein T2* encontrada em *Ophiophagus hannah*, (cobra rei) (STUART et al., 2016) possui massa semelhante. Além disso, Cavalcante comparou as massas demonstradas com uma enzima oriunda da formiga *Harpegnathos saltador*, que codifica o nucleotídeo RHO quanine (Exchange fator 7).

Com esse perfil proteico demonstrado, foi possível comparar com compostos encontrado em anuros da família Hylidae, família de anuro onde ocorre a maior parte dos trabalhos com proteômica nessa vertente. Na terceira zona do SDS- PAGE, as massas próximas a 6,5 kDa podem representar a hylaserpina, um inibidor de tripsina e quimiotripsina com atividade antibacteriana que tem 6,1 kDa, descoberta na secreção cutânea de *Hyla simplex* (WU et al., 2011).

Proteínas chamadas de Kazal possuem massas moleculares em torno de 6,6 e 6,7 kDa e foram encontradas na espécie *Phyllomedusa sauvagii*, são inibidoras de peptidases, bactericida e induz a aglutinação dos eritrócitos (GEBHARD et al., 2004).

4 | CONCLUSÃO

A metodologia de SDS-PAGE não é um método analítico tão eficaz, porém permite estimar rapidamente a quantidade de grupo de proteínas por massa molecular, estando a carga líquida equalizada negativamente (detergente - SDS). Em uma amostra heterogênea com a facilidade de separação e visualização esta técnica permite uma visão geral das massas moleculares. Esta técnica é mais lenta na aquisição de dados, entretanto tem um custo operacional mais econômico quando se trata dos reagentes e equipamentos utilizados. Por outro lado, a espectrometria de massa fornece uma condição altamente precisa e analítica de estimar a massa molecular de proteínas e peptídeos apresentando um resultado rápido, porém com um custo operacional elevado principalmente devido ao custo do equipamento. Diante dos resultados encontrados foi possível concluir que o melhor para aquisição de dados é usar as técnicas aqui descritas em conjunto. As moléculas observadas nas duas técnicas são de extrema importância para a seleção inicial de candidatos para caracterização bioquímica, biofísica e microbiológica com potencial biotecnológico no desenvolvimento de novas ferramentas antimicrobianas.

REFERÊNCIA

AMPHIBIAWEB. **Information on amphibian biology and conservation**. Berkeley, California: Amphibia Web. Disponível em: <<http://amphibiaweb.org/>>. Acesso em: jun. 2018.

BEHZADNIA, S.; DAVOUDI, A.; REZAI, M. S.; AHANGARKANI, F.

Nosocomial infections in pediatric population and antibiotic resistance of the causative organisms in north of Iran. Iranian Red Crescent Medical Journal, Dubai, 2014.

- BETANCOURT, O.; SCARPA, C. VILLAGRÁN, K. **Estudio de resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mantitis subclínica bovina frente a cinco antibióticos em três sectores de la IX region do Chile (Nova técnica)**. FCV-LUZ, v. 13, n. 5, p. 413-417, 2003.
- BRADFORD, M. M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding**. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254, Georgia, 1976.
- BRITO, M. A. De.; CORDEIRO, B. C. **Necessidade de novos antibióticos**. In: Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 48, n. 4, p. 247- 249, 2012.
- CLARKE, B. T. **The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications**. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. v. 72, n. 3, p.365-79, 1997.
- CONLON, J. M.; KIM, J. B. **A Protease Inhibitor of the Kunitz Family from Skin Secretions of the Tomato Frog, *Dyscophus guineti* (Microhylidae)**. Biochem. Bioph. Res. Co. v. 279, n. 3, p. 961-964, 2000.
- DRAGO L. **Epidemiology and mechanisms of resistance: clinical and environmental impact**. Infez Med. v.15, p.6-12, 2007.
- GARCÍA-REY, C. **The role of the pharmaceutical industry. Why aren't new antibiotics being marketed?** In: Enferm. Infec. Microbiol. v. 28, n. 4, p. 45- 49, Elsevier doyma, Espanha, 2010.
- GEBHARD, L. G.; CARRIZO, F. U.; STERN, A. L.; BURGARDT, N. I.; FAIVOVICH, J.; LAVILLA, E.; ERMÁCORA, M. R. **A Kazal prolyl endopeptidase inhibitor isolated from the skin of *Phyllomedusa sauvagii***. Eur. J. Biochem., v. 271, p. 2117–2126, 2004.
- HABERMEHL, G. G. **Amphibia (Amphibians)**. In: Venomous Animals and Their Toxins. cap. 6, p. 112-116, New York, Springer-Verlag Berlin- Heidelberg, 1981.
- JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M. **Anfíbios: biologia e venenos**. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. de S.; WEN, F. H.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD-JUNIOR, V. Animais Peçonhentos no Brasil. 2. ed. cap. 31, p. 317-328. São Paulo, Sarvier, 2009.
- KONIG, E.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; SHAW, C. **The diversity and evolution of anuran skin peptides**. In: Peptides, v. 63 p. 96 – 117, Elsevier, Alemanha, 2015.
- LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. Nature, v. 227, Cambridge, 1970.
- NOMURA, F. **Ecologia reprodutiva e comportamento de forrageio e escavação de *Dermatonotus muelleri* (Boettger, 1885) (Anura, Microhylidae)**. São José do Rio Preto, 2003.
- PEREIRA, J. M; MENEZES, C. D. A; CABRAL, R. F; MENDES, R. C. **Resistência Bacteriana e o Papel do Farmacêutico Frente Ao Uso Irracional de Antimicrobianos**. Revisão Integrativa, Faculdade de Juazeiro do Norte, v.3, n.2, 2015.
- SEGALLA, M. V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GRANT, T.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. de A.; BERNECK, V. M.; LANGONE, J. A. **Brazilian Amphibians: List of Species**. In: Herpetologia Brasileira. v. 5, n. 2, 2016.
- SILVA, J. B. da. **Comportamento reprodutivo, vocalizações e dieta de *Bufo schneideri* Werner, 1894 (Anura, Bufonidae)**. Dissertação (mestrado Biologia). Goiânia, UFG, 2004.
- SIMMACO, M.; KREIL, G.; BARRA, D. **Bombinins, antimicrobial peptides from Bombina species**.

In: Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, v. 1788, n. 8, p. 1551-5, 2009.

STEBBINS, R. C.; COHEN, N. W. **A Natural History of Amphibians**. New Jersey, University Press, 1995.

STUART, B.; WOGAN, G.; GRISMER, L.; AULIYA, M.; INGER, R. F.; LILLEY, R.; CHAN-ARD, T.; THY, N.; NGUYEN, T. Q.; SRINIVASULU, C.; JELIĆ, D.

***Ophiophagus hannah*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3.** 2012.

Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/177540/0>>. Acesso em: 05 de novembro de 2016.

TYLER, M. J.; STONE, D. J. M.; BOWIE, J. H. **A novel method for the release and collection of dermal, glandular secretions from the skin of frogs**. J. Pharm. Toxicol. Methods, 28, 199-200, 1992.

WANNAMACHER, L. **Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida?** Uso racional de medicamentos: temas selecionados, v. 1, n 4. Brasília, 2004.

WU, J.; LIU, H.; YANG, H.; YU, H.; YOU, D.; MA, Y.; YE, H.; LAI, R.

Proteomic analysis of skin defensive factors of treefrog *Hyla simplex*. In: Journal of proteome research, v. 10, n. 9, p. 4230-4240, 2011.

EFEITO DA FOSFOLIPASE PRESENTE NA TOXINA DE *Bothrops moojeni* FRENTE A BIOFILME DE *Staphylococcus aureus*

Breno Emanuel Farias Frihling

Universidade Católica Dom Bosco, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

Patrícia Souza e Silva

Universidade Católica Dom Bosco, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

Guilherme Augusto Abrantes

Universidade Católica Dom Bosco, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

Odaias Pereira Almeida Filho

Universidade Católica Dom Bosco, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

Elizangela de Barros

Universidade Católica Dom Bosco, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

Paula Helena Santa Rita

Universidade Católica Dom Bosco, Biotério UCDB
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

Luiz Humberto Guimarães Riquelme Junior

Universidade Católica Dom Bosco, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

Ludovico Migliolo

Universidade Católica Dom Bosco, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

RESUMO: A capacidade das bactérias de adquirirem multirresistências a antibióticos e de formarem colônias sésseis, denominadas de biofilme, aumentam a morbidade e mortalidade de pacientes internados. Para combater esse problema, uma linha importante de pesquisas ocorre utilizando moléculas naturais, como por exemplo, proteínas presentes na peçonha de serpentes, onde podemos destacar as fosfolipases A2, enzimas capazes de hidrolisar fosfolipídios de membranas. Estas moléculas apresentam atividades como: antiviral, antifúngica, antibacteriana e antitumoral. O objetivo deste trabalho foi purificar uma fosfolipase A2 (PLA2) da toxina de *Bothrops moojeni*, avaliando pela primeira vez o seu potencial contra biofilme de *S. aureus* metilicina resistente. A purificação da PLA2 foi realizado por meio de etapas cromatográficas, envolvendo exclusão molecular (Sephacryl S-100) seguida de fase reversa (C-18). A massa molecular, sugerida por SDS-PAGE para a enzima foi de 14 kDa. Todos os passos de purificação foram monitorados por atividade enzimática específica, com o substrato 4N3OBA. De posse da PLA2 purificada, esta foi avaliada contra a bactéria resistente *S. aureus* formadora de biofilme. Com o resultado do bioensaio foi possível detectar uma redução no crescimento bacteriano na concentração de 512 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (36,6 μM). De acordo com resultados obtidos

fica demonstrado pela primeira vez a atividade de uma fosfolipase frente a bactéria formadora de biofilme.

PALAVRAS-CHAVE: *Bothrops*, fosfolipase, atividade antibiofilme.

ABSTRACT: The morbidity and mortality of inpatients are caused due to bacteria skills to acquire antibiotics multidrug resistance to form sessile colonies, called biofilms. To combat this problem, an important line of research is the use of natural molecules, such as proteins present in the snake venom, highlighting to phospholipases A2 (PLA2), enzymes capable of hydrolyzing phospholipid membranes. In the literature PLA2 from snake venom demonstrated activities against antiviral, antifungal, antibacterial and antitumor. Therefore the objective of this work was to purify a PLA2 from *Bothrops moojeni* toxin, evaluating for the first time its potential against methicillin resistant *S. aureus* biofilm. Purification of PLA2 was performed by chromatographic steps, involving molecular exclusion (Sephacryl S-100) followed by reverse phase (C-18). The molecular mass suggested by SDS-PAGE for the enzyme was 14 kDa. All purification steps were monitored by enzymatic activity, with the specific substrate 4N3OBA. Lastly, the purified PLA2, was evaluated against the biofilm *S. aureus* bacteria. The bioassay results showed clear reduction in biofilm development in the concentration 512 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (36.6 μM). In conclusion, the activity of PLA2 purified was effectiveness against the biofilm forming bacteria being demonstrated for the first time.

KEY-WORDS: *Bothrops*, phospholipase, activity antibiofilm.

1 | INTRODUÇÃO

Atualmente, a crescente emergência de cepas bacterianas multirresistentes a fármacos, bem como a capacidade de formarem biofilme (também denominadas de bactérias sésseis, que formam comunidades multicelulares aderentes a superfícies), tornaram-se uma preocupação de saúde em nível global (PERUMALSAMY et al., 2014). Além disso, as bactérias do gênero *Staphylococcus* estão entre os principais agentes etiológicos associados a infecções adquiridas no ambiente hospitalar, em superfícies abióticas e bióticas, podendo estar associadas a dispositivos médicos (BOLES; HORSWILL, 2011).

Enfatizando, *S. aureus*, uma bactéria patogena oportunista, Gram-positiva, anaeróbio facultativo, responsável por causar um amplo espectro de infecções agudas e crônicas, incluindo infecções de pele, bacteremias, pneumonias, meningites, abscessos, entre outros (QU et al., 2010).

Os mecanismos envolvidos no processo de formação de biofilme podem ser agrupados como resistência adaptativa (SCHROEDER et al., 2017), resistência inata ou, de maior preocupação para a prática clínica e agrícola moderna; e resistência adquirida com a transferência horizontal de genes (ANDERSSON; HUGHES, 2011; FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012). Muitas teorias têm sido propostas com relação

à dinâmica de formação de um biofilme, mas algumas etapas fundamentais são concordantes em todas elas, sendo as principais: contato, adesão, formação de micro colônias, maturação e desprendimento (O'TOOLE et al., 2000). Essas etapas são dependentes da influência do meio ambiente e das características genéticas das bactérias (O'TOOLE et al., 2000).

Com frequência, bactérias de uma mesma comunidade de biofilme bacteriano possuem diferentes doses inibitórias mínimas a antibióticos oferecendo capacidade aos patógenos oportunistas permanecerem como agentes infectantes por longo tempo (ITO et al., 2009). Dados relacionados a ensaios *in vitro* têm indicado que células bacterianas em biofilmes (sésseis) podem se tornar substancialmente mais resistentes à ação de antibióticos do que aquelas cultivadas de forma planctônica (SMITH et al., 2011). Isso é preocupante porque a formação de biofilmes microbianos podem ocorrer tanto em superfícies naturais como artificiais, como dentes, lentes de contato, válvulas cardíacas (causando endocardite), pulmões de pacientes com fibrose cística (causando broncopneumonia crônica), ouvido médio em pacientes com otite média crônica, próteses articulares, cateteres intravenosos e em feridas crônicas (HØIBY et al., 2010).

Até o presente momento, a saúde pública e privada vem sofrendo com patógenos oportunistas e, as consequências da resistência são facilmente mensuradas em termos financeiros e quantidade de óbitos (ACAR, 1997), apresentando dados alarmantes e estima-se que até 2050 a mortalidade causada por bactérias supere o câncer (WHO, 2012). Em contrapartida, vários laboratórios estão pesquisando alternativas para o combate e controle de patógenos. A partir disso, os animais apresentam-se como fontes de moléculas bioativas, principalmente os que possuem toxinas.

A biodiversidade, particularmente disponível no Brasil, expõe a valiosa oportunidade de pesquisar moléculas farmacologicamente ativas e pode permitir o acesso a soluções para patologias (RODRIGUES et al., 2007). Nos últimos anos, novas classes de antibióticos, incluindo proteínas de animais e peptídeos antimicrobianos, têm sido investigados como uma alternativa para vários problemas, como a resistência microbiana (MATSUZAKI et al., 1997). Como exemplo de possíveis aplicações, o veneno das serpentes apresenta atividades como: antibacteriano (RODRIGUES et al., 2009; SILVEIRA et al., 2013; PERUMALSAMMY et al., 2014); antitumoral (RODRIGUES et al., 2007; BURIN et al., 2013; AZEVEDO et al., 2016); antiviral (MULLER et al., 2014); antiparasitário (DEOLINDO et al., 2012; ADADE et al., 2011).

O veneno das serpentes peçonhentas, é composto majoritariamente por proteínas, representando 90% do peso seco, aproximadamente, e, a fração não proteica é representada por carboidratos, lipídeos, metais, aminas biogênicas e nucleotídeos (CARDOSO et al., 2003). Segundo Fry e colaboradores, é possível observar uma alta especialização da glândula de veneno nas serpentes do gênero *Bothrops*, onde encontra-se uma grande variedade de famílias protéicas, por exemplo: Metaloproteases, seriono peptidases, L-aminoácido oxidases, desintegrinas, lectinas

tipo-C, e fosfolipases A2 (PLA2) (FRY et al., 2003).

Para as serpentes do gênero *Bothrops*, é possível encontrar PLA2 com abundância e, além da hidrólise de fosfolídeos, é observado efeitos antiplaquetários, anticoagulantes, inflamatórios, hemolíticos, cardiotoxico, neurotóxico, convulsivo e formador de edema (KINI, 2003). *Bothrops moojeni*, popularmente conhecida como caíçaca, é uma das principais serpentes que acomete acidente nas áreas em que ocorre (CAMPBELL; LAMAR, 2004). Sua distribuição geográfica compreende áreas de cerrado das regiões Sudeste e Centro-Oeste e pode ser encontrada também no Nordeste e Sul do Brasil (LIRA-Da-SILVA et al., 2009).

Devido as mais diversas atividades farmacológicas, o presente trabalho tem como objetivo purificar e caracterizar uma fosfolipase presente no veneno da serpente *Bothrops moojeni*, verificando sua atividade contra *Staphylococcus aureus* formador de biofilme.

2 | METODOLOGIA

Material biológico

Amostras de veneno foram extraídas de exemplares adultos de *B. moojeni*, cedidos pelo Biotério da Universidade Católica Dom Bosco e denominado de extrato bruto (EB). O armazenameto do EB foi realizado em freezer (-20 °C) para as análises posteriores.

Quantificação

As proteínas presentes na peçonha foram quantificadas a partir do método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Nesta técnica, a interferência das proteínas com absorbância do corante Comassie Brilliant Blue G-250 em meio altamente ácido resulta em modificação proporcional da cor detectável em um comprimento de onda 595 nm.

Eletoforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A massa molecular da peçonha e das frações em adição com o grau de pureza da proteína purificada, foram estimadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, nas concentrações de 12% para o gel separador e 5% para o gel empilhador, na presença de SDS, a partir da metodologia descrita por Laemmli (1970). Para essa finalidade, as amostras foram diluídas em tampão da amostra (reduztor) 2x (Tris-HCl 1 M pH 6,8; glicerol 30%, SDS 9%; azul de bromofenol 1%, β -mercaptoetanol 20%), sem processo de incubação. A corrida foi realizada com voltagem constante (75 V), por aproximadamente 2 horas conduzidas com tampão de corrida (Tris 25 mM; glicina 0,1 M, SDS 1%; pH 7,6). Em cada poço do gel, foi aplicado 15 μ g de proteína. Para a comparação de peso molecular, foi utilizado o padrão de peso molecular PROMEGA®

(*The Broad Range Protein Molecular Weight Markers*). Após o término das corridas, os géis foram corados com a solução corante de *Comassie Brilliant Blue R-250*, água, metanol e ácido acético, durante 30 min e, logo em seguida, descorados com água destilada, sendo mantidos sobre leve agitação (50 rpm).

Purificação da PLA2

O veneno bruto de *B. moojenii* foi parcialmente purificado, por meio de cromatografia de exclusão molecular. Após a quantificação, foi aplicado 10 mg do veneno bruto, diluído em 1 mL de tampão AMBIC (Tampão bicarbonato de amônia, 50 mM, pH 7,6), em um sistema aberto de cromatografia, contendo 300 mL de resina Sephacryl S100, equilibrada com o mesmo tampão. O fluxo constante de 0,625 mL.min⁻¹ foi utilizado. A detecção foi realizada por meio da leitura da absorbância em 280 nm. Além da exclusão molecular, foi utilizado dois passos de cromatografia de fase reversa em sistema HPLC (coluna analítica - Waters XTerra MS C18, 4.6x250 mm column), usando gradiente linear de 5-95% de acetonitrila em ácido trifluoracético 0,1% (v:v). O fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ foi utilizado. As frações eluídas foram monitoradas a 216 e 280 nm. As frações coletadas foram identificadas e liofilizadas para as análises posteriores.

Atividade fosfolipásica

O protocolo utilizado para a dosagem de PLA2 foi descrito por Holzer e Mackessy (1996), com algumas modificações. A atividade fosfolipásica foi mensurada em uma placa de 96 poços, utilizando o substrato específico ácido 4-nitro-3-octanoyloxybenzóico (4N3OBA, Enzy Life Science, USA). Em cada poço, 200 µL do tampão (10 mM Tris / HCl, 10 mM CaCl₂ e 100 mM NaCl mM, pH 7.8), 20 µL de substrato (1 mg.mL⁻¹ em 100% acetonitrila), 20 µL de água e 20 µL de fosfolipase comercial como controle (SIGMA-ALDRICH, Fosfolipase A2 de pâncreas bovino - P8913). A reação foi incubada por 40 min a 37 °C, e sua absorbância monitorada em 425 nm, durante 150 min em intervalos de leituras de 10 min. Todos os passos de purificação foram monitorados pela atividade enzimática, utilizando uma PLA2. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e representados com desvio padrão.

Atividade antibiofilme

A formação de biofilmes foi obtida utilizando o meio líquido BM2 [fosfato de potássio 62 mM, (NH₄)₂SO₄ 7 mM, MgSO₄ 2 mM, FeSO₄ 10 µM e glicose 0,4%]. Culturas bacterianas de *S. aureus* crescidas durante 18 h em caldo *Mueller-Hinton* (MHB) foi diluída (1:100, v:v) em BM2. Em placas de fundo redondo de 96 poços a cultura foi adicionada com a amostra em diluição em série de 4 a 1024 µg.mL⁻¹, finalizando o experimento em 100 µL e foi incubado por 24 horas a 37 °C. O controle de crescimento negativo continha apenas bactérias e, como controle positivo foi utilizado ciprofloxacino nas mesmas concentrações da amostra. O crescimento de células planctônicas foi avaliado utilizando a absorbância a 600 nm. O meio foi

removido, e os poços da microplaca foram lavados duas vezes com água deionizada. Células aderentes foram coradas com cristal violeta a 0,01% por 20 min. Os poços da microplaca foram lavados duas vezes com água deionizada, secadas ao ar e o cristal violeta aderido a células, foi solubilizado com 110 µL de etanol a 60%. A formação de biofilmes foi obtida utilizando absorvância a 595 nm. Todas as leituras de absorvância foram realizadas com o leitor de microplacas (Bio-Tek Instruments, Inc., United States). Para cada experimento foram realizadas repetições técnicas.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os componentes isolados dos venenos de serpentes em geral podem servir de base para o entendimento das funções desses constituintes ao relacionar a processos fisiopatológicos em um envenenamento, assim como aplicações biotecnológicas. A escolha da metodologia apropriada para a purificação de uma determinada molécula deve ser direcionada de acordo com suas características. Conhecendo essa informação, o processo de cromatografia tende a facilitar a purificação desejada (STÁBELI et al., 2012).

No presente trabalho, três etapas cromatográficas foram utilizadas para isolar a fosfolipase de interesse: cromatografia de exclusão molecular (tampão de bicarbonato de amônia pH 7,8) e cromatografia de hidrofobicidade em sistema *HPLC*. Na primeira etapa cromatográfica, foi possível observar 5 frações principais, sendo a fração 3 alvo do estudo, pois além de apresentar atividade específica, apresentou em SDS-PAGE massa molecular relativo a outras fosfolipases descritas na literatura.

Após este primeiro passo cromatográfico, a fração escolhida foi submetida a um passo de purificação por *HPLC*, onde as novas frações foram coletadas e monitoradas *in vitro* pela atividade. Nesta segunda etapa cromatográfica, foi possível observar a presença de 4 frações, denominadas 3.1, 3.2, 3.3 e 9. Os passos cromatográficos adotados para o presente estudo foram similares aos observados nos trabalhos de Kanashiro e colaboradores (2002) e Ponce-Soto e colaboradores (2007).

A análise eletroforética do extrato bruto em gel de poliacrilamida foi realizada, obtendo-se 8 bandas de aproximadamente 15; 20; 25; 30; 35; 50; 70 e 110 kDa. A fim de realizar uma breve caracterização do perfil proteico do extrato bruto do veneno de *B. moojeni*, podemos observar bandas que indicam a presença de: Fosfolipases (15 kDa) (MOURA et al., 2014); Serinoproteases e lectinas tipo C (de 20 a 30 kDa) (NOLTE et al., 2012); L aminoácidos oxidases (subunidades de aproximadamente 50 kDa) (STÁBELI et al, 2007); Metaloproteases de todas as classes (KAYANO et al, 2015), entre outros grupos de proteínas.

Purificação da PLA2

Após a quantificação proteica (pelo método de Bradford), 10 mg da amostra, diluídos em 1 mL do tampão de eluição (50 mM de bicarbonato de amônio, pH 7,8)

foram aplicados. Foram coletados 2,5 mL por tubo, totalizando 120 tubos em cada cromatografia realizada (Figura 01). O extrato bruto do veneno apresentou um perfil de exclusão molecular com 5 frações diferentes, conforme indicado na figura 01.

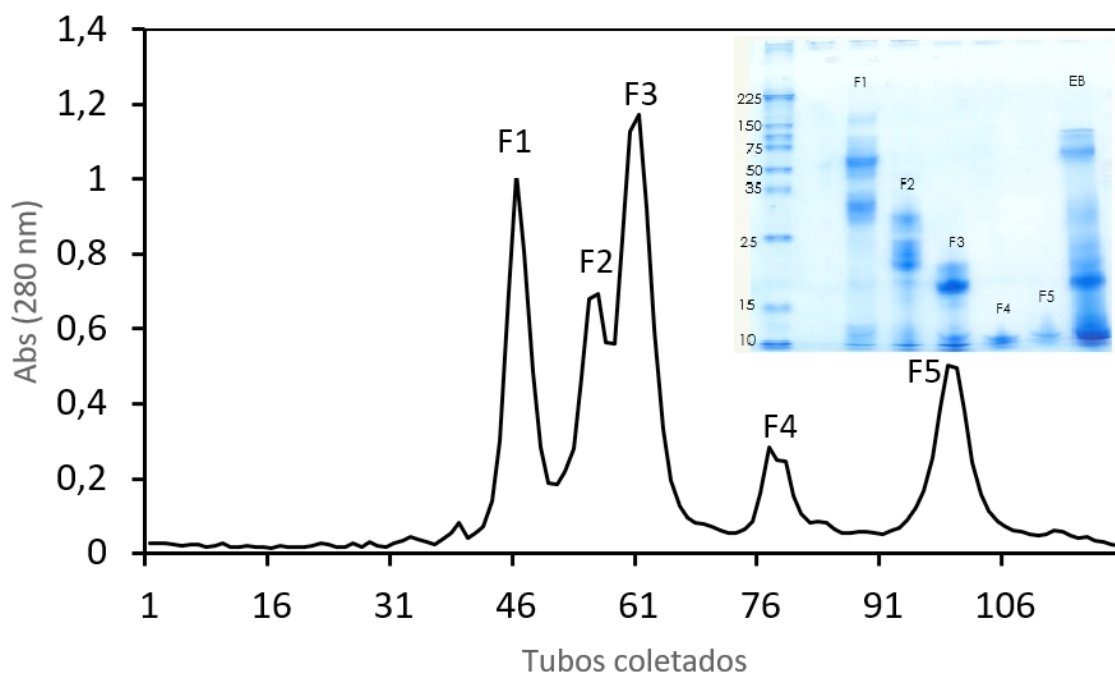


Figura 01. Perfil cromatográfico do EB de *B. moojeni* após a eluição em uma coluna de Sephacryl S-100 (3 x 45 cm). Coluna previamente equilibrada com a solução tampão de eluição (50 mM AMBIC) com um fluxo de 0,625 mL.min⁻¹, obtendo 5 frações (F1, F2, F3, F4 e F5). Todas as frações foram aplicadas em gel de poliacrilamida para validar a metodologia de exclusão molecular.

As 5 frações obtidas por exclusão molecular foram denominadas de F1, F2, F3, F4 e F5 com tempos de eluição de 110, 140, 150, 190 e 237 minutos. Esses resultados são semelhantes quando comparados ao trabalho de Ponce-Soto et al. (2007), onde uma cromatografia de exclusão molecular em sistema fechado, foi realizada com a finalidade de purificar uma fosfolipase da toxina de *B. alternatus*, utilizando a resina Superdex 75, obtendo 4 frações onde os tempos de eluição das frações foram 70, 95, 130 e 140 minutos, e a fração utilizada pela maior atividade de fosfolipase foi a terceira, de 130 minutos de eluição (PONCE-SOTO et al., 2007).

No presente trabalho, a presença de fosfolipase foi observada na fração 3 da cromatografia de exclusão molecular, inicialmente indicada apenas pela massa aproximada, por SDS PAGE (Figura 01) (massa molecular um pouco abaixo de 15 kDa) e posteriormente comprovada por atividade enzimática com substrato específico (Figura 04). Por conta disso, a fração 3 foi a escolhida para ser aplicada em cromatografia de fase reversa.

A cromatografia de fase reversa pode separar as moléculas de acordo com as diferenças na hidrofobicidade, a partir dos passos de eluição. Com isso, F3, uma das frações resultantes do primeiro passo cromatográfico, foi escolhida para ser aplicada no sistema de HPLC (Figura 02). A presença de quatro frações, com diferentes tempos de eluição, variou de acordo com a concentração de acetonitrila (3.1: 42; 3.2: 45,4; 3.3:

49,7 e 3.4: 52,2% de acetonitrila). Após as cromatografias, as frações obtidas foram liofilizadas e armazenadas.

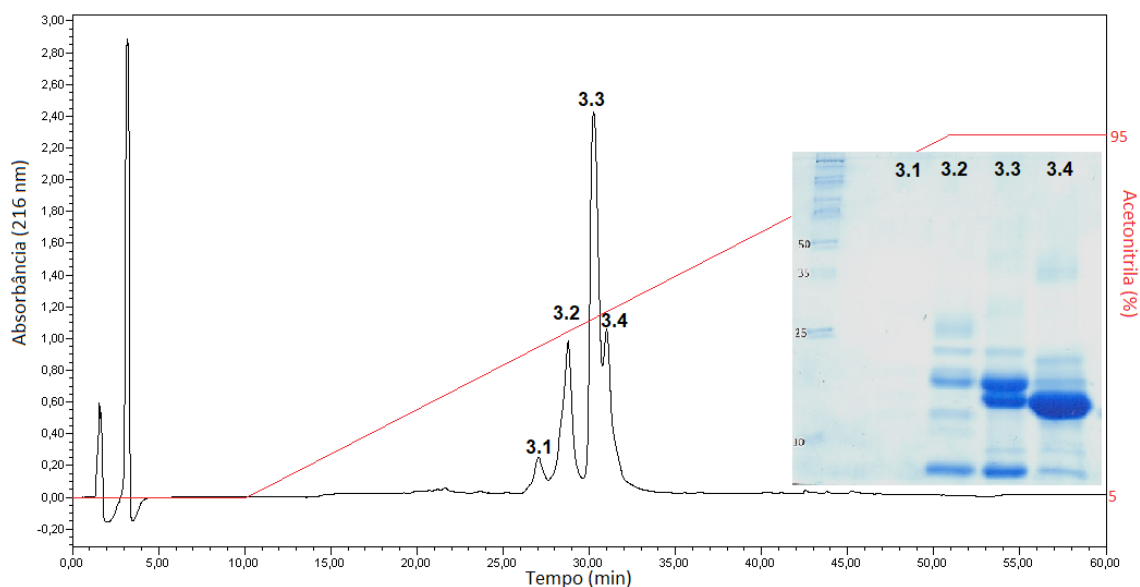


Figura 02. Perfil cromatográfico da fração 3 após a exclusão molecular da toxina de *B. moojeni*, em uma coluna C-18 (HPLC) equilibrada com água e 0,1% de ácido tricloroacético, eluído sobre um gradiente de 5 a 95% de acetonitrila e 0,1% de ácido tricloroacético. As frações obtidas após esse processo, foram denominadas de 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4. Todas as frações obtidas foram aplicadas em SDS-PAGE a fim de verificar o grau de pureza das mesmas.

Para verificar a pureza das frações após a primeira passagem na coluna C-18, foi realizada uma aplicação das frações coletadas em SDS-PAGE (figura 03), onde foi possível observar a presença de bandas abaixo de 25 kDa e, mais especificamente, a presença de uma banda majoritária na fração 3.4, com aproximadamente 14 kDa, quando comparado ao marcador, indicando a presença de uma fosfolipase.

Como mencionado anteriormente, a porcentagem de acetonitrila necessária para a eluição da fração 3.4 foi de 52,2%. A fosfolipase BaTX foi obtida com 49% de acetonitrila após um processo de cromatografia de fase reversa (PONCE-SOTO et al., 2007). Após um único passo cromatográfico (fase reversa), Ponce-Soto et al. (2007) obtiveram uma fosfolipase, denominada BaTXII, do veneno de *B. alternatus*, apresentando 52% de acetonitrila para sua eluição (PONCE-SOTO et al., 2007). Para purificar duas fosfolipases do veneno de *B. atrox*, Kanashiro et al. (2002) observaram a eluição das moléculas com 50% (BaPLA2I) e 54% (BaPLA2III) de acetonitrila (KANASHIRO et al., 2002).

Toyama e colaboradores (2014) obtiveram uma fosfolipase do veneno de *C. durissus*, em aproximadamente 14 kDa, onde mostrou uma eluição com aproximadamente 54% de acetonitrila (TOYAMA et al., 2014). Após dois processos cromatográficos, ambos de fase reversa, foi obtida uma fosfolipase, apresentando 55% de acetonitrila para eluição. Esta molécula foi purificada do veneno de *B. asper* (CASTILLO et al., 2012).

Uma fosfolipase, denominada crotoxina B, presente no veneno de *C. durissus*, foi purificada a partir de uma cromatografia de exclusão seguida por cromatografia de

fase reversa, apresentando 54% de acetonitrila para eluição (QUINTANA et al., 2012). Para purificar Lys-49, uma fosfolipase presente no veneno de *B. pauloensis*, foram utilizados dois passos cromatográficos onde a molécula alvo tinha aproximadamente 14 kDa, necessitando 47% de acetonitrila para a sua eluição (AZEVEDO et al., 2016). Segundo Moura e colaboradores (2014), foi possível eluir uma fosfolipase com 47% de acetonitrila, a Asp49, que foi purificada da toxina de *B. mattogrossensis*. Aproximadamente 80% de acetonitrila foi utilizada para eluir uma fosfolipase do veneno de *B. jararacussu*, uma porcentagem maior se comparada com as outras citadas (MOURA et al., 2014).

Após o segundo passo cromatográfico, a fração 3.4 foi recromatografada para obtenção de uma fração pura (Figura 03). A cromatografia consistiu no mesmo processo previamente adotado, com concentração de acetonitrila variando de 5-95%, a única diferença foi no tempo adotado para a eluição. Após este terceiro passo cromatográfico, as frações foram recolhidas e liofilizadas.

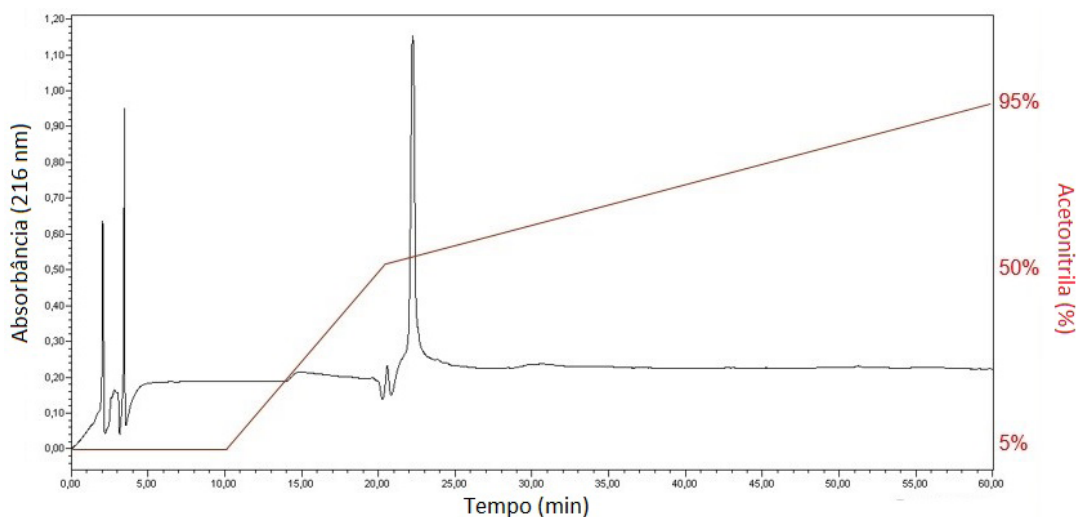


Figura 03. Cromatograma da fração 3.4, definido como recromatografia, a fim de obter uma fração pura. A porcentagem de acetonitrila observada no tempo retenção foi de 52%.

Todos os passos cromatográficos realizados foram monitorados com sua atividade enzimática específica para fosfolipase (Figura 04). As frações avaliadas foram: extrato bruto, F3 (exclusão molecular), PLA purificada (recromatografia da fração D do primeiro passo em *HPLC*), Fosfolipase comercial (controle positivo) e BSA (controle negativo proteico). Todos os testes enzimáticos realizados foram monitorados a 425 nm, com leituras feitas a partir do tempo 0 a 150 minutos, em intervalos de 10 minutos, incubados a 37 °C.

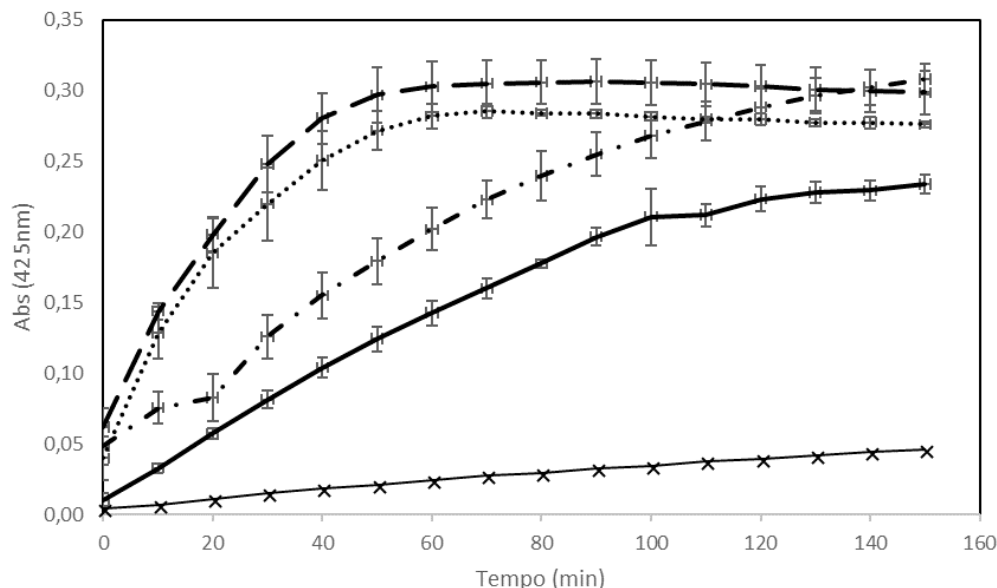


Figura 04. Atividade enzimática dos passos cromatográficos utilizados para a purificação de uma fosfolipase A2 presente na toxina de *B. moojeni*. A atividade acima descrita, foi realizada utilizando o substrato específico para atividade fosfolipásica (4N3OBA) EB: Extrato bruto (linha tracejada); PLA purificada: Fração correspondente ao passo de recromatografia (traço e ponto); BSA: Controle negativo proteico (linha contínua com a marcação de X); PLA comercial: controle positivo (linha contínua); F3 exclusão: Fração obtida após o primeiro passo cromatográfico (linha pontilhada).

Um dos objetivos do isolamento e caracterização dos componentes do veneno de serpentes é entender melhor a participação de cada componente em diferentes procesos fisiopatológicos decorrentes do envenenamento e em possíveis aplicações médicas. Com isso, foi possível observar uma elevada atividade fosfolipásica nas frações avaliadas, quando comparado à enzima comercial.

Se relacionarmos os géis de SDS-PAGE com o gráfico de atividade enzimática, podemos observar a presença de fosfolipase em todas os passos cromatográficos. Na atividade enzimática da fração purificada, é possível observar nos tempos avaliados, uma maior atividade quando comparado a atividade da enzima comercial. Resultado esse que indica uma elevada atividade específica da enzima purificada. Outros trabalhos disponíveis na literatura mostram essa atividade enzimática, utilizando o mesmo substrato (MOURA et al., 2014; SUCASACA-MONZÓN et al., 2015).

Após a incubação da fração purificada com a *S. aureus* formadora de biofilme, foi possível observar que nas duas maiores concentrações da fração, a bactéria apresentou um crescimento inferior quando comparado ao crescimento bacteriano incubado com o antibiótico testado ($512 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ou $36,3 \mu\text{M}$). Isso sugere uma importante aplicação médica de fosfolipases oriundas de serpentes do gênero *Bothrops*.

Para a atividade antibiofilme, avaliou-se a formação de crescimento de biofilme após a incubação da fração purificada da toxina de *B. moojeni* com a bactéria *S. aureus*. O tempo para avaliação do crescimento foi de 24 horas e os resultados foram expressos em percentual de crescimento bacteriano comparados com o controle positivo (100%) (Figura 05).

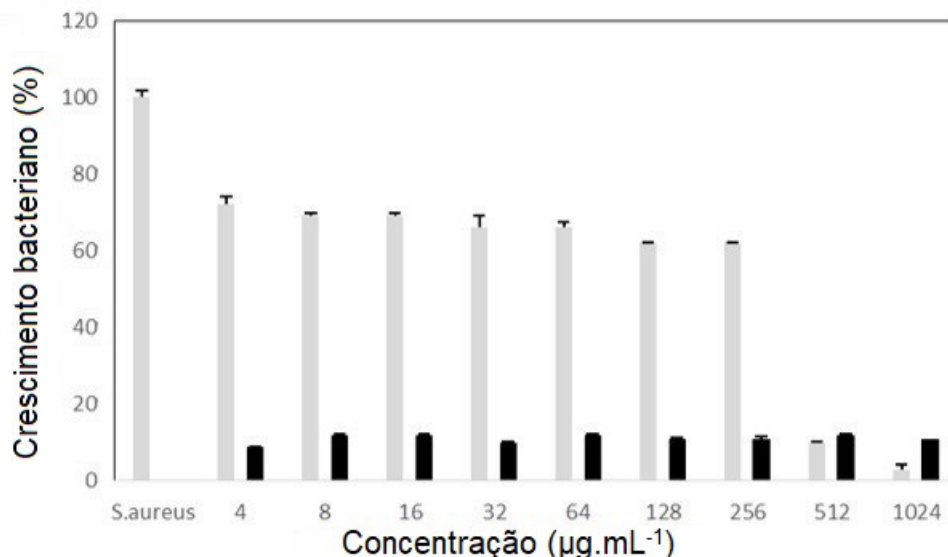


Figura 05. Avaliação do crescimento bacteriano na formação de biofilme *S. aureus* incubado com diferentes concentrações de antibiótico (barras pretas) e fração purificada da toxina de *B. moojeni* (barras cinzas). O crescimento de *S. aureus* sem nenhuma interferência, foi adotado como o controle positivo, indicado para comparar o crescimento da bactéria com o controle e com a fração purificada.

É importante ressaltar que nenhum dos trabalhos citados na discussão desse tópico utilizou bactérias formadoras de biofilme, apenas bactérias planctônicas, sugerindo um leque maior de aplicações para essas enzimas.

Foi observado, no trabalho de Perumalsamy e colaboradores (2014) a atividade de CaTx-II, uma fosfolipase proveniente do veneno de *C. adamanteus*. Nesse estudo, os autores relataram uma atividade fosfolipática e, quando incubado com *S. aureus*, a molécula apresentou uma atividade antimicrobiana similar ao antibiótico testado (clorofenicol). A atividade inibitória mínima do crescimento bacteriano foi com 20 µg.mL⁻¹ da fosfolipase e 30 µg.mL⁻¹ do antibiótico (PERUMALSAMY et al., 2014).

Uma fosfolipase (presente no veneno de *C. durissus terrificus* foi isolada, apresentando 14 kDa. Sua atividade antibacteriana foi testada contra *Clavibacter michiganensis* e apresentou uma atividade inibitória no crescimento bacteriano. Após uma análise de microscopia eletrônica, a bactéria testada apresentou uma extensa formação de vesículas e poros na membrana bacteriana, mostrando somente um crescimento de aproximadamente 12%, quando comparado ao grupo controle (TOYAMA et al., 2014).

A BthA-I-PLA₂, uma fosfolipase purificada da peçonha de *Bothrops jararaca*, contendo 13 kDa, foi incubada com *S. aureus* e, após 60 minutos de avaliação, 160 µg da molécula avaliada foi capaz de reduzir o crescimento da bactéria para aproximadamente 20%, ao comparar com o crescimento controle (ROBERTO et al., 2004). A partir do veneno de *B. moojeni* foi obtido a BmooPLA₂, uma fosfolipase que apresentou 13 kDa. Para verificar a atividade dessa molécula, 80 e 160 µg.mL⁻¹ foi incubada com *S. aureus*, verificando sua atividade antibacteriana. Após 60 min, foi verificado um crescimento de apenas 20% bacteriano (SILVEIRA et al., 2013).

Segundo Stábeli e colaboradores (2006), a MjTX-II, uma fosfolipase provinda da peçonha de *B. moojeni*, apresentou uma atividade que inibiu em 80% o crescimento das unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli* (STÁBELI et al., 2006). Essa atividade das fosfolipases podem estar relacionadas ao fato das mesmas serem responsáveis pela hidrólise de fosfolípidos de membrana (SAJEVIC et al., 2011).

4 | CONCLUSÃO

O presente estudo mostra o isolamento de uma fosfolipase presente na toxina de uma serpente presente no cerrado brasileiro, a *Bothrops moojeni*. Essa enzima purificada, mesmo não sendo descrita sua massa molecular exata, apresentou atividade enzimática em um substrato específico para fosfolipases, além de ter sua massa aproximada por SDS-PAGE, demonstrando uma alta similaridade com outras fosfolipases presentes na toxina de outras serpentes do mesmo gênero. Além disso, foi possível observar uma atividade antimicrobiana significativa a estirpe formadora de biofilme testada, fato ainda não relatado para fosfolipases presente na toxina de serpentes.

REFERÊNCIAS

- ACAR, J. F. **Consequences of bacterial resistance to antibiotics in medical practice.** Clinical infectious diseases, v. 24, n.1, p. 17-18, 1997.
- ADADE, C. M. et al. **Effect of *Crotalus viridis viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*.** Parasitology, v. 138, n. 1, p. 46-58, 2011.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. **Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations.** FEMS microbiology reviews, v. 35, n. 5, p. 901-911, 2011.
- AZEVEDO, F. V. P. V. et al. **Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA2 homologue from *Bothrops pauloensis* venom.** International journal of biological macromolecules, v. 82, p. 671-677, 2016.
- BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. **Staphylococcal biofilm disassembly.** Trends in microbiology, v. 19, n. 9, p. 449-455, 2011.
- BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical biochemistry, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BURIN, S. M. et al. **L-Amino Acid Oxidase Isolated from *Bothrops pirajai* Induces Apoptosis in BCR-ABL-Positive Cells and Potentiates Imatinib Mesylate Effect.** Basic & clinical pharmacology & toxicology, v. 113, n. 2, p. 103-112, 2013.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere.** Comstock Publishing Associates: Ithaca, NY, and London, 2004.
- CARDOSO, J. L. C. et al. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo: Sarvier, v. 468, 2003.

- CASTILLO, J. C. Q. et al. **In vitro antiplasmodial activity of phospholipases A2 and a phospholipase homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops asper***. *Toxins*, v. 4, n. 12, p. 1500-1516, 2012.
- DEOLINDO, P. et al. **I-Amino acid oxidase activity present in fractions of *Bothrops jararaca* venom is responsible for the induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi***. *Toxicon*, v. 56, n. 6, p. 944-955, 2010.
- FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. **Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance**. *Clinical microbiology reviews*, v. 25, n. 4, p. 661-681, 2012.
- FRY, B. G. et al. **Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins**. *Journal of molecular evolution*, v. 57, n. 1, p. 110-129, 2003.
- HØIBY, N. et al. **Antibiotic resistance of bacterial biofilms**. *International journal of antimicrobial agents*, v. 35, n. 4, p. 322-332, 2010.
- HOLZER, M.; MACKESSY, S. P. **An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2**. *Toxicon*, v. 34, n. 10, p. 1149-1155, 1996.
- ITO, A. et al. **Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms**. *Applied and environmental microbiology*, v. 75, n. 12, p. 4093-4100, 2009.
- KANASHIRO, M. M. et al. **Biochemical and biological properties of phospholipases A2 from *Bothrops atrox* snake venom**. *Biochemical pharmacology*, v. 64, n. 7, p. 1179-1186, 2002.
- KAYANO, A. M. et al. **BbMP-1, a new metalloproteinase isolated from *Bothrops brazili* snake venom with in vitro antiplasmodial properties**. *Toxicon*, v. 106, p. 30-41, 2015.
- KINI, R. M. **Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes**. *Toxicon*, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2003.
- LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.
- LIRA-DA-SILVA, R. M. et al. **Serpentes de importância médica do nordeste do Brasil**. *Gazeta Médica da Bahia*, v. 79, n. 1, 2009.
- MATSUZAKI, K. et al. **Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1327, n. 1, p. 119-130, 1997.
- MOURA, A. A. D. et al. **Purification and biochemical characterization of three myotoxins from *Bothrops mattogrossensis* snake venom with toxicity against *Leishmania* and tumor cells**. *BioMed research international*, v. 2014, 2014.
- MULLER, V. D. et al. **Phospholipase A2 isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* inactivates dengue virus and other enveloped viruses by disrupting the viral envelope**. *PLoS One*, v. 9, n. 11, p. e112351, 2014.
- NOLTE, S. et al. **BJcuL, a lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom, induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by inhibition of cell adhesion and actin cytoskeleton disassembly**. *Toxicon*, v. 59, n. 1, p. 81-85, 2012.
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. **Biofilm formation as microbial development**. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000.

- PERUMALSAMY, R. et al. **Snake venom proteins: development into antimicrobial and wound healing agents**. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*,v. 11, n. 1, p. 4-14, 2014.
- PONCE-SOTO, L. A. et al. **Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A2 homologue isolated from the venom of the snake Bothrops alternatus**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*,v. 1770, n. 4, p. 585-593, 2007.
- QU, Y. et al. **Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from very low birth weight babies: comprehensive comparisons of bacteria at different stages of biofilm formation**. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*,v. 9, n. 1, p. 16, 2010.
- QUINTANA, J. C. et al. **Antiplasmodial effect of the venom of Crotalus durissus cumanensis, crotoxin complex and Crotoxin B**. *Acta tropica*,v. 124, n. 2, p. 126-132, 2012.
- ROBERTO, P. G. et al. **Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A 2 from Bothrops jararacussu venom**. *The Protein Journal*,v. 23, n. 4, p. 273-285, 2004.
- RODRIGUES, R. S. et al. **Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from Bothrops pauloensis snake venom**. *Biochimie*,v. 91, n. 4, p. 490-501, 2009.
- RODRIGUES, R. S. et al. **Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A2 from Bothrops pauloensis snake venom**. *Toxicon*,v. 50, n. 1, p. 153-165, 2007.
- SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIŽAJ, I. **Haemostatically active proteins in snake venoms**. *Toxicon*, v. 57, n. 5, p. 627-645, 2011.
- SCHROEDER, M.; BROOKS, B. D.; BROOKS, A. E. **The complex relationship between virulence and antibiotic resistance**. *Genes*,v. 8, n. 1, p. 39, 2017.
- SILVEIRA, L. B. et al. **Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A2 from Bothrops moojeni snake venom**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 73, p. 35-43, 2013.
- SMITH, A. B.; DALY, N. L.; CRAIK, D. J. **Cyclotides: a patent review**. *Expert opinion on therapeutic patents*,v. 21, n. 11, p. 1657-1672, 2011.
- STÁBELI, R. G. et al. **Bothrops moojeni myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: an example of function versatility of snake venom proteins**. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*,v. 142, n. 3-4, p. 371-381, 2006.
- STÁBELI, R. G. et al. **Cytotoxic L-amino acid oxidase from Bothrops moojeni: biochemical and functional characterization**. *International journal of biological macromolecules*,v. 41, n. 2, p. 132-140, 2007.
- STÁBELI, R. G. et al. **Purification of phospholipases A2 from American snake venoms**. In: (Ed.). *Chromatography-the Most Versatile Method of Chemical Analysis: InTech*, 2012.
- SUCASACA-MONZÓN, G. et al. **Bp-13 PLA2: Purification and neuromuscular activity of a new Asp49 toxin isolated from Bothrops pauloensis snake venom**. *Biochemistry research international*,v. 2015, 2015.
- TOYAMA, D. D. O. et al. **An evaluation of 3-Rhamnosylquercetin, a glycosylated form of quercetin, against the myotoxic and edematogenic effects of sPLA2 from crotalus durissus terrificus**. *BioMed research international*,v. 2014, 2014.

TOYAMA, D. O. et al. **Effect of chlorogenic acid (5-Caffeoylquinic acid) isolated from Baccharis oxyodonta on the structure and pharmacological activities of secretory phospholipase A2 from Crotalus durissus terrificus.** BioMed research international, v. 2014, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance.** World Health Organization, 2014

EVALUATION OF THE OXIDATIVE STRESS USING BIOMARKER MALONDIALDEHYDE IN ATRETIC EGGS OF BRAZILIAN SNAKES FROM *Bothrops* genus.

Poliana Garcia Corrêa

Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Laboratório de Ecologia e Evolução, Divisão de Desenvolvimento Científico, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil
pgcorrea@usp.br;

Giuseppe Puerto

Museu Biológico, Divisão de Desenvolvimento Cultural Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Daniel da Conceição Rabelo

Laboratório de Biologia Molecular- Divisão de Desenvolvimento e Inovação, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Rosely Cabette Barbosa Alves

Laboratório de Virologia, Divisão de Desenvolvimento e Inovação, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Durvanei Augusto Maria

Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Laboratório de Biologia Molecular- Divisão de Desenvolvimento e Inovação, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

durvanei.maria@butantan.gov.br

ABSTRACT: Atresia is a process of cell death or apoptosis of the majority of ovarian follicles, known by a variety of morphological

or pathological conditions. A large number of atretic eggs was released by different groups of captive females snakes, in the Laboratory of Ecologia and Biological Museum, from Instituto Butantan. Lipoperoxidation induces tissue damage, related to the pathogenesis of distinct diseases, which can lead to cell death. We investigated the released atretic eggs doing analysis of lipoperoxidation. Extraction and purification of the lipids were done by the method adapted from Bligh & Dyer. The reaction method of the malondialdehyde biomarker (MDA), a secondary product of lipid peroxidation complexed with thiobarbituric acid (TBA), was used. The Reading was done at 532 nm. Analyzing the results, a great variation in MDA concentration was found in different atretic eggs at the same pit viper specimen. For example: *Bothrops insularis* (from 7.4 to 58 nmols/mL \pm 13.7 of lipid), *B. jararaca* (from 9.4 to 100 nmols/mL \pm 26), *B. leucurus* (from 6.1 to 182 nmols/mL \pm 53.7), *B. erythromelas* (from 3.6 to 66nmol/mL \pm 21.6) and *B. moojeni* (from 6.1 to 428.4 nmols/mL \pm 32.7). However, in comparisons of species, using a Kruskal-Wallis test, *B. moojeni* presented highest value of oxidative stress when compared to the other species ($>$ 100 nmols/mL). This is the first lipoperoxidation assay with atretic snake eggs, showing a high content of MDA and of oxidative stress. This could induce apoptosis or control

cell proliferation and may induce the repair of this damage.

KEY WORDS: Lipoperoxidation, Apoptosis, Atresia, cell death, pit viper, lancehead

RESUMO: A atresia é um processo de morte celular ou apoptose da maioria dos folículos ovarianos, conhecido por uma variedade de condições morfológicas ou patológicas. Um grande número de ovos atrésicos foi liberado por diferentes grupos de serpentes, fêmeas cativas, no Laboratório de Ecologia e Museu Biológico, do Instituto Butantan. A lipoperoxidação induz ao dano tecidual, relacionado à patogênese de distintas doenças, que podem levar à morte celular. Nós investigamos por ensaio de lipoperoxidação, os ovos atrésicos liberados. A extração e purificação dos lipídeos foram feitas pelo método adaptado de Bligh & Dyer. Utilizou-se o método de reação do biomarcador malondialdeído (MDA), um produto secundário da peroxidação lipídica complexada com ácido tiobarbitúrico (TBA). A leitura foi feita a 532 nm. Analisando os resultados, houve uma grande variação na concentração de MDA em diferentes ovos atrésicos do mesmo espécime de viperídeo. Por exemplo: *Bothrops insularis* (de 7,4 a 58 nmol / mL \pm 13,7 de lipídio), *B. jararaca* (de 9,4 a 100 nmol / mL \pm 26), *B. leucurus* (de 6,1 a 182 nmol / mL \pm 53,7), *B. erythromelas* (de 3,6 a 66 nmol / mL \pm 21,6) e *B. moojeni* (de 6,1 a 428,4 nmols / mL \pm 32,7). Entretanto, em comparações das espécies, utilizando o teste de Kruskal-Wallis, *B. moojeni* apresentou maior estresse oxidativo quando comparado com as outras espécies (> 100 nmols/mL). Este é o primeiro ensaio de lipoperoxidação com ovos atrésicos de serpentes, mostrando alta concentração de MDA e elevado estresse oxidativo. Isso poderia induzir a apoptose ou controlar a proliferação celular e induzir o reparo desse dano.

PALAVRAS-CHAVE: Lipoperoxidação, apoptose, atresia, morte celular, viperídeo, jararaca.

1 | INTRODUCTION

1.1 Snakes

Latin America has a rich and diverse fauna of snakes, which has its distribution in different countries according to specific biotic and abiotic factors. They are distributed through a wide variety of habitats, from arid environments to forests and wetlands, except in polar caps (CAMPBELL and LAMAR, 2004). They belong to the order Squamata, which includes snakes, lizards and amphibians and is the main order of the Reptilia class with the largest number of reptiles described. Between the 3378 known snake species, 375 are Brazilian (UETZ, 2011).

Among the snakes of medical importance are those belonging to the families Viperidae and Elapidae, whose representatives are all venomous, endowed with venom producing glands and specialized dentition for their inoculation (CAMPBELL; LAMAR, 2004; MARQUES et al., 2001). In Brazil, viperids of public health importance basically comprise three genera: *Bothrops* (“jararacas”), *Crotalus* (“cascavéis”) e *Lachesis*

(“surucucus”).

1.2 Genus *Bothrops* wagler, 1824

The name of the genus is derived from the Greek *bothros*, meaning pit, and *ops*, meaning eye or face, alluding to the distinctive pit organ, located on the face, between the eye and the nostril (CAMPBELL; LAMAR, 2004).

According to the list of Brazilian reptile species (COSTA & BÉRNILS, 2015) Neotropical pit vipers of the subfamily Crotalinae (“pitvipers”), genus *Bothrops* (“lancehead”), consist of 29 species and are widely distributed throughout South America in a wide variety of habitats (MARTINS et al., 2001; CAMPBELL, LAMAR, 2004).

1.3 Reproductive aspects

Many manifestations or reproductive events are used to categorize the reproductive cycles of snakes. In females, the pattern and synchronization of follicular maturation (as primary and secondary vitellogenesis) and ovulation are among the most important events (ALDRIDGE, 1982). The secondary vitellogenesis and its duration vary with the species, period of the year, duration of the active season, availability of prey and amount of fat reserve (DILLER, WALLACE, 1984; NAULLEAU; BONNET, 1996).

Vitellogenesis is the process of hepatic synthesis of vitellogenin and its transport to the oocytes. It requires the mobilization of a significant maternal reserve and, consequently, depends on a threshold level of bodily condition (BONNET, NAULLEAU & MAUGET, 1994).

On the reproductive aspects, members of the genus *Bothrops* give birth to young alive, therefore they reproduce by viviparity. The females of the group have similarly conserved cycles (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002), although the fecundity may vary according to the size of the animal body in the different species of the genus (MARTINS et al., 2001), being influenced by availability of resources in different regions or habitats (SHINE, 2005).

The larger snakes are more prolific, being able to generate more than 50 offspring at one time; however, those of moderate to small size - such as *Bothrops jararaca* - can generate 20 offspring or less in a litter (CAMPBELL; LAMAR, 2004; JANEIRO-CINQUINI, 2004).

1.4 Follicular atresia

Follicular atresia is a degenerative, hormonally controlled process by which the vertebrate ovarian follicles lose their integrity and are eliminated before ovulation. In primates, most ovarian follicles undergo atresia during development and are reabsorbed by the ovary before birth (HUGHES; GOROSPE, 1991).

Several studies suggest that apoptosis is the fundamental molecular mechanism

for the removal of germ and somatic cells in the ovary of mammals and birds (TILLY et al., 1991; HUSSEIN, 2005). In teleost fish, atresia occurs in natural conditions, as well as in captivity, especially after spawning.

In reptiles, morphological and histological studies have been performed on ovarian follicles in Squamates since the 1970s. Guraya, from the 1960s, studied and compared follicular atresia of mammals and non-mammals, and reported that vitellogenic follicles become atretic due to lack of appropriate gonadotropic stimulation or imperfect balance of various hormones (GURAYA, 1965, 1966, 1969, 1973). At this stage they are called atretic eggs, since they matured, but did not finish developing.

In captivity, females of Squamatas may have a higher incidence of infertile eggs, both in oviparous and viviparous species (MACHACHERN, 1991; RONNE, 1996).

1.5 Oxidative stress

Reactive oxygen species (ROS) are highly reactive oxygen groups that damage cellular components, including DNA, protein and lipid (ESSERS et al., 2004). Generally, ROS are classified into three categories: non-ERO (H_2O_2) hydrogen peroxide, oxygen free radicals (O_2^-) and hydroxyl radicals (OH) (STORZ, 2011). These radicals are generated by intracellular sources, such as normal aerobic metabolism, nutrient deprivation and ischemia, as well as environmental stress such as ionizing or UV radiation (STORZ, 2011; ESSERS et al., 2005).

It is believed that apoptosis induced by oxidative stress is one of the main causes of follicular atresia (MURDOCH, 1998). It has been reported that the accumulation of ROS resulting from mutations in different electron transport chain complexes leads to premature ovarian failure and follicular atresia in the human ovary (KUMAR et al., 2010).

The present work aims to evaluate the oxidative stress by Lipid peroxidation assay in lipids extracted from the yolk of the atretic eggs released in large quantities in captivity by the snakes of the *Bothrops* group. The snakes are kept and monitored in captivity at the Laboratory of Ecology and Evolution (LEEV) and Biological Museum, both of the Butantan Institute.

The species under study: *B. insularis* (an insular specie, endemic to the Queimada Grande Island, São Paulo-Brazil, critically endangered), *B. jararaca*, *B. erythromelas*, *B. leucurus* and *B. moojeni* have presented high rate of deposition of atretic eggs in captivity, at the same time of parturition. For long years of observation, several species of Squamata, viviparous and oviparous, has been through this phenomenon, but we have no data published up to now on the research to provide information on molecular aspects.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 Maintenance of the snakes in captivity

We monitored the snakes behavior with emphasis on the reproductive cycle and oviposture (or release of atretic eggs) of 12 adult, captive viviparous female snakes of the *Bothrops insularis* species, kept in the Jararaca-ilhoa Conservation Laboratory, located in the Laboratory of Ecology and Evolution (LEEV) of the Butantan Institute (IB), under the responsibility of researcher PhD Selma Maria de Almeida Santos, under license from IBAMA 25650-1. A specimen of each captive female of the species: *B. moojeni* and *B. jararaca* are also part of the LEEV vivarium in the enclosure, and are monitored. Two species of female pitviper were included: *B. leucurus* and *B. erythromelas*, from the Biological Museum of the Butantan Institute, kept in captivity on the enclosure in exhibition to the public.

The animals of the Laboratory of Ecology and Evolution (LEEV) were kept individually in transparent plastic boxes (56.4 x 38.5 x 37.1cm), with lid and sides perforated and lined with corrugated cardboard (FIGURE 1). The natural conditions of photoperiod (latitude 23°S), temperature and humidity were maintained. The animals' diet was composed of mice (*Mus musculus*) from the Central Vivarium (IB) being offered at regular intervals of 30 days, respecting the proportion of 10 to 20% of the individual's weight. Fresh water was supplied *ad libitum*.

Biometric data were obtained twice a year. Data regarding behavior and sanity were daily passed on to the archives of the research projects.



Figure 1. Shelter of animals in captivity.

Transparent, perforated box with corrugated cardboard and water pot for the animal. Vivarium of Laboratory of Ecology and Evolution, Butantan Institute.

Source: Corrêa, P.G. (2018). Photo: Giuseppe Puerto.

In the Biological Museum, all the snakes were kept individualized in enclosures with an area of 1m², with a upper metal grille, and substrate of vegetal soil with cover of bark of trees (*Pinus* sp). In the room where the animals are exposed to the public were kept the natural conditions of photo-period of 10-14h, manual humidity control, to suit the conditions close to the ideal for the species. In all the enclosures there was a heated rock with temperatures ranging between 28 and 35°C, branches for displacement and substrate (FIGURE 2). The diet of the snakes was composed of swiss mice (*Mus musculus*) and wistar rats (*Rattus norvegicus*) from the Central Vivarium (IB) that are offered at regular intervals of 30 days, respecting the proportion of 10 to 20% of the individual's weight. Fresh water was supplied *ad libitum*.



Figure 2. *Bothrops jararaca* on display at Biological Museum enclosure.

Enclosure with upper metal grille, branches for displacement and substrate.

Photo: Giuseppe Puerto.

2.2 Collection and preservation of atretic eggs

Once an atretic egg was expelled or released by the females snakes, it was collected under sterile conditions with gloves, avoiding the contact of the hands with it (FIGURE 3A). The eggs were measured and weighed and then quickly stored in a freezer (-20°C or -80°C) in zip plastic bags (10x7cm), in order to preserve the cellular content and humidity of the follicles.

The frozen atretic eggs were processed on an ice bath (Petri dish with dry ice). The germinal disc, when present (FIGURE 3B) was collected internally and the cells

processed for flow cytometer analysis - FACS (data not shown). The yolk or fatty tissue of the atretic egg was cut (in pieces of about 150 mg), and processed for the lipoperoxidation assay.

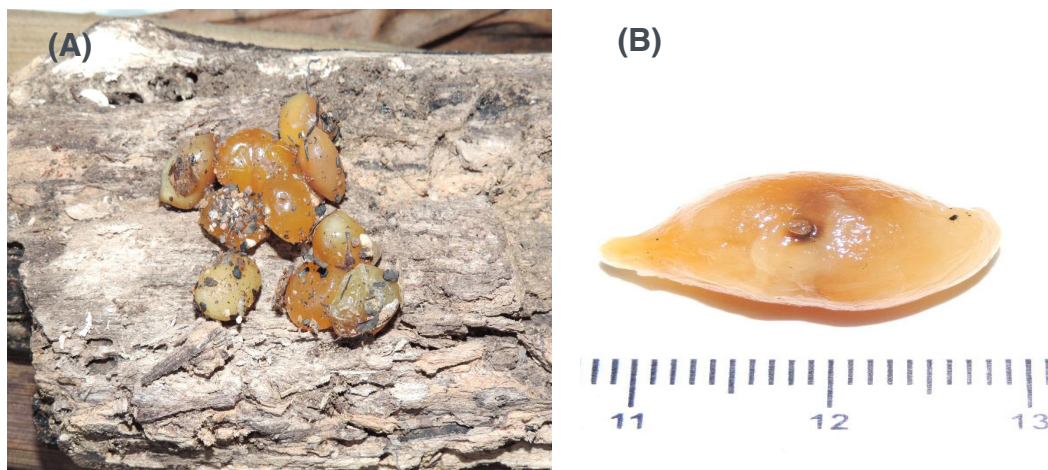


Figure 3. Atretic eggs from *Bothrops erythromelas*.

(A) Atretic eggs released at the parturition of offspring, on the substrate of wood gravel, enclosure of the Biological Museum, Butantan Institute. (B) Atretic egg of the same animal. The arrow indicates the presence of a germinal disc in the center. Photo: Giuseppe Puerto.

2.3 Lipid peroxidation assay

Oxidative stress on unsaturated lipids in cell membranes was evaluated by determining the amount of malondialdehyde (MDA), a three-carbon aldehyde, which is the final product of fatty acid peroxidation (lipoperoxidized radical), which reacts with two molecules of acid thiobarbituric acid (TBA) to form a pink chromogen complex. The content of malondialdehyde was quantified using the TBA-reactive substances test (TBARS) (OHKAWA et al., 1979), formed as a by-product of fat degradation, unsaturated fatty acids and hydroxy peroxides.

In brief, from 10 to 20 released atretics eggs by specie were collected in captivity, measured and frozen (-80 °C) to preserve the germinal disc region (GDR) when present, to further analysis on flow cytometer (FACS). The samples (about 150 mg/homogenate) were macerated, washed with PBS^{Na+} and the supernatant was collected and mixed with TCA solution (20%) and aqueous TBA solution (0.86%). The mixture was shaken and heated using a boiling-water bath for 30 min. After cooling, n-butanol was added, and the mixture was shaken. After separation of the butanol layer by centrifugation at 1500 *g* for 15 min, its optical density was determined using a spectrophotometer (ThermoPlate®), with wavelength adjusted to 532 nm (FIGURE 4).

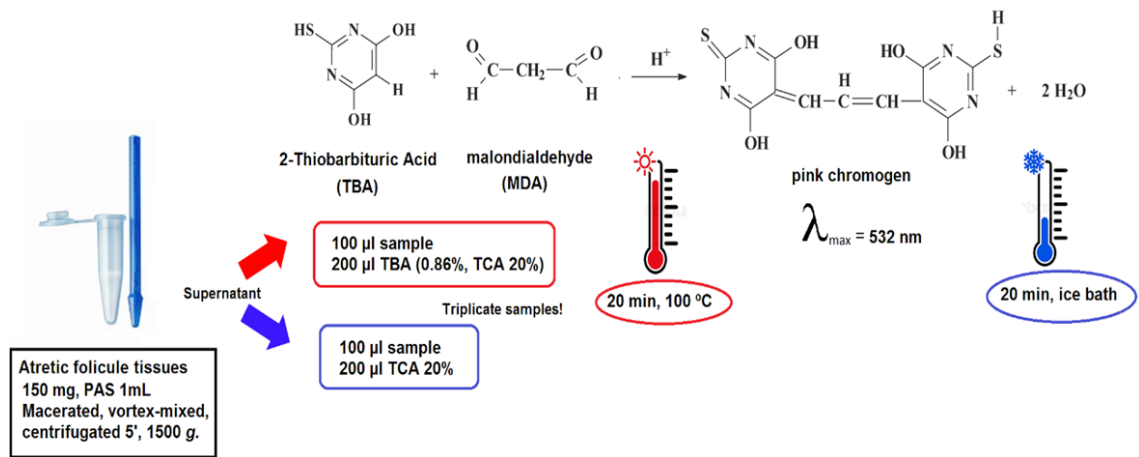


Figure 4. Simplified lipid peroxidation assay .

Extraction of yolk mass, maceration in conical microtube. Added solutions react in the lipid peroxidation and the chromogen product malonaldeído (MDA) is visualized in spectrophotometer, at 532 nm, in pink color.

Source: Corrêa, P.G. (2018).

The difference between results of the two optical density determinations was taken as the TBA value, and amounts of malondialdehyde (MDA) produced were calculated and compared to MDA standards and expressed as MDA nmoles/mL. Graphs and statistics were obtained using *GraphPad Prism* version 5.0 software and the Kruskal-Wallis test was used to compare MDA among species.

3 | RESULTS

3.1 Released eggs

Some wild snakes arrived pregnant from nature, such as *B. jararaca* and *B. insularis*. All the atretic eggs released by the females were collected in the enclosure or in the boxes at the time of parturition of the offsprings. The total of atretic egg samples were:

- *B. erythromelas* 12 eggs being four with germinative disk (GD); *B. jararaca* 11 eggs being five with GD; *B. insularis* 17 eggs of two females and two eggs with GD; *B. leucurus* 12 eggs and one with GD; and *B. moojeni*, 39 eggs, but we used only 12 eggs, of which, five had a GD. In figure five, we observed the different species of captive snakes, whose atretic eggs were used in this work, in the lipid peroxidation assay.



Figure 5. Snakes from *Bothrops* genus used to the assay.

(A) *Bothrops insularis*, (B) *B. jararaca*, (C) *B. alcatraz*, (D) *B. erythromelas*, (E) *B. leucurus*,
 Photos: Giuseppe Puerto. (F) *B. moojeni*. Photo: Bruno M. Costa.

Source: Corrêa, P. G. (2018).

3.2 Lipid peroxidation

Samples from 10 to 20 atretic eggs collected from the animals were used in the lipid peroxidation assay, but not all the samples were possible to obtain the results in triplicate of MDA reading in a spectrophotometer and were therefore dismissed. In Figure 6A we observed the pink lipid peroxidation product (MDA) observed in the presence of a strong acid, thiobarbituric acid (TBA), when heated. In Figure 6B we observed the samples applied in triplicate in a 96-well plate, flat-bottom, for reading the concentration of MDA by spectrometry, at the wavelength of 532 nm.

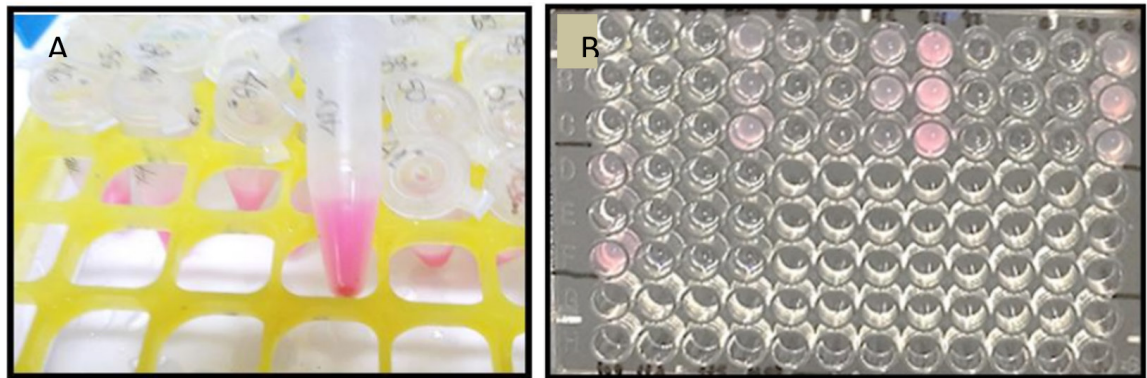


Figure 6. Lipid peroxidation assay (TBARS).

(A) Samples in the microtubes of 1.5 ml after heating with lipoperoxide chromogen (MDA) that was generated, pink. (B) 96-well plate with the samples in triplicate. Positive result for the production of MDA, for example, in wells A8, B8 and C8. Source: Corrêa, P.G. (2018).

The formation of lipoperoxidized radicals (MDA) from different samples of fertilized and unfertilized eggs of the snakes: *B. jararaca*, *B. insularis*, *B. moojeni*, *B. erythromelas* and *B. leucurus* showed significant differences in the levels of lipoperoxidized products. The analysis and calculations of these radicals, performed in *GraphPad Prism software* are present in graphs in figure 7. As we observed, there are significant differences in the concentration of malonaldehyde from one egg to another, even if they were released in the same parturition, of the same female. This indicates that one egg is under more ROS action than the others.

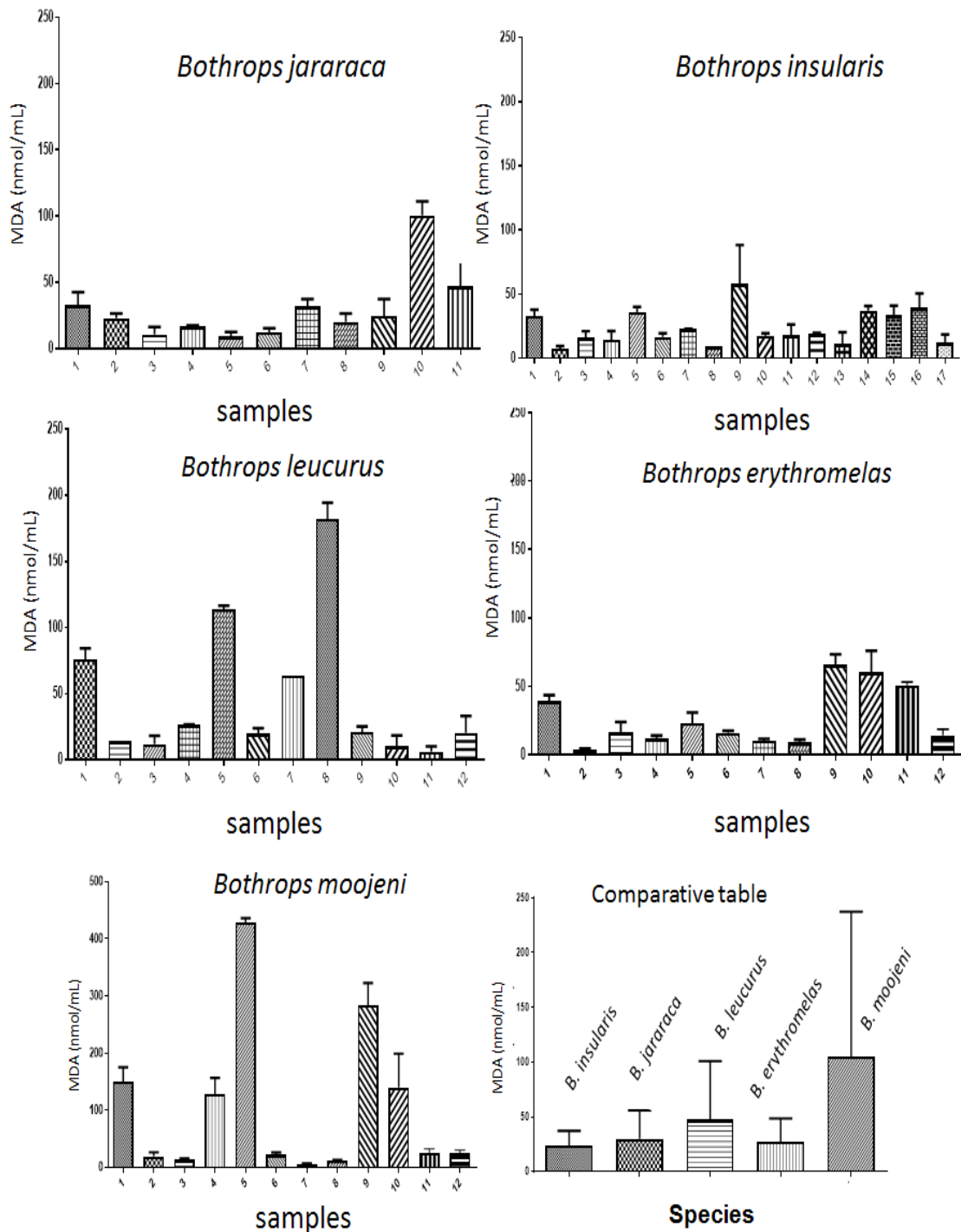


Figure 7 Statistics on GraphPad Prism - TBARS Assay.

Concentrations of MDA expressed in nmol/mL of sample. It's shown the concentration and standard deviation per individual atretic egg. Graphics represented by animal species. Comparative table of species mean by Kruskal-Wallis test.

Analyzing the results, there was a great variation in the concentration of MDA in different atretic eggs of the same viperid specimen. For example: *Bothrops insularis* (from 7.4 to 58 nmol/mL of lipid \pm 13.7), *B. jararaca* (from 9.4 to 100 nmol/mL \pm 26), *B. leucurus* (from 6.1 to 182 nmol / mL \pm 53.7), *B. erythromelas* (from 3.6 to 66 nmol / mL \pm 21.6) and *B. moojeni* (from 6.1 to 428.4 nmols / mL \pm 32.7). However, in comparisons of the species, using the Kruskal-Wallis test, *B. moojeni* presented higher concentration of peroxidized radicals (MDA) when compared to the other species ($>$ 100 nmol/mL).

4 | DISCUSSION

4.1 Atretic eggs and reproductive cycle

All the snakes released atretic eggs of medium size (~25 mm), yellowish color with hardened yolk, coincident with the parturition season (late spring and early summer). The snakes that showed the highest release of atretic eggs coincided with females that had never copulated since they came from nature.

We observed that the number of atretic eggs increased after the females were kept in captivity in relation to those females that came from the nature pregnant (or vitellogenic).

4.2 Lipid peroxidation

Reactive oxygen species (ROS) affect multiple physiological processes in reproduction and fertility, from oocyte maturation to fertilization, embryonic development and pregnancy.

In lipid peroxidation, there is a loss of selectivity in the ion exchange and release of the organelles content, as lysosomal hydrolytic enzymes and formation of cytotoxic products, as in the formation of malondialdehyde (MDA), capable of inducing cell death. Malondialdehyde is a reactive aldehyde with low stability and widely used as a biomarker in the evaluation of oxidative stress (PILZ et al., 2000). The imbalance between antioxidant and pro-oxidant systems, with predominance of oxidizing action and consequent damages, results in oxidative stress. It promotes changes such as lipid peroxidation, DNA fragmentation and oxidation of different molecules, leading to cell death (apoptosis).

Some snakes in the study group came pregnant from nature, while others were born in the enclosure (captivity) and were never placed to mate. It was observed that although the reproductive cycle of *Bothrops* has been biennial, the snakes when captive undergo to secondary vitellogenesis and release atretic eggs annually at the time coincident with parturition. The percentage of germinal disc between atretic eggs is around 19%, and was higher in *B. jararaca* specie (45%).

The production of free radicals is a continuous and physiological process, necessary for functions such as cell signaling, differentiation and cell death to occur properly. During the metabolic processes, these radicals act as mediators for the transfer of electrons in the diverse biochemical reactions. Nevertheless, overproduction can cause oxidative damage. When ROS generation exceeds the capacity of antioxidant defense systems, oxidative stress occurs in the cell.

4.3 Oxidative damages

The main biological molecules, notably DNA, proteins and lipids, can be adversely affected by ROS. In addition, the reaction with these macromolecules generates

additional ROS, starting a cascade of damage if not controlled. It is estimated that ROS are responsible for 10,000 modifications of the DNA nitrogen bases per cell per day (AMES et al., 1991). Oxidation or methylation of the bases may have the most severe phenotypic consequences (FALNES et al., 2007).

We can say that the vitellogenic eggs of the snakes of the *Bothrops* group, even when fertilized, either with mating or by parthenogenesis (females born in the enclosure that never copulated) suffer the action of ROS and that ends up making the development of the embryos unfeasible.

Oxidative damage to oocyte lipids has been implicated in the cause of loss of quality of the oocytes. It is believed that the ability to resist oxidative stress may be a key factor for a specimen, which in turn may have a greater chance of survival and reproductive success.

A complementary study to elucidate if this is actually cell death by apoptosis would be the study of these germinative disc with different cell differentiation markers.

5 | CONCLUSION

Changes in the levels of peroxidized lipids obtained in this study indicate the involvement of lipid metabolism in the phenomenon of atresia in snakes, especially the genus *Bothrops*, which is an unpublished data.

CONFLICT OF INTEREST

Authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Post-Graduation Program in Wild and Domestic Animals Anatomy (Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres - PPGAADS) from Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny at the State University of São Paulo (FMVZ-USP), and CNPQ.

REFERENCES

ALDRIDGE, R. D. The ovarian cycle of the watersnake *Nerodia sipedon* and effects of hypohysectomy and gonadotropin administration. **Herpetologica**, Chicago, (38):71-79. 1982.

ALMEIDA-SANTOS, S. M., SALOMÃO, M. G. Reproduction in Neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In G. Schuett, M. Höggren, and H. W. Greene (eds.), **Biology of the Vipers**. Biological, Sciences Press, Carmel, IN. p. 445–462, 2002.

AMES, B.N. Oxygen radicals and 8-hydroxyguanine in DNA. **Jpn. J. Cancer Res.** 82(12):1460-1461.1991.

- BONNET,X., NAULLEAU, G., MAUGET, R. The influence of body condition on 17- β estradiol levels in relation to vitellogenesis in female *Viverra zibethica* (Reptilia, Viperidae) **General and Comparative Endocrinology**, 93, 424-437. 1994.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. (Eds) In: **The venomous reptiles of the western hemisphere**. Ithaca, New York: Cornell University Press., v. 2, p.687-689, 2004.
- CORRÊA, P.G. **Monitoramento e estudos moleculares de folículos atrésicos de serpentes do grupo *Bothrops***. 2018. 57 f. [Tese de Qualificação (Doutorado em Ciência, PPGAADS, FMVZ-USP)]. São Paulo, SP. 2018.
- COSTA, H.C., BÉRNILS, R.S. (org.). **Répteis brasileiros: Lista de espécies 2015**. Herpetologia Brasileira - 4(3):75-93. Disponível em <[http://www.sbherpetologia.org.br/images/LISTAS/2014.03-07-Mudancas Taxonomicas.pdf](http://www.sbherpetologia.org.br/images/LISTAS/2014.03-07-Mudancas_Taxonomicas.pdf)>. Acesso em 01/12/2017.
- DILLER, L.V., WALLACE, R.L. Reproductive biology of the northern Pacific rattlesnake (*Crotalus viridis oreganus*) in northern Idaho **Herpetologica**, 40, 182-193.1984.
- ESSERS, M. A., WEIJZEN, S., DE VRIES-SMITS, A. M., SAARLOOS, I., DE RUITER, N. D., BOS, J. L., AND BURGERING, B. M. FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. **EMBO J.** 23, 4802–12. 2004.
- ESSERS, M. A., DE VRIES-SMITS, L. M., BARKER, N., POLDERMAN, P. E., BURGERING, B. M., AND KORSWAGEN, H. C. Functional interaction between β -catenin and FOXO in oxidative stress signaling. **Science**. 308, 1181–1184. 2005.
- FALNES, P.O., KLUNGLAND, A., ALSETH, I. Repair of methyl lesions in DNA and RNA by oxidative demethylation. **Neuroscience**, 145: 1222–1232. 2007.
- GURAYA, S. S. A histochemical study of follicular atresia in the snake ovary. **J. Morphol.**, 117: 151–169. 1965.
- GURAYA, S.S. A histochemical study of the rhesus monkey ovary. **Acta Morphol Neerl Scand**. 6(4):395-406. 1966.
- GURAYA, S.S. Histochemical observations on the corpora atretica of amphibian ovary. **Gen. Comp. Endocr.**12(1): 165-167. 1969.
- GURAYA, S.S. Follicular atresia. Proceedings of the Golden Jubilee Symposium on Perspectives in Reproductive Physiology of the Female, **Proc. Indian Natl. Sci. Acad., Delhi University**. 3 (39b): 311-332.1973.
- HUGHES, F.M., GOROSPE, W.C. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. **Endocrinology**. 129: 2415–22. 1991.
- HUSSEIN, M.R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Hum Reprod Update** 11,162–177. 2005.
- JANEIRO-CINQUINI, T.R.F. Capacidade reprodutiva de *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae). **Iheringia, Série Zoologia** 94(4):429-431, 2004.
- KUMAR, M., PATHAK, D., KRIPLANI, A., AMMINI, A. C., TALWAR, P., AND DADA, R. Nucleotide variations in mitochondrial DNA and supraphysiological ROS levels in cytogenetically normal cases of premature ovarian insufficiency. **Arch. Gynecol. Obstet.** 282, 695–705. 2010.

- MARQUES, O. A. V.; ETEROVIC, A.; SAZIMA, I. **Serpentes da Mata Atlântica: Guia Ilustrado para Serra do Mar**. Ribeirão Preto: Holos, v. 1, p.184, 2001.
- MARTINS, M.; ARAUJO, M. S.; SAWAYA, R. J. & NUNES, R. Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of Neotropical pitvipers (*Bothrops*). **Journal of Zoology**, v. 254, p. 529-538, 2001.
- MARTINS, M.; MARQUES, O. A. V. & SAZIMA, I. Ecological and Phylogenetics Correlates of Feeding Habits in Neotropical Pitvipers of the Genus *Bothrops*. In: **Biology of the vipers**. Schuett, G., Höggren, M., Douglas, M. E., Greene, H. W. (Org.). Eagle Mountain Publishing, L.C., p. 307-328, 2002.
- MCEACHERN, M. J. **Keeping and breeding corn snakes. Advanced Vivarium Systems**, Lakeside. pp. 60. 1991.
- MURDOCH, W. J. Inhibition by oestradiol of oxidative stress-induced apoptosis in pig ovarian tissues. **J. Reprod. Fertil.** 114, 127–130. 1998.
- NAULLEAU, G., BONNET, X. Body condition threshold for breeding in a viviparous snake. **Oecologia** 107:301–306. 1996.
- OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.** 95:351–8. 1979.
- PILZ, J., MEINEKE, I., GLEITER, C.H. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.** 742, 315–325. 2000.
- RONNE, J. Revelations of a boa breeder. **Reptiles** 4:24–43. 1996.
- SHINE, R. Life-history evolution in reptiles. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 36:23–46. 2005.
- STORZ, P. Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress. **Antioxid. Redox Signal.** 14, 593–605. 2011.
- TILLY, J.L., KOWALSKI, K.I., JOHNSON, A.L., HSUEH, A.J. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. **Endocrinology.** 129,2799-801. 1991.
- UETZ, P. et al. (eds.) **The Reptile Database**. Disponível em < <http://www.reptile-database.org/db-info/taxa.html#Ser>>. Acesso em 04/11/2015.

NOVOS REGISTROS DE OCORRÊNCIA DE *Trachemys dorbigni* (Emydidae, Testudines) NO BRASIL

Juliana Rosa Matias Ciccheto

Aluna de Graduação de Ciências Biológicas,
Universidade Estadual de Maringá, Maringá,
Paraná. juciccheto2@gmail.com

Carlos Eduardo Vargas Grou

Graduado em Ciência Biológicas, Unicersumar,
Centro Universitário de Maringá, Maringá, Paraná.
eduardogrou@hotmail.com

Sabine Borges da Rocha

Programa de Pós Graduação em Ecologia e
Conservação, Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do
Sul. sabineborges@hotmail.com

RESUMO : As duas espécies do gênero *Trachemys* que ocorrem no Brasil, *T. adiutrix* e *T. dorbigni* recentemente foram consideradas uma mesma espécie, sendo agora classificadas como *T. dorbigni dorbigni* e *T. dorbigni adiutrix*. *Trachemys d. dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) é um quelônio da subordem Cryptodira, conhecido popularmente como Tigre d'água, e é uma das tartarugas de água doce mais abundantes do Rio Grande do Sul. Ocorre também naturalmente no Uruguai e nordeste da Argentina. Além do mais, foi introduzida em alguns estados brasileiros (SC, PR, SP, RJ, MG, BA, SE, GO e TO). Este trabalho tem por objetivo fornecer informações de novas ocorrências de *T. d. dorbigni*, na tentativa de elucidar a

distribuição desta espécie no Brasil. Foram compilados dados de ocorrência de diferentes regiões através da análise da literatura, além de consultas em base de dados online. Os novos registros de ocorrência (Maringá-PR e Campo Grande-MS) foram obtidos através da coleta de dados em campo. Para isso, foi utilizado o método de busca ativa no períodos matutino e vespertino para registro dos quelônios em ambas as localidades. Em Maringá a coleta dos dados foi realizada entre Janeiro e Março de 2017 em 20 corpos d'água , sendo eles lagos, lagoas e riachos. Capturamos 14 indivíduos de *T. d. dorbigni* (oito fêmeas, três machos e três juvenis) em três lagoas do Município paranaense. Um dos três juvenis registrados é neonato. Já no Município de Campo Grande, em Agosto de 2018 foi registrada uma fêmea de *T. d. dorbigni* desovando nas proximidades do Córrego Cabaça, no campus da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Em ambas as localidades há evidências de que a espécie é invasora. Os novos registros de *T. d. dorbigni* dá indícios de uma recente colonização desses ambientes pela espécie. A conectividade das redes hídricas, bem como a introdução da espécie pelo ser humano, são alguns dos fatores responsáveis pela presença do Tigre d'água nas regiões. Os dados apresentados neste trabalho representam o primeiro registro de *T. d. dorbigni* no noroeste do Estado do

Paraná e no Estado de Mato Grosso do Sul. Nossos dados acrescentam informações essenciais para futuros estudos relacionados à dispersão desta espécie no Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Espécie invasora; Tigre d'água, Quelônios; Tartaruga-de-água-doce.

ABSTRACT: *Trachemys dorbigni* and *T. adiutrix*, the two Brazilian species of the genus *Trachemys*, were recently classified as only one species. Now they are considered as subspecies, *T. dorbigni dorbigni* and *T. dorbigni adiutrix*. *Trachemys d. dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) is a chelonius of the suborder Cryptodira. Known as “Black-bellied Slider”, is one of the most abundant freshwater turtles in Rio Grande do Sul state. This species also occurs in Uruguay, and in northeastern of Argentina. Furthermore, it was introduced in some other Brazilian states, such as Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Bahia, Sergipe, Goiás and Tocantins. This work aims to provide information on new occurrences of *T. d. dorbigni*, in an attempt to elucidate the distribution of this species in Brazil. Data from different regions were compiled through literature analysis, as well as online database. The new occurrence records (Maringá-PR and Campo Grande-MS) were obtained through data collection in the field. For this, the active search method was used in the morning and afternoon periods to record the chelonians in both locations. In Maringá data collection was carried out between January and March 2017 in 20 bodies of water, being lakes, lagoons and streams. We captured 14 individuals of *T. d. dorbigni* (eight females, three males and three juveniles) in three ponds of the Municipality of Paraná. One of the three juveniles registered is newborn. In the Municipality of Campo Grande, in August 2018 a female of *T. d. dorbigni* was recorded near to the Cabaça Stream on the campus of the Federal University of Mato Grosso do Sul state. In both locations there is evidence that the species is invasive. The new records of *T. d. dorbigni* gives evidence of a recent colonization of these environments by the species. The connectivity of water networks, as well as the introduction of the species by humans, are some of the factors responsible for the presence of the Black-bellied Slider in the regions. The data presented in this work represent the first record of *T. d. dorbigni* in the northwest of the State of Paraná and in the State of Mato Grosso do Sul. Our data add essential information for future studies related to the dispersion of this species in Brazil.

KEYWORDS: Invasive species; Black-bellied Slider; Chelonians; Freshwater turtle;

INTRODUÇÃO

Testudines refere-se a uma ordem de répteis, animais popularmente conhecidos como tartarugas, que mostram especializações morfológicas associadas a habitats terrestres, de água doce ou marinhos, com uma ocupação extensa nesses diferentes ambientes (POUGH *et al*, 2008). São também chamados de quelônios e apresentam, em sua estrutura, um casco (carapaça) que os caracterizam e reflete em sua ecologia. Em muitas espécies de quelônios o sexo do indivíduo é determinado pela temperatura

do ninho (fase embrionária), o que exige planos para conservação e manejo bem-sucedidos (POUGH *et al*, 2008).

O gênero *Trachemys* apresenta uma distribuição ampla nas Américas, com ocorrência desde a Argentina até Michigan, um estado localizado no norte-nordeste dos Estados Unidos (ERNST, 1990). Apresentam duas divisões na América do Sul, como *Trachemys adiutrix*, no Maranhão (VANZOLINI, 1995) e *Trachemys dorbigni* no extremo sul da América do Sul (VANZOLINI, 1997). Contudo, através evidências moleculares Fritz *et al.* (2012) consideraram *T. adiutrix* e *T. dorbigni* sendo uma única espécie. Agora são classificadas como *T. dorbigni dorbigni* e *T. dorbigni adiutrix* (Fritz *et al.* 2012).

T. dorbigni dorbigni (DUMÉRIL & BIBRON, 1835) é conhecida popularmente como Tigre d'água, este nome se dá por possuir uma coloração com listras verdes e amarelas na região cefálica. Além disso, possuem um focinho curto e em suas extremidades possuem membranas digitais com fortes unhas (CEI, 1993). Apresentam dimorfismo sexual, por conseguinte, as fêmeas são maiores que os machos e estes apresentam a cauda mais longa e tornam-se, progressivamente, melânicos (MOLINA, 1995). Além disso, normalmente, há uma lista preta que percorre os escudos vertebrais e na margem destas existem faixas laranjas de larguras e formas variadas (BAGER, 2003).

No Brasil, é uma das tartarugas de água doce mais abundante do Rio Grande do Sul, ocorrendo também, naturalmente, no Uruguai e nordeste de Argentina (FRITZ & HAVAS, 2006). Além do mais, esta espécie foi introduzida em outros 9 estados brasileiros. No Paraná, a espécie já foi registrada ao norte do estado, em Londrina, e também no Rio Paraná, na divisa com o estado de São Paulo. Já em Mato Grosso do Sul não há registros sobre a ocorrência da espécie até o momento. Este trabalho fornece informações de novas ocorrências de *T. d. dorbigni*, na tentativa de elucidar a distribuição desta espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para obter os registros de distribuição de *T. d. dorbigni* no Brasil foram compilados dados de ocorrência de diferentes regiões através da análise de dados da literatura, além de consultas em base de dados online (Portal da Biodiversidade, Instituto Hórus e Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira - SiBBr). Os novos registros de ocorrência (Maringá-PR e Campo Grande-MS) foram obtidos através da coleta de dados em campo.

Coleta dos dados

No município de Maringá, noroeste do Paraná, a busca ativa dos quelônios persistiu em diferentes riachos e parques urbanos, mas o registro de ocorrência da espécie ocorreu em apenas três das 20 áreas amostradas. São elas: Parque

do Ingá (23°25'37.03"S e 51°55'47.24"O), Parque Alfredo Nyffeler (23°24'39.36"S e 51°55'47.27"O) e em lagoas próximas a Sede da Polícia Ambiental de Maringá (23°27'19.15"S e 51°55'58.97"O).

O Parque do Ingá é uma Área de Preservação Permanente (APP), que protege nascentes de córregos da bacia do Rio Ivaí e está inserido no Bioma Mata Atlântica e nos domínios da Floresta Estacional Semidecidual Submontana, constitui-se num dos raros remanescentes florestais que recobrem a região norte e noroeste do Paraná. Com uma superfície de 474.300 m² (47,43 ha), o Parque localiza-se próximo a área central no perímetro urbano de Maringá (MARINGÁ, 2007). O Parque Alfredo Nyffeler foi criado com o objetivo de proteção à nascente do Ribeirão Morangueiro, localizado na bacia do Pirapó. Possui uma área de 104.867, 82m² e apresenta um lago artificial (FIORELLI, 2015). Os dois lagos próximos a sede da Polícia Ambiental, popularmente conhecida como Força Verde, são artificiais e estão situadas na bacia do Rio Ivaí. Um tem cerca de 250 m de comprimento e 42 m de largura, e o outro tem 137 m de comprimento e 71 m de largura (GROU, 2015). A área pertence a prefeitura e a prática da pesca é comum na região.

No município de Campo Grande, centro-oeste de Mato Grosso do Sul, o registro foi feito em Agosto de 2018, no campus da Universidade Federal De Mato Grosso do Sul. Próxima a esta área está situada o córrego Cabaça inserido na microbacia Anhanduí, afluente do rio Paraná (SEMADUR, 2009).

Análise de dados

Além da análise dos registros de distribuição de *T. d. dorbigni*, verificamos também o tipo de área que a espécie foi registrada: sob influência antrópica ou não. Uma vez que a espécie é comercializada como *pet*, esperamos que em áreas abertas para visitação da população há uma maior chance dos indivíduos serem introduzidos.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Ambas as áreas onde *T. d. dorbigni* foi registrado pela primeira vez (Maringá-PR e Campo Grande-MS) estão sob influência antrópica e são áreas abertas para a visitação da população. Em Maringá, capturamos 14 indivíduos da espécie, sendo oito fêmeas, três machos e três juvenis - sendo um deles neonato (**Figura 01**). No Município de Campo Grande, foi registrada uma fêmea de *T. d. dorbigni* desovando no entorno de um córrego (**Figura 02**). Dessa forma, as evidências apontam que *T. d. dorbigni* está se reproduzindo em ambas as áreas, logo podemos classifica-la como uma espécie invasora na região. Os novos registros de Tigre d'água no Estado do Paraná e Mato Grosso do Sul dá indícios de que houve uma recente colonização desses ambientes pela espécie. A conectividade das redes hídricas, bem como a introdução da espécie pelo ser humano, são alguns dos fatores responsáveis pela presença da espécie nos diferentes locais (SANTOS *et al.*, 2009; SANTANA *et al.*,

2014).

Trachemys d. dorbigni já foi registrada como introduzida em nove estados brasileiros, são eles: Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Sergipe, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Bahia, Goiás e Tocantins (**Figura 03**; MEDRI *et al.*, 2002; MALVÁSIO, 2005; SANTOS *et al.*, 2009; SANTANA *et al.*, 2014). Em Santa Catarina, há registros da espécie como introduzida, mas seu registro estava unicamente nas bases de dados online ou em notas de ocorrência, como em Florianópolis, no Parque Ecológico do Córrego Grande e em Palhoça, no Parque Nacional da Serra do Tabuleiro (MALVÁSIO, 2005).

No Paraná, *Trachemys d. dorbigni* foi registrado em Londrina, norte do estado, relatado no Rio Tibagi (MEDRI *et al.*, 2002), em que a introdução da espécie é tratada como indivíduos que, eventualmente, são soltos na natureza pelo fato de serem criados como animal de estimação. Já no estado de São Paulo, foi feito um registro de ocorrência em habitat natural no Parque Estadual do Morro do Diabo em 2006, local sem acesso livre ao público, no município de Teodoro Sampaio a aproximadamente 500 m do Rio Paranapanema, afluente do Rio Paraná (SANTOS *et al.*, 2009). Outro local de ocorrência da espécie, no estado de São Paulo, é no Rio Itararé, rio este que também atravessa o estado do Paraná (ADLER, 1958). Além de um registro no Bosque Municipal Fábio Barreto, em Ribeirão Preto (MALVÁSIO, 2005).

No estado de Sergipe, em Aracaju, foi registrado um adulto em uma lagoa artificial (SANTANA *et al.*, 2014). Rio de Janeiro, Minas Gerais, Bahia, Goiás e Tocantins são estados com a ocorrência de *T. dorbigni* confirmadas em diferentes trabalhos e nas bases de dados consultadas. No Rio de Janeiro a espécie ocorre no Parque Estadual de Mendanha, no Parque Nacional de Tijuca, no Recreio dos Bandeirantes e em brejos nos municípios de Duque de Caxias e de Maricá, além de brejos em Bangu, Guaratiba, Barra e Recreio dos Bandeirantes (MALVÁSIO, 2005). Em Minas Gerais, foi registrada em Juiz de Fora, região metropolitana. Na Bahia, o registro foi em ambiente urbano, em Salvador. No estado de Goiás, em Minaçu, foi registrada em vila residencial. E, por fim, em Tocantins, foi encontrada em lagos e lagoas em torno da cidade de Palmas (MALVÁSIO, 2005).

As ocorrências de *T. d. dorbigni* registrados na literatura e nas bases de dados online, ocorreram tanto em áreas com influência antrópica, quanto em ambientes sem esta influência. Observando todos os registros no Brasil, concluímos que o animal pode ter sido tanto diretamente introduzido nessas áreas, quanto pode ter se movimentado e colonizado novos ambientes.

BAGER, 2003, relatou que existem poucos estudos relacionados à capacidade de deslocamento da espécie. Esta espécie não possui a habilidade de deslocamento em direção a nascente de rios em circunstâncias de fluxo intenso, desta forma, as distâncias percorridas para grupos de rios não devem ser factíveis. Entretanto, estes animais podem se deslocar até 250m em terra (BAGER & ROSADO, 2010) e podem apresentar uma alta taxa de deslocamento diária (800 a 900m/dia) (BAGER, 2003).

Por outro lado, há uma intensa comercialização da espécie como *pet* no Brasil, incluindo a venda no próprio estado do Paraná, no município de Morretes (MOLINA & ROCHA, 1987). Esse criadouro opera desde 2004, com registro Ibama (FAZENDO RESERVA ROMANETTO, 2016). Em virtude da recorrente venda destes animais, falta de informação provida pelos vendedores (ex. não especificam o tamanho que o animal irá alcançar), e ainda por a população possuir livre acesso as áreas em que o animal foi registrado, concluímos que a espécie pode também ter sido introduzida nessas regiões do Brasil.

Para DAVIES, 2009, desde os primórdios da agricultura o homem transporta praticamente todos os grupos taxonômicos além de suas barreiras naturais de distribuição. Espécies exóticas ou invasoras são apontadas como a segunda causa mundial de perda da biodiversidade, podendo resultar em extinções de outras espécies. Uma espécie passa a ser exótica quando esta deixa de percorrer sua área de distribuição natural, considerada pelos seus limites ambientais (DA SILVA, 2015). Para algumas espécies introduzidas o seu ambiente novo é tão distinto que sua sobrevivência apenas se torna possível através das mediações do homem. Entretanto a influência direta e pressão da dispersão podem influenciar diretamente na chance de estabelecimento (DAVIES, 2009). É importante a continuação dos estudos com essa espécie nos ambientes em que ela foi introduzida, uma vez que, ao longo do tempo, elas podem se adaptar, se reproduzir e se dispersarem localmente, gerando processos evolutivos e proles capazes de colonizar novos ambientes (DAVIES, 2009).



Figura 01. Indivíduo de *Trachemys dorbigni dorbigni* registrado no Município de Maringá, Paraná.

Foto: Eduardo Grou.



Almeida L.S.

Figura 02. Fêmea de *Trachemys dorbigni dorbigni* desovando no Município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

Foto: Lucas de Souza Almeida.

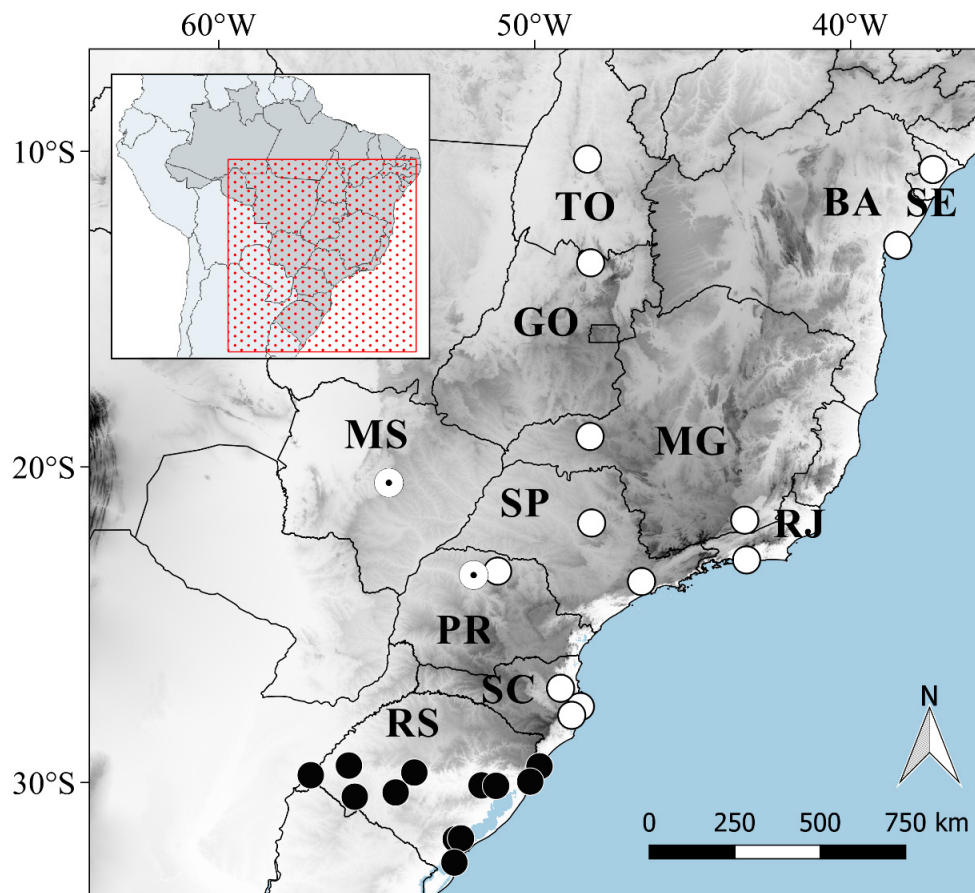


Figura 03. Distribuição geográfica de *Trachemys dorbigni dorbigni* no Brasil: pontos pretos representam a distribuição natural da espécie, no estado do Rio Grande do Sul; pontos brancos indicam os registros prévios da espécie nos estados de Santa Catarina (SC), Paraná (PR), São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ), Minas Gerais (MG), Goiás (GO), Bahia (BA), Sergipe (SE) e Tocantins (TO); os pontos brancos com preto representam os novos registros da espécie no noroeste do Paraná (PR), em Maringá, e em Campo Grande (MS).

CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste trabalho representam o primeiro registro de *T. d. dorbigni* no noroeste do Estado do Paraná, no município de Maringá e primeiro registro no estado de Mato Grosso do Sul, em Campo Grande. Nossos dados acrescentam informações essenciais para futuras investigações relacionadas à distribuição desta espécie no Brasil e a forma que a relação antrópica influencia sua distribuição.

Recomendamos que futuros estudos investiguem o impacto causado pela introdução desta espécie em ambientes aquáticos naturais. Além disso, entender a distribuição de uma espécie e analisar quais os fatores influenciam esse processo são essenciais para o direcionamento de ações de conservação e planos de manejo.

AGRADECIMENTOS

Ao Lucas de Souza Almeida e Thiago Daguano Gastaldi pelo registro e fotos cedidas dos animais encontrados no Município de Campo Grande (MS) e ao Matheus de Oliveira Neves pela elaboração do mapa de distribuição da espécie. Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa cedida a S. B. Rocha. Ao IBAMA pela Licença de coleta cedida (55637-3).

REFERÊNCIAS

- ADLER, K. K. 1958. An abnormal *Pseudemys dorbigni* (Duméril & Bibron) from Brazil. **J. Ohio Herpetol. Soc.** 1, 13.
- BAGER, A. 2003. **Aspectos da Biologia e Ecologia da Tartaruga Tigre d'Água, *Trachemys dorbigni*, (Testudines - Emydidae) no Extremo Sul do Rio Grande do Sul - Brasil.** Dissertação de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- BAGER, A.; ROSADO, J. L. O. 2010. Estimation of core terrestrial habitats for freshwater turtles in Southern Brazil based on nesting areas. **Journal of Herpetology**, 44(4):658-662.
- CEI, J. M. 1993. **Reptiles del nordeste y este de la Argentina: Herpetofauna de las selvas subtropicales, Puna y pampas.** Museo Regionale di Scieze Naturali Torino. Monografia XIV.
- DAVIES, M. A. 2009. **Invasion Biology.** Oxford University Press.
- DA SILVA, A. F.; SILVA-FORSBERG, M. C. 2015. Espécies Exóticas invasoras e seus riscos para a Amazônia Legal. **Scientia Amazonia**, v.4, n.2.
- ERNST, C. H. 1990. Systematics, taxonomy, variation and geographic distribution of the slider turtle. In: Gibbons, J. W. (ed). **Life History and Ecology of the Slader Turtle.** Smithsonian Institution Press, Washington.
- FAZENDO RESERVA ROMANETTO. 2016. **Criação de répteis - Morretes/Paraná/Brasil.** Acesso em: 15/06/2018. Disponível em: <<http://www.reservaromanetto.com.br/quemsomos.php>>
- FIORELLI, M. N. 2015. Caracterização ambiental do fundo de vale do Ribeirinho Morangueiro na cidade de Maringá - PR. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental** 19.2.

- FRITZ, U.; HAVAS, P. 2006. **Checklist of Chelonians of the World**. Dresden: German Federal Ministry of Environment, Nature Conservation and Nuclear Safety and Museum of Zoology Dresden.
- FRITZ, U. H.; STUCKAS, M.; VARGAS-RAMI´REZ, A. K.; HUNDSDO´RFER, J.; MARAN & M. PA´CKERT, 2012. Molecular phylogeny of Central and South American slider turtles: implications for biogeography and systematics (Testudines: Emydidae: Trachemys). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research** 50: 125–136.
- GROU, C. E. V. 2015. **Levantamento da fauna de quelônios em cinco pontos amostrais na região de Maringá, Paraná, Brasil**. Unicesumar - Centro Universitário de Maringá. Trabalho de Conclusão de Curso.
- MALVÁSIO, A. 2005. **Base de dados sobre Espécies Exóticas Invasoras em 13N-Brasil**. Acesso em 15/06/2018. Disponível em: <www.institutohorus.org.br>
- MARINGÁ, 2007. Prefeitura do Município. Secretaria do Meio Ambiente. **Plano de Manejo: Parque do Ingá**. Maringá : PMM-SMMA.
- MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. 2002. **A Bacia do Rio Tibagi**. Universidade Estadual de Londrina.
- MOLINA, F. B. 1989. **Observações sobre a biologia e o comportamento reprodutivo de Trachemys dorbigni (Dumeril e Bibron, 1835) em cativeiro (Reptilia, Testudines, Emydidae)**. Dissertação de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- MOLINA, F. B. & ROCHA, M. B. 1987. **Tartaruga japonesa: biologia e manejo**. Aquacult 3.
- POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. 2008. **Vertebrate life**. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.
- SANTOS, T.; VASCONCELOS, T.; MOLINA, F. B.; ZAHER, H. 2009. First record of *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines, Emydidae) in a remnant of Mesophytic Semideciduous Forest of São Paulo State, southeastern Brazil. **Herpetological Bulletin**, n. 108.
- SEMADUR. 2009. **Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Desenvolvimento Urbano**. Rede hidrográfica de Campo Grande. Acesso em: 15/06/2018. Disponível em: <<http://www.pmcg.ms.gov.br>>
- VANZOLINI, P. E. 1997. A note on the reproduction of *Trachemys dorbigni* (Testudines, Emydidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, 57.

HISTÓRIA NATURAL DE *HEMIDACTYLUS AGRIUS* VANZOLINI, 1978 (SQUAMATA: GEKKONIDAE) EM UMA ÁREA DE CARNAUBAL NO MUNICÍPIO DE ACARAÚ, CE

Francisco Ageu Ribeiro do Nascimento

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *Campus Acaraú*,
Departamento de Ciências Biológicas
Acaraú – Ceará

Osmalene Mayara de Souza

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *Campus Acaraú*,
Departamento de Ciências Biológicas
Acaraú – Ceará

Graziella Macêdo Batista

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *Campus Acaraú*,
Departamento de Ciências Biológicas
Acaraú – Ceará

Raíla Brena Araújo

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *Campus Acaraú*,
Departamento de Ciências Biológicas
Acaraú – Ceará

Francisco Robson Carvalho de Oliveira

Universidade Federal do Ceará, Departamento de
Biologia
Fortaleza – Ceará

Maria Juliana Miranda Silva

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *Campus Acaraú*,
Departamento de Ciências Biológicas
Acaraú – Ceará

Robério Mires de Freitas

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *Campus Acaraú*,

Departamento de Ciências Biológicas
Acaraú – Ceará

Amaurício Lopes Rocha Brandão

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *Campus Acaraú*,
Coordenador do curso de Licenciatura em
Ciências Biológicas
Acaraú – Ceará

RESUMO: Atualmente, ainda existem algumas lacunas na história natural de *Hemidactylus agrius*, como as variações intersexuais de uma estação seca para uma chuvosa. Com base nisso, o objetivo do trabalho é analisar aspectos da história natural de *H. agrius* em uma vegetação do tipo Floresta Mista Dicotillo-Palmácea no município de Acaraú, CE, observando as variações intersexuais quanto ao uso de microhabitats, composição alimentar e estrutura morfométrica entre a transição de um período seco (agosto a outubro de 2015) para um chuvoso (fevereiro a maio de 2016). As coletas ocorreram por meio de busca ativa (17:00h às 20:00h) sendo realizadas duas investidas a campo por mês, contabilizando um esforço amostral de 72 horas-homem. Os espécimes coletados foram eutanasiados, fixados, conservados e incorporados à Coleção Herpetológica do IFCE *campus* Acaraú. No laboratório seus conteúdos alimentares foram

removidos e analisados. Foram coletados 64 espécimes, 35 machos, 27 fêmeas, sendo 53 (82,81%) durante a estação seca e 11 (17,19%) durante a chuvosa. Os espécimes obtiveram uma elevada taxa de regeneração caudal (51,56%), reflexos de competição ou predação na espécie, sendo generalista na utilização de seu espaço. Observou-se uma elevada taxa de indivíduos sem conteúdo estomacal (20,31%), característica comum entre os geconídeos noturnos. Foram identificadas 11 categorias de presas, tendo os Isoptera como presa alimentar com índice de importância relativa ($Ix = 29,08$). Uma análise individual do volume (mm^3) e do índice de importância relativa (Ix), demonstrou que as diferentes categorias de presas consumidas apresentam diferenças significativas entre as estações, não apresentando dimorfismos sexuais significativos.

PALAVRAS-CHAVE: Uso de microhabitats. Composição alimentar. Estrutura morfométrica.

ABSTRACT: There are still some gaps in the natural history of specie *Hemidactylus agrius*, as the intersexual variations from a dry season to a rainy season. Based on it, the objective of this paper's to analyze aspects of the natural history of *H. agrius* in a Floresta Mista Dicotilo-Palmácea vegetation on municipality of Acaraú, CE, observing the intersexual variations regarding the use of microhabitats, food composition and morphometric structure between the transition from a dry period (August to October 2015) to a rainy season (February to May 2016). The collections happened by an active search (5:00-8:00 p.m.), with two field trips per month, accounting for a sampling effort of 72 man-hours. The collected specimens were euthanized, fixed, preserved and incorporated into the Herpetological Collection from IFCE campus Acaraú. In the lab, their food contents were removed and analyzed. 64 specimens were collected, 35 males and 27 females, being 53 (82.81%) during the dry season and 11 (17.19%) during the rainy season. The specimens obtained a high rate of caudal regeneration (51.56%), competition reflexes or predation in the species, being generalist in use of their space. It was observed a high rate of individuals without stomach contents (20.31%), a common fact among nocturnal geconideos. Eleven categories of prey were identified, with Isoptera being a food prey with a relative importance index ($Ix = 29.08$). Individual analysis of the volume (mm^3) and the index of relative importance (Ix), showed that different categories of prey consumed presented significant differences between the seasons, but did not present significant sexual dimorphisms.

KEYWORDS: Use of microhabitats. Food composition. Morphometric structure.

1 | INTRODUÇÃO

No Brasil estima-se que a fauna de répteis corresponde a aproximadamente a 760 espécies, com mais de 48 subespécies, totalizando 808 táxons, divididos em Testudines (36 spp.), Crocodylia (6 spp.) e Squamata, com 72 spp. de anfisbenídeos, 386 spp. de serpentes e 260 spp. de lagartos (SBH, 2015).

A quantidade de estudos relacionados a herpetofauna no Ceará ainda é escasso, devido ao fato dessa temática ser relativamente recente (FERNANDES-FERREIRA et al., 2014). No estado existem registros da ocorrência de 126 répteis de três ordens, dois Crocodylia; dez Testudine e 114 Squamata que é representado por sete anfisbenídeos, 41 lagartos, 66 serpentes, que estão distribuídos entre 28 famílias e 83 gêneros (ROBERTO; LOEBMANN, 2016).

Relacionado aos lagartos, os mesmos são tradicionalmente descritos como ectotérmicos, devido a essa característica a maioria das espécies possuem períodos de atividades diurnos e vespertinos. Entre as exceções, podemos destacar os representantes brasileiros do gênero *Hemidactylus* Oken, 1817, como, *Hemidactylus agrius* Vanzolini, 1978, que possui período de atividade noturno (ANDRADE, 2014; RODRIGUES, 2003).

Hemidactylus agrius é conhecido popularmente como lagartixa ou briba, sendo pertencente à ordem Squamata, da família Gekkonidae (BERNARDE, 2012). No Brasil, a espécie foi inicialmente descrita como endêmica da Caatinga (VANZOLINI, 1978), mas Andrade et al. (2004), ampliou sua distribuição geográfica para o Domínio Cerrado.

No estado do Ceará, *H. agrius* foi registrado para os municípios de Pacatuba e Maranguape (BORGES-NOJOSA; CARAMASCHI, 2003); Crateús (BORGES-NOJOSA; CASCON, 2005); Ibiapina (LOEBMANN; HADDAD, 2010); e para o município de Pentecoste (ANJOS et al., 2011; BEZERRA et al., 2011; PASSOS; BORGES-NOJOSA, 2011; PASSOS et al., 2015).

Devido à sua distribuição, os conhecimentos acerca da biologia e ecologia do *H. agrius* ainda são considerados escassos, sendo necessários mais estudos herpetológicos para compreender algumas lacunas em sua história natural (PASSOS, et al., 2015), como as respostas dos *H. agrius* as mudanças de uma estação seca para uma chuvosa em um ambiente sazonal. Sendo a compreensão das alterações entre as estações importante, pois sabe-se que as variações de temperatura e dos padrões pluviométricos podem influenciar de maneira significativa a história de vida de um lagarto (BRANDT, 2012).

A compreensão da dieta é outro fator relevante na história natural de um lagarto. Algumas espécies modificam sua composição alimentar como uma resposta as alterações do meio (BRANDT; NAVAS, 2011; VITT; ZANI, 1996). Associado a isso, outros fatores como forrageamento e morfometria são fatores importantes (BRANDT; NAVAS, 2011).

Recentemente, a espécie foi registrada no município de Acaraú, em três fitofisionomias distintas do Domínio Caatinga, dentre elas, a Floresta Mista Dicotillo-Palmácea, que é uma das fitofisionomias menos estudadas na Caatinga (IPECE, 2014a; MORO et al., 2014).

Diante disso, o objetivo do trabalho foi analisar aspectos da história natural de *Hemidactylus agrius* em uma vegetação do tipo Floresta Mista Dicotillo-Palmácea

no município de Acaraú-CE, observando as variações intersexuais e sazonais. Tendo como objetivos específicos, caracterizar o uso de microhabitats de *H. agrius*; descrever a composição alimentar de *H. agrius*; caracterizar a estrutura morfométrica da população estudada e identificar possíveis variações sexuais quanto ao uso de microhabitats, composição alimentar e estrutura morfométrica.

Esse trabalho ganha relevância por se tratar de um trabalho que avalia a história natural de uma população nativa de *H. agrius* em uma vegetação do tipo Floresta Mista Dicotillo-Palmácea, que é uma das fitofisionomias menos estudadas na Caatinga (IPECE, 2014a; MORO et al., 2014). Dessa maneira, esse estudo irá complementar as informações disponíveis, contribuindo para melhor compreensão das lacunas existentes na história natural desta espécie.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

O município de Acaraú está situado no litoral oeste do estado do Ceará (2° 53' 08" S; 40° 07' 12" W), a 198 km em linha reta da capital, Fortaleza, possuindo uma área territorial de aproximadamente 842,884 km². A região está situada no Domínio Morfoclimático da Caatinga, possuindo um relevo formado por Planície Litorânea e Tabuleiros Pré-litorâneos e influenciado pela Bacia do Rio Acaraú e pelo oceano Atlântico, promovendo ao longo de sua extensão áreas heterogêneas, com distintas fitofisionomias (SUCUPIRA; PINHEIRO; ROSA, 2006), a citar: Complexo Vegetacional de Zona Litorânea, Floresta Mista Dicotillo-Palmácea e Floresta Perenifólia Paludosa Marítima (IPECE, 2014a).

O clima é caracterizado como Tropical Quente Semiárido Brando, com temperaturas variando entre 26° e 28°C. As chuvas ocorrem geralmente entre os meses de janeiro a abril, com média histórica de precipitação pluviométrica de 1.139,7 mm (IPECE, 2014b).

As coletas dos espécimes foram realizadas em um local popularmente denominado como Carnaubal (2°54'55"S, 40°08'14"W) (Figura 1). O mesmo possui uma vegetação do tipo Floresta Mista Dicotillo-Palmácea (mata ciliar com carnaúba e dicotiledôneas) (IPECE, 2014a), no qual se desenvolve associado ao leito do rio Acaraú.

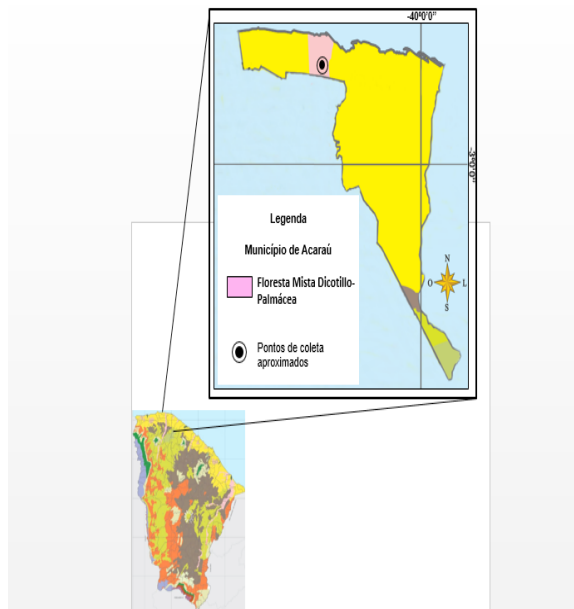


Figura 1 – Ponto de amostragem de *Hemidactylus agrius* no município de Acaraú, CE.

Fonte: Adaptado de IPECE 2014a.

2.2 Coleta de dados

A coleta dos espécimes foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, N° 52437-1.

As capturas dos espécimes foram efetuadas quinzenalmente nos meses de agosto, setembro e outubro de 2015, correspondendo ao período seco; e nos meses de fevereiro, março e maio de 2016, correspondendo ao período chuvoso. As capturas foram realizadas por meio de busca ativa no período entre às 17:00h e 20:00h.

Os espécimes coletados em campo foram levados para o Laboratório de Herpetofauna da Caatinga do Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Ceará (IFCE) *Campus Acaraú*. Em laboratório, os indivíduos foram inicialmente eutanasiados com o anestésico L (cloridrato de lidocaína 2,000 g e Epinefrina 0,002g), fixados com injeção de formalina nas vísceras e na musculatura do corpo e conservados posteriormente em álcool 70%. Os espécimes coletados foram incorporados à Coleção Herpetológica do IFCE *Campus Acaraú*.

A diferenciação entre machos e fêmeas adultos foi feita a partir da presença de poros femorais e pré-cloacais nos machos (ANDRADE, 2014), e através de exame direto das gônadas nas fêmeas.

A verificação dos espécimes que possuíam amputações de dígitos e/ou marcas de regenerações caudais, ocorreu com o auxílio de um microscópio estereoscópico (ANDRADE, 2014).

Os lagartos foram dissecados e seus conteúdos estomacais foram removidos e analisados sob um microscópio estereoscópico. Foi observada a quantidade de presas ingeridas, sendo tomadas as medidas de largura e comprimento dos itens alimentares para a determinação dos seus volumes em mm³. As medições foram realizadas com

a utilização de um paquímetro digital de 0,5mm de precisão. Os itens alimentares foram identificados apenas em nível de ordem, sendo considerados apenas os itens presentes no estômago (ROCHA; ANJOS, 2007).

As medidas morfométricas também foram obtidas com a utilização de um paquímetro digital (precisão de 0,05 milímetros). Foram obtidas as seguintes medições: rosto-cloacal (CRC), distância entre os membros (DM), largura do corpo (LC), largura da cabeça (LCa), comprimento da cabeça (CCa) (Figura 2) e altura da cabeça (Alc) (Figura 3) (ANDRADE, 2014; ARAÚJO, 1991; PASSOS *et al.*, 2015; ROCHA; ANJOS, 2007).

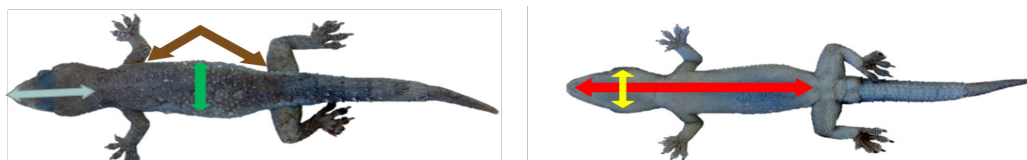


Figura 2 – Ilustrações das medições que foram realizadas nos espécimes coletados.

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: Rosto-cloacal (CRC) [vermelho]; distância entre os membros (DM) [marrom]; largura do corpo (LC) [verde]; largura da cabeça (LCa) [amarelo] e comprimento da cabeça (CCa) [azul].



Figura 3 – Ilustrações da medição da altura da cabeça (Alc) [Preto].

Fonte: elaborado pelo autor.

2.3 Análises estatísticas

A normalidade dos dados foi testada através do índice de Shapiro-Wilk.

O volume das presas ingeridas foi calculado em mm³, com base na fórmula elipsóide (ANDRADE, 2014).

$$V = (\pi \cdot \text{comprimento} \cdot \text{largura}^2) / 6$$

Foi estimado o índice de importância relativa “Ix” de cada categoria de presa no qual foram calculados seus valores numéricos, volumétricos e frequências percentuais. Os valores obtidos foram divididos por três (HOWARD *et al.*, 1999).

A verificação de possíveis diferenças sexuais na dieta dos lagartos foi realizada através do teste de *Mann-Whitney* (teste U). Para a realização do teste foi feito uma comparação do volume (mm³) total, comprimento (mínimo e máximo) e o número dos itens alimentares ingeridos pelos machos e fêmeas (ANDRADE, 2014).

Já a determinação das diferenças sazonais na composição da dieta de machos

e fêmeas em relação ao volume (mm³) e o índice de importância relativa (Ix) das presas ingeridas, foi feito através do teste de *Kolmogorovf-Smirnov* de dois grupos (ANDRADE, 2014). Neste caso, foram utilizados os volumes (mm³) e o índice de importância relativa (Ix) durante cada estação das categorias de presas consumidas por machos e fêmeas.

Para avaliar a diferença no tamanho corporal (CRC) entre machos e fêmeas, foi utilizado teste *t* de *Student* (ZAR, 1999).

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

Também foram analisadas as diferenças nas medidas da cabeça (LCa, CCa, Alc, CM) e do corpo (LC, DM) entre os sexos, por análise de covariância (ANCOVA), utilizando CRC como covariável (um modelo por variável resposta) (PASSOS, et al., 2015).

3 | RESULTADOS

A coleta de dados em campo teve um esforço amostral de 72 horas homem, sendo 36 horas na estação seca e 36 horas na chuvosa. Foram coletados 62 indivíduos, sendo 53 (82,81%) na estação seca e apenas 11 (17,19%) durante a estação chuvosa (Figura 4). Foram coletados 35 machos e 27 fêmeas de *H. agrius*.

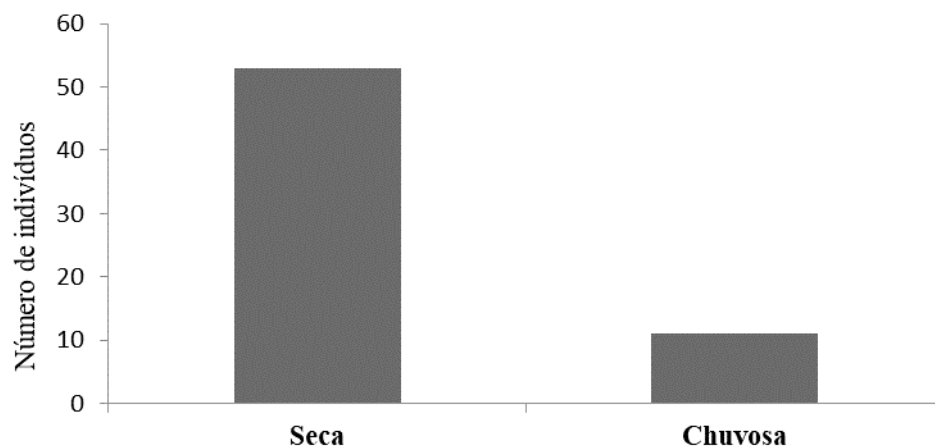


Figura 4 – Comparativo da quantidade de indivíduos capturados entre a estação seca e chuvosa.

Fonte: elaborado pelo autor.

A taxa de indivíduos com regeneração caudal foi elevada, ocorrendo em 51,56% (n = 33) dos espécimes coletados, sendo mais comum nos machos 60,60 % (n = 20) do que nas fêmeas 39,40 % (n = 13).

Dos espécimes coletados, 4,84% (n = 3) apresentavam amputação de dígito,

sendo dois machos e uma fêmea. Entre os machos, um possuía dois dígitos amputados, enquanto que o outro apenas um. E a fêmea possuía apenas um dígito amputado.

Quanto ao uso de microhabitats, *H. agrius* foi registrado em quatro categorias (barranco, troncos de árvores, solo e tronco e galhos de árvores caídos). Os micro-habitat mais utilizados em ambas as estações por machos e fêmeas foram os troncos de árvores (Figura 5). Durante a estação chuvosa os espécimes foram coletados apenas sobre os troncos de árvores (Figura 7).

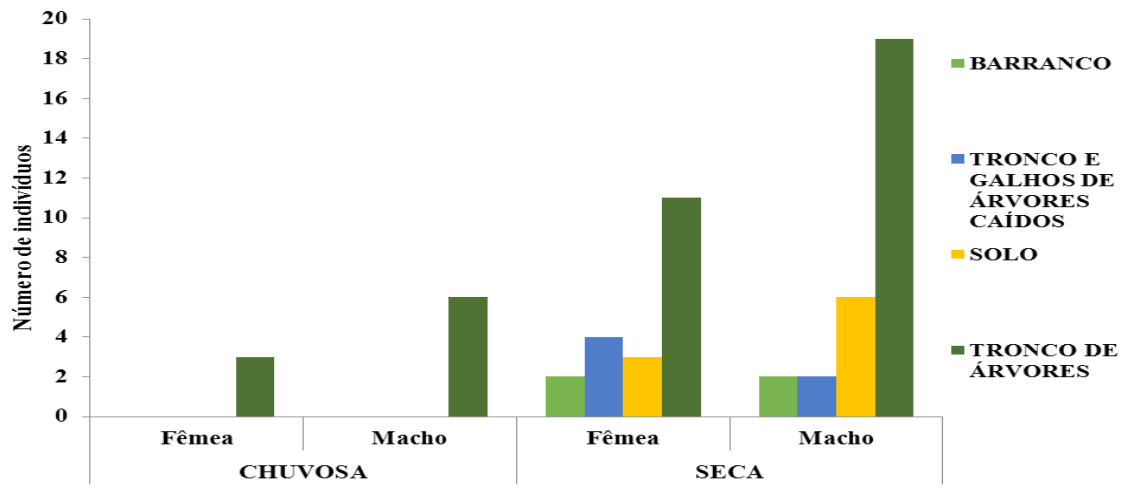


Figura 5 – Comparativo da utilização de micro-habitat por machos e fêmeas entre a estação seca e chuvosa.

Fonte: elaborado pelo autor.

Dos 64 *H. agrius* coletados, 20,31% (n = 13) não possuíam conteúdo alimentar e destes, 69,23% (n = 9) eram machos e 30,77% (n = 4) fêmeas. Entre as estações, a proporção de indivíduos coletados com estômago vazio foi similar, ocorrendo em 20,25% dos indivíduos na estação seca e 18,18% na chuvosa.

A espécie se alimentou de 10 categorias de presas (Tabela 1). Sendo sua alimentação composta principalmente por Insecta. Em uma análise geral, notou-se que os itens alimentares mais frequentes foram os Blattodea (25,00%; n = 11), seguindo por Hymenoptera (15,91%; n = 7), Orthoptera e Arachnida, ambos com (13,64%; n = 6) (Tabela 1). Mesmos os Orthopteras não apresentando uma frequência de ocorrência alta (13,64%; n = 6), sua massa corporal representou 51,05% de todo o volume (mm³) ingerido por *H. agrius*, considerando o período seco e chuvoso, indicando que esse item alimentar é muito importante na alimentação dos mesmos (Tabela 1). Em relação ao índice de importância relativa (Ix) que considera os valores percentuais de frequências, abundância e volume (mm³), as categorias de presas mais importantes são os Blattodea (Ix: 32,54), seguindo pelos Orthoptera (Ix: 24,69) e os Hymenoptera (Ix: 14,06).

Classe	Ordem	Frequência (%)	Abundância (%)	Volume em mm ³ (%)	IX
ARACHNIDA					
	Araneae	6 (13,64)	6 (9,38)	4146,26 (2,08)	8,36
INSECTA					
	Blattodea	11 (25,00)	29 (45,32)	54533,71 (27,29)	32,54
	Coleoptera	4 (9,09)	4 (6,25)	1126,78 (0,56)	5,3
	Hemiptera	2 (4,55)	2 (3,13)	1432,10 (0,72)	2,8
	Hymenoptera	7 (15,91)	9 (14,06)	24369,83 (12,20)	14,06
	Larva de inseto	2 (4,55)	2 (3,13)	227,10 (0,11)	2,59
	Lepidoptera	4 (9,09)	4 (6,25)	11849,87 (5,93)	7,09
	Mantodea	1 (2,27)	1 (1,56)	86,08 (0,04)	1,29
	Orthoptera	6 (13,64)	6 (9,38)	101986,12 (51,05)	24,69
CRUSTACEA					
	Isopoda	1 (2,27)	1 (1,56)	30,2 (0,02)	1,28
TOTAL		44 (100%)	64 (100%)	199788,16 (100%)	100

Tabela 1 – Presas consumidas por *H. agrius* na Floresta Mista Dicotillo-Palmácea do município de Acaraú, com suas respectivas frequências de ocorrência, abundância relativa, volume em mm³ e índice de importância (Ix).

Fonte: elaborado pelo autor.

Em um comparativo entre o período seco e chuvoso é possível observar que nem todos os 10 itens alimentares identificados estão presentes em ambas as estações. Os Araneae, Blattodea, Isopoda e Mantodea não estavam presentes na alimentação dos espécimes durante o período chuvoso (Tabela 2).

No período seco, a categoria de presa mais abundante foram os Blattodea correspondendo a 50,00% (n = 24) dos itens alimentares identificados. Os Orthoptera mesmo com uma abundância de apenas 5 indivíduos (10,42%), representam 82,28% do volume (mm³) total da dieta dos *H. agrius* nesse período, obtendo o maior índice de importância (Ix = 72,57) (Tabela 2).

No período chuvoso, os Blattodea representaram o item alimentar mais importante tanto em valores de frequência como em volume (mm³), obtendo consequentemente o maior índice de importância relativa (Ix = 37,61) (Tabela 2). A segunda categoria de presa com maior índice de importância relativa (Ix) são os Lepidoptera (Ix = 19,95), mesmo com sua frequência e abundância não sendo muito representativa, a contribuição em valores volumétricos correspondeu a 31,97% do volume (mm³) total consumido nesse período (Tabela 2). Outra presa importante na época das chuvas são os Hymenoptera, sendo o segundo em frequência de ocorrência 23,08% (n = 3) e o primeiro em abundância 31,25% (n = 5) juntamente com os Blattodea (Tabela 2).

CLASSE / ORDEM	Frequência (%)		Abundância (%)		Volume em mm ³ (%)		Índice de importância (Ix)	
	SECA	CHUVOSA	SECA	CHUVOSA	SECA	CHUVOSA	SECA	CHUVOSA
ARACHNIDA								
Araneae	6 (19,35)	----	6 (12,5)	----	4146,26 (5,02)	----	4,42	----
INSECTA								
Blattodea	7 (22,58)	4 (30,77)	24 (50,00)	5 (31,25)	15646,46 (16,70)	6605,24 (50,80)	16,70	37,61
Coleoptera	3 (9,68)	1 (7,69)	3 (6,25)	1 (6,25)	447,68 (0,54)	20,93 (0,16)	0,48	4,70
Hemiptera	1 (3,23)	1 (7,69)	1 (2,08)	1 (6,25)	99,87 (0,12)	288,22 (2,22)	0,11	5,39
Hymenoptera	4 (12,90)	3 (23,08)	4 (8,33)	5 (31,25)	4929,67 (5,96)	1708,59 (13,14)	5,26	22,49
Larva de inseto	1(3,23)	1 (7,69)	1 (2,08)	1 (6,25)	23,99 (0,03)	32,83 (0,25)	0,03	4,73
Lepidoptera	2 (6,45)	2 (15,38)	2 (4,17)	2 (12,5)	299,39 (0,36)	4157,69 (31,97)	0,32	19,95
Mantodea	1 (3,23)	----	1 (2,08)	----	86,08 (0,10)	----	0,09	----
Orthoptera	5 (16,13)	1 (7,69)	5 (10,42)	1 (6,25)	68004,74 (82,28)	189,57 (1,46)	72,57	5,13
CRUSTACEA								
Isopoda	1 (3,23)	----	1 (2,08)	----	30,32 (0,04)	----	0,03	----
TOTAL	31 (100%)	13 (100%)	48 (100%)	16 (100%)	82.617,04 (100%)	13.003,06 (100%)		

Tabela 2 – Comparativo das frequências de ocorrência, abundância relativa, volume em mm³ e índice de importância (Ix), das ordens de presas presente na composição alimentar de *H. agrius* na Floresta Mista Dicotillo-Palmácea na estação seca e chuvosa.

Fonte: elaborado pelo autor.

Quando avaliadas as diferenças entre o volume (mm³) alimentares entre machos e fêmeas entre as estações seca e chuvosa, não se verifica diferenças significativas [*Mann-Whitney U*, (seca: $Z = 0,8112$, $p = 0,4172$); (chuvosa: $Z = 1,0445$, $p = 0,2963$)], como podemos observar na Figura 6 obtida através do *Mann-Whitney*.

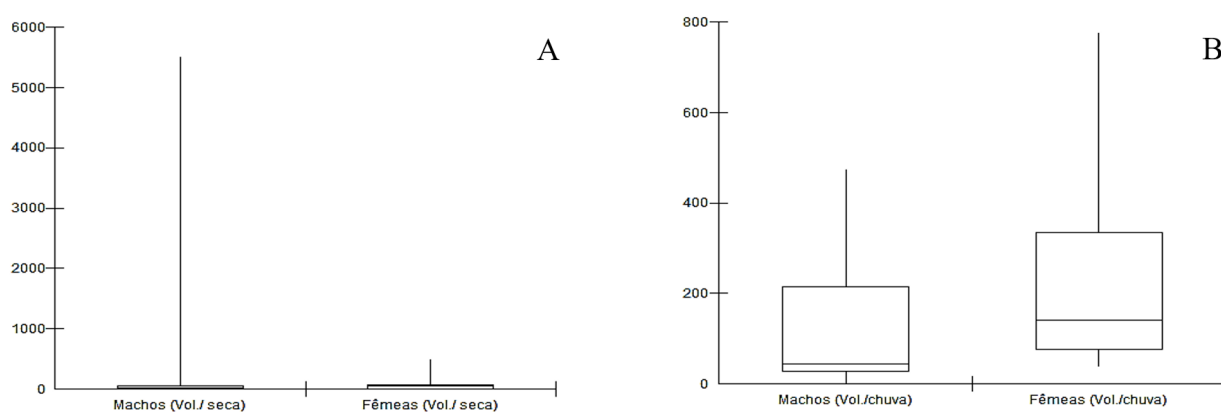


Figura 6 – Comparação entre o volume (mm³) consumido por machos e fêmeas no período seco e chuvoso utilizando o teste de *Mann-Whitney U*.

Fonte: elaborado pelo autor. Eixo X = valor em milímetro cúbico (mm³); Eixo Y = média do volume em mm³ de machos e fêmeas no período seco (A) e no período chuvoso (B).

Em relação a amplitude mínima e máxima das presas consumidas, também não foram observadas diferenças intersexuais significativas [*Mann-Whitney U*, [mínimo,

(seca: $Z = 0,9734$, $p = 0,3303$); (chuva: $Z = 1,1750$, $p = 0,2400$), [máximo, (seca: $Z = 0,8465$, $p = 0,3973$); (chuva: $Z = 1,1314$, $p = 0,2579$)] (Figura 07 e 08).

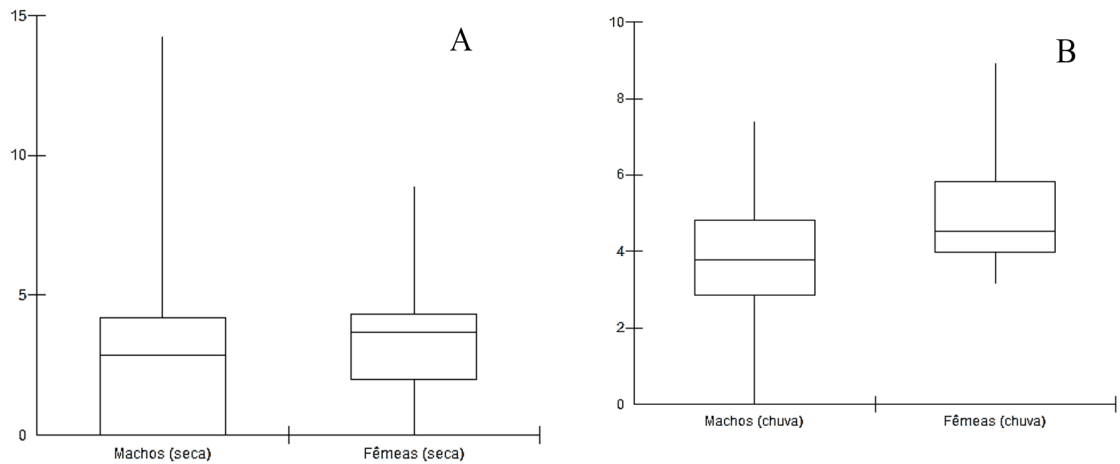


Figura 7 – Comparação da amplitude mínima dos itens alimentares ingeridos por machos e fêmeas utilizando o índice de *Mann-Whitney U*.

Fonte: elaborado pelo autor. Eixo X = valor em milímetro cúbico (mm^3); Eixo Y = média do volume em mm^3 de machos e fêmeas no período seco (A) e no período chuvoso (B).

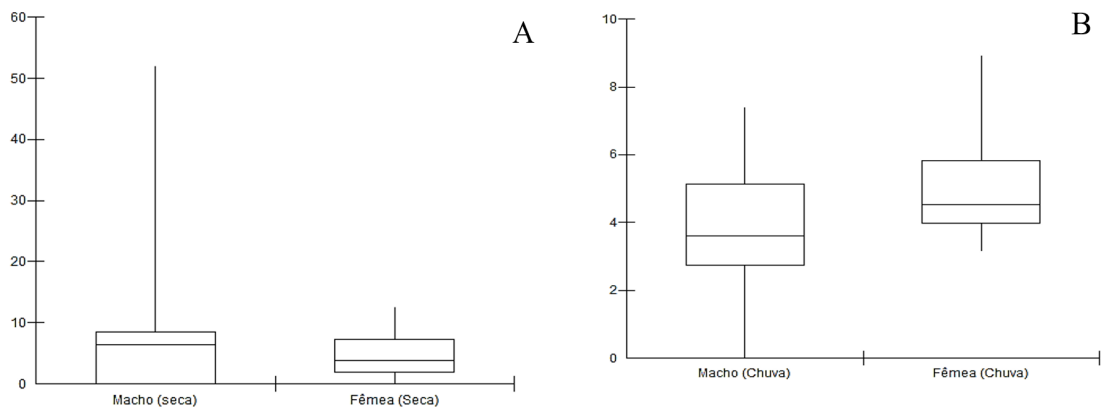


Figura 8 – Comparação da amplitude máxima dos itens alimentares ingeridos por machos e fêmeas utilizando o índice de *Mann-Whitney U*.

Fonte: elaborado pelo autor. Eixo X = valor em milímetro cúbico (mm^3); Eixo Y = média do volume em mm^3 de machos e fêmeas no período seco (A) e no período chuvoso (B).

Também não ocorreram diferenças entre o número total de presas consumidas pelos *H. agrius* [*Mann-Whitney U*, (seca: $Z = 0,9801$, $p = 0,3270$); (chuvosa: $Z = 0,8528$, $p = 0,3938$)] (Figura 9).

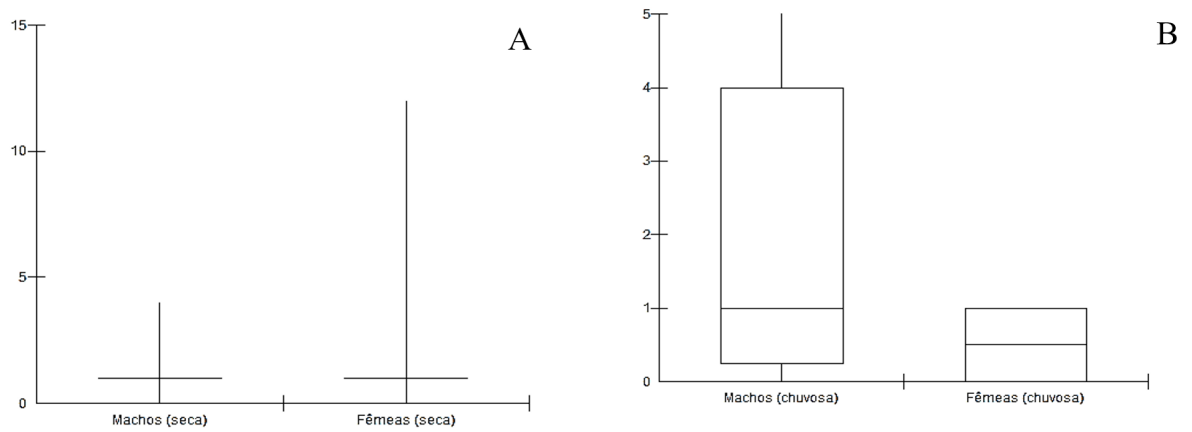


Figura 9 – Comparação entre a quantidade de itens alimentares ingeridos por machos e fêmeas utilizando o índice de *Mann-Whitney U*.

Fonte: elaborado pelo autor. Eixo X = valor em milímetro cúbico (mm³); Eixo Y = média do volume em mm³ de machos e fêmeas no período seco (A) e no período chuvoso (B).

Uma análise do volume (mm³) e do índice de importância (Ix) da composição alimentar de machos e fêmeas entre as estações, demonstraram que as diferentes categorias de presas consumidas apresentam diferenças significativas no volume (mm³) e no Ix do período seco para a chuvoso {*Kolmogorovf-Smirnov* [Machos, volume em mm³: Dmax = 0,9207, p = < 0,01; Ix: Dmax = 0,5291, p = < 0,01], [Fêmeas, volume em mm³: Dmax = 0,5056, p = < 0,01; Ix: Dmax = 0,3050, p = < 0,01]}.

Em relação a estrutura morfométrica, machos e fêmeas possuem o CRC médio similar. Machos obtiveram um CRC médio de $47,57 \pm 3,26$ e uma amplitude de 41,27 – 53,42 mm, enquanto que as fêmeas o CRC foi de $47,84 \pm 3,41$, com sua amplitude variando entre 40,58 – 53,12 mm. Não foram observadas diferenças intersexuais significativa entre o CRC [t = 0,3189, p = 0,7509] (Figura 10).

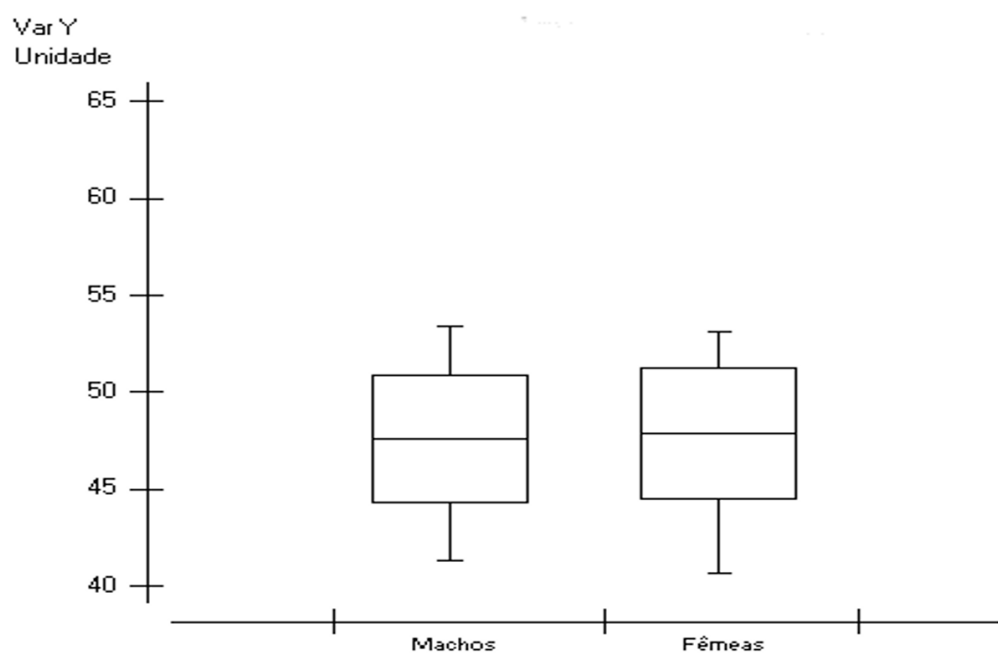


Figura 10 – Teste *t* de *Student* entre o comprimento CRC (mm) de machos e fêmeas.

Fonte: elaborado pelo autor.

Quanto a caracterização da estrutura morfométrica da população estudada (Tabela 3), verificou-se que as medições morfométricas da cabeça (Cca, Lca, CM e Alc) das fêmeas, possuem um comprimento médio menor que as dos machos. Porém em relação a Lc e DM, obtiveram um tamanho médio maior (Tabela 3).

MEDIDAS MORFOMÉTRICAS	MACHOS			FÊMEAS		
	Média	Desvio padrão	Amplitude	Média	Desvio padrão	Amplitude
Lc	10,71	1,19	7,72 – 13,26	11,41	1,59	7,14 – 14,64
DM	18,85	2,16	14,44 – 23,06	19,20	2,40	15,67 – 24,59
Cca	12,63	0,76	11,26 – 14,23	12,47	0,74	10,59 – 13,70
LCa	9,78	0,63	8,60 – 11,04	9,59	0,74	8,39 – 10,77
Alc	6,21	0,55	5,40 – 7,72	6,07	0,54	5,18 – 7,17

Tabela 3 – Média, desvio padrão e amplitude (mínima e máximo) das medições morfométricas realizadas nos espécimes coletados.

Fonte: elaborado pelo autor. Largura do corpo (LC); distância entre os membros (DM); comprimento da cabeça (CCa); largura da cabeça (LCa) e altura da cabeça (Alc).

Não ocorreu variação significativa na distância entre os membros – DM (ANCOVA, $F = 0,1624$; $p = 0,6885$); largura do corpo – LC (ANCOVA, $F = 3,349$ $p = 0,07238$); largura da cabeça – LCa (ANCOVA, $F = 1,481$; $p = 0,2286$); comprimento da cabeça – CCa (ANCOVA, $F = 0,1154$; $p = 0,7353$); altura da cabeça – Alc (ANCOVA, $F = 0,001763$; $p = 0,9667$), com os CRC dos mesmos.

Observou-se que as medidas morfométricas em mm dos machos (em preto) e das fêmeas (em vermelho), estão correlacionados com seus respectivos comprimentos rosto-cloacal em mm, ou seja, com o aumento no tamanho do comprimento rosto-cloacal ocorre um aumento entre a distância entre os membros (DM) (Figura 11), na largura do corpo (Figura 12), na largura da cabeça (LCa) (Figura 13), no comprimento da cabeça (Cca) (Figura 14) e na altura da cabeça (Alc) (Figura 15).

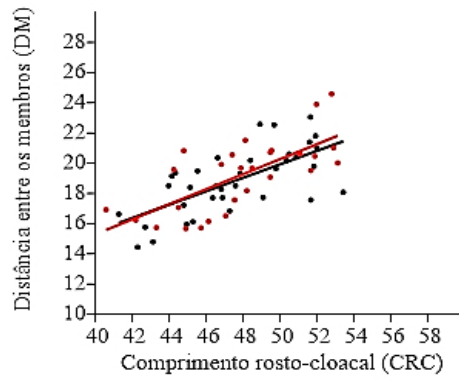


Figura 11 – Análise de covariância entre a distância dos membros (DM) em mm de machos e fêmeas com seus respectivos comprimentos rosto-cloacal (CRC) em mm utilizando-se o teste ANCOVA.

Fonte: elaborado pelo autor. Preto = machos; Vermelho = fêmeas.

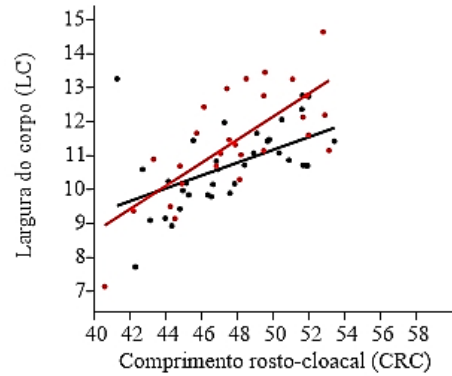


Figura 12 – Análise de covariância entre a largura do corpo (LC) em mm de machos e fêmeas com seus respectivos comprimentos rosto-cloacal (CRC) em mm utilizando-se o teste ANCOVA.

Fonte: elaborado pelo autor. Preto = machos; Vermelho = fêmeas.

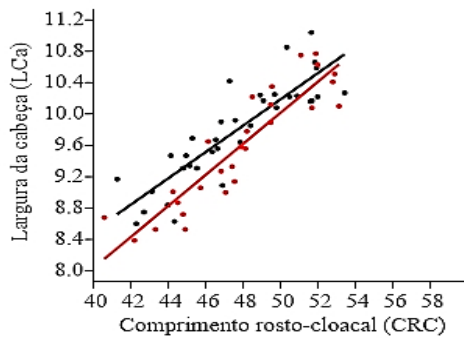


Figura 13 – Análise de covariância entre a largura da cabeça (LcCa) em mm de machos e fêmeas com seus respectivos comprimentos rosto-cloacal (CRC) em mm utilizando-se o teste ANCOVA.

Fonte: elaborado pelo autor. Preto = machos; Vermelho = fêmeas.

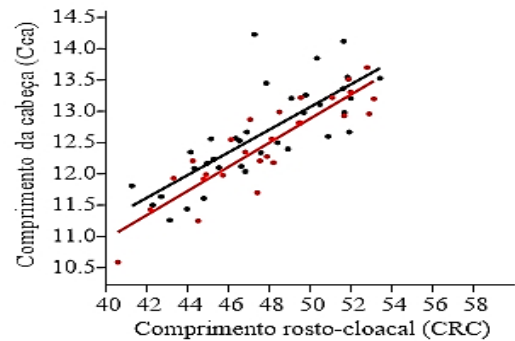


Figura 14 – Análise de covariância entre o comprimento da cabeça (Cca) em mm de machos e fêmeas com seus respectivos comprimentos rosto-cloacal (CRC) em mm utilizando-se o teste ANCOVA.

Fonte: elaborado pelo autor. Preto = machos; Vermelho = fêmeas.

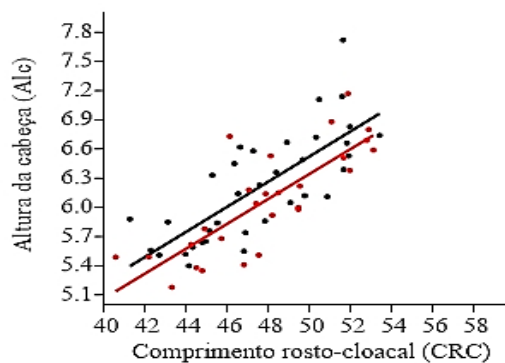


Figura 15 – Análise de covariância entre a altura da cabeça (Alc) em mm de machos e fêmeas com seus respectivos comprimentos rosto-cloacal (CRC) em mm utilizando-se o teste ANCOVA.

Fonte: elaborado pelo autor. Preto = machos; Vermelho = fêmeas.

4 | DISCUSSÃO

A grande quantidade *H. agrius* coletados durante a estação seca (82,81%) em comparação a estação chuvosa (17,19%), pode ser um reflexo do adensamento da vegetação na época das chuvas. Durante a estação chuvosa a vegetação torna-se mais densa dificultando as observações e capturas dos *H. agrius* (ANDRADE, 2014). Ainda como consequência do adensamento da vegetação, não foi observado nenhum *H. agrius* “escondido” e utilizando o barranco, solo e troncos e galhos de árvores caído como micro-habitat durante a estação chuvosa.

A elevada taxa de regeneração caudal, pode ser decorrente da predação de outras espécies sobre os *H. agrius* ou de agressões intraespecíficas. Então a espécie para escapar de agressor, geralmente se utiliza da autotomia caudal, que é o principal método de defesa utilizados pelos lagartos (BATEMAN; FLEMING, 2009).

Os microhabitats mais utilizados foram os troncos de carnaúbas e os de árvores de modo geral. O resultando foi decorrente da abundância dos indivíduos no local amostrado.

De modo geral, os *H. agrius*, assim como no estudo realizado por Andrade (2014) e Passos et al. (2015), foram generalistas na utilização de seu espaço, utilizando-se de quatro categorias de micro- habitat, que foram barranco, troncos de árvores, solo e tronco e galhos de árvores caídos.

Os *H. agrius* apresentaram uma elevada taxa de indivíduos sem conteúdo estomacal (20.31%), corroborando com os trabalhos de Huey; Pianka; Vitt, 2001 com geconídeos noturnos, pois esses animais apresentam um baixo sucesso de forrageamento, mas compensado por grandes quantidades de presas, como enxames de cupins. Desse modo, foi observado que os Isoptera obtiveram as maiores taxas de frequência e abundância, proporcionando maior índice de importância na dieta dos *H. agrius*, o que verificou-se também no trabalho de Andrade (2014), no qual a autora efetuou o comparativo entre a estação seca e chuvosa e os Isoptera obtiveram o segundo maior índice de importância (Ix).

Uma análise individual das estações indicou que na estação seca os Orthoptera foram a presa com o maior índice de importância (Ix), assim como resultando observado por Passos et al., (2015). Enquanto que na época de chuvas, os Isoptera foram a presa com maior índice de importância (Ix).

Apesar das larvas de insetos serem componentes importantes na dieta alimentar dos *Hemidactylus* (ANDRADE, 2014; PASSOS, et al., 2015; ROCHA, ANJO, 2007), nesse estudo elas foram somente a nona presa mais importante.

Não foram observadas variações morfométricas entre machos e fêmeas, corroborando que o dimorfismo sexual não é uma tendência comum entre o gênero *Hemidactylus* (ANJOS; ROCHA, 2008; SAENZ; CONNER, 1996).

5 | CONCLUSÃO

O elevado número de espécimes coletados na estação seca em comparação a chuvosa, foi ocasionada devido ao adensamento da vegetação.

Confirmou-se a característica generalista do *H. agrius* na utilização do micro-habitat. Verificou-se ainda que os *H. agrius* podem utilizar dos troncos e galhos de árvores caídas como locais de refúgios durante seus períodos de atividades.

Os espécimes da população estudada apresentam uma elevada taxa de indivíduos sem conteúdo estomacal, sendo essa característica comum entre os geconídeos noturnos. A alimentação da espécie foi composta basicamente por artrópodes, tendo os Isoptera como o item alimentar mais importante. Na estação seca, os Orthoptera foram o item mais importante, enquanto que na chuvosa, foram os Isoptera. A composição alimentar de machos e fêmeas apresentaram diferenças significativas no volume (mm³) e índice de importância (Ix) entre as estações.

Não ocorreram variações morfométricas intersexuais significativas na população de *H. agrius* estudada.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, G.V. *et al.* ***Hemidactylus agrius***. Herpetological Review, [S.L], v.35, p. 287, 2004.

ANDRADE, M. J. M. **Ecologia e história natural de população *Hemidactylus agrius* (Squamata: Gekkonidae) em área de caatinga, com avaliação da distribuição das espécies nativas do gênero no nordeste do Brasil**. 2014. 79 f. Dissertação (Ciências Biológicas) – Centro de Biotecnologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

ANJOS, L.A., *et al.* **Helminth fauna of two gecko lizards, *Hemidactylus agrius* and *Lygodactylus klugei* (Gekkonidae), from Caatinga biome, northeastern Brazil**. Neotropical Helminthology, v.5, n. 2, p. 285–290, 2011.

ANJOS, L.A.; ROCHA, C.F.D. **Reproductive ecology of the invader species gekkonid lizard *Hemidactylus mabouia* in an area of southeastern Brazil**. Iheringia (Série Zoologia), Porto Alegre, v.98, n. 2, p. 205–209, jun. 2008.

ARAÚJO, A.F.B. **Structure of White sand-dune lizard community of coastal Brasil**. Revista Brasileira de Biologia, v.54, n.4, p. 857-865, 1991.

BATEMAN, P.W; FLEMING, P. A. **To cut a long tail short: a review of lizard caudal autotomy studies carried out over last 20 years**. Journal of Zoology, London, v. 277. p. 1 – 14, 2009.

BERNARDE, P. S. **Anfíbios e répteis: introdução ao estudo da herpetofauna brasileira**. 1. ed. Curitiba: Anolisbooks, 2012. 318 p.

BEZERRA, C.H. *et al.* ***Hemidactylus agrius* (Country Leaf-Toed Gecko). Reproduction**. Herpetological Review, [S.L], v.42, p. 274–275. 2011.

BORGES-NOJOSA, D. M.; P. CASCON. **Herpetofauna da Área Reserva da Serra das Almas, Ceará**. In: F. S. ARAÚJO, M. J. N. RODAL; M. R. V. BARBOSA (Org.), Análise das Variações da Biodiversidade do Bioma Caatinga. Brasília, Ministério do Meio Ambiente. 2005. Não paginado.

- BORGES-NOJOSA, D.M. & CARAMASCHI, U. **Composição e Análise Comparativa da Diversidade e das Afinidades Biogeográficas dos Lagartos e Anfisbenídeos (Squamata) dos Brejos Nordestinos**. In Ecologia e Conservação da Caatinga (I. Leal, J.M.C. Silva & M. Tabarelli, eds.). UFPE, Recife, p.489-540. 2003.
- BRANDT, R. **Mudanças climáticas e os lagartos brasileiros sob a perspectiva da história de vida**. Revista da Biologia. São Paulo, v.8, p. 15-18, 2012. Disponível em: <<http://www.ib.usp.br/revista/volume8>>. Acesso em: 27 jul. 2016.
- BRANDT, R.; NAVAS C.A. **Life-History Evolution on Tropidurinae Lizards: Influence of Lineage, Body Size and Climate**. PLoS ONE, Canada, v.6, n. 5, p 1-7, May 2011.
- FERNANDES-FERREIRA, H. *et al.* **Hitória da Zoologia no estado do Ceará: Parte I: Vertebrados Continentais**. Gaia Scientia, v, 8, n, 1. p. 99-120, 12 jun. 2014. Disponível em: <<http://periodicos.ufpb.br/ojs2/index.php/gaia/index>>. Acesso em: 20 jul. 2015.
- HOWARD, A. K. *et al.* **Natural history of a terrestrial Hispaniolan anole, *Anolis barbouri***. J. Herpetol, v. 33, p. 702-706, 1999.
- HUEY, R.B; PIANKA, E.R; VITT, L.J. **How often do lizards “run on empty”?**. Ecology, Ecological Society of America, v. 82, n. 1, p. 1-5, jan. 2001.
- IPECE. **Perfil básico municipal: Acaraú**. 2014b. Disponível em: <www.ipece.ce.gov.br>. Acesso em: 20 mai. 2015.
- IPECE. **Unidades Fitoecológicas: Ceará**. 2014a. Disponível em: <www.ipece.ce.gov.br>. Acesso em: 22 jul. 2015.
- LOEBMANN, D. & HADDAD, C.F.B. **Amphibians and reptiles from a highly diverse area of the Caatinga domain: composition and conservation implications**. Biota Neotropica. 10:227-256. 2010.
- MORO, M.F. *et al.* **Diversidade paisagística, unidades fitoecológicas e vegetações do estado do Ceará**. [S.l.]. p. 1-57. 2014.
- PASSOS, D.C. *et al.* **On the natural history of the poorly known Neotropical lizard *Hemidactylus agrius* (Squamata: Gekkonidae)**. North-Western Journal of Zoology. University of Oradea Publishing House, Oradea, Romania, v. 11, n. 1, p. 133-137, jun. 2015.
- PASSOS, D.C.; BORGES-NOJOSA, D.M. **Morphometry of *Hemidactylus agrius* (Squamata:Gekkonidae) hatchlings from a semi-arid area in northeastern Brazil**. Herpetology Notes. v. 4, p.419-420. Dec. 2011.
- ROBERTO, I. J.; LOEBMANN, D. **Composition, distribution patterns, and conservation priority areas for the herpetofauna of the state of Ceará, northeastern Brazil**. SALAMANDRA, German, v. 52, n. 2, p. 134–152, 2016. Disponível em: <<http://www.salamandra-journal.com/>>. Acesso em: 26 jul. 2016.
- ROCHA, C.F.D.; ANJOS, L.A. **Feeding ecology of a nocturnal invasive alien lizard species, *Hemidactylus mabouia* Moreau de Jonnès, 1818 (Gekkonidae), living in na outcrop rocky area in southeastern Brazil**. Braz. J. Biol., v.67, n. 3, p.485–491. Aug. 2007.
- RODRIGUES, M. T. **Herpetofauna da Caatinga**. In: TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C.; LEAL, I. (Org.). Biogeografia, Ecologia e Conservação da Caatinga. Recife, Editora da Universidade Federal de Pernambuco, 2003. p. 182-236.
- SAENZ, D.; CONNER, R.N. **Sexual dimorphism on the head size of the Mediterranean gecko**

***Hemidactylus turcicus* (Sauria: Gekkonidae).** Texas Journal of Science, [S.L], v.48, p. 207–212. 1996.

SBH. Sociedade Brasileira de Herpetologia. (2011). (Org.). **Brazilian reptiles – Lista de espécies.** Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acesso dia 14 de outubro de 2015.

SUCUPIRA, P. A. P.; PINHEIRO, L. S.; ROSA, M. F. **Caracterização morfométrica do Médio e Baixo Curso do Rio Acaraú – Ceará – Brasil.** In: VI Simpósio Nacional de Geomorfologia, 2006, Goiânia, **Anais...** 2006.

VANZOLINI, P.E. On south american *Hemidactylus* (Sauria, Gekkonidae). **Papéis Avulsos de Zoologia**, v.31, n. 20, p. 307–343, ago. 1978.

VITT, L. J; ZANI, P. **A. Organization of a taxonomically diverse lizard assemblage in Amazonian Ecuador.** Journal of Zoology, Canadian, v.74, p. 1313-1335. 1996.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis.** 4. ed. Prentice Hall, Inc. Upper Saddle River. 1999.

EDUCAÇÃO AMBIENTAL COM OS TURISTAS DO PARNA DE UBAJARA SOBRE A HERPETOFAUNA

Raíla Brena Araújo

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *Campus Acaraú*, Departamento de Ciências Biológicas
Acaraú – Ceará

Graziella Macêdo Batista

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *Campus Acaraú*, Departamento de Ciências Biológicas
Acaraú – Ceará

Ingrid Andrade Pereira

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *Campus Acaraú*, Departamento de Ciências Biológicas
Acaraú – Ceará

Amaurício Lopes Rocha Brandão

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *Campus Acaraú*, Departamento de Ciências Biológicas
Acaraú – Ceará

RESUMO: Anfíbios e répteis são geralmente associados a crenças e mitos pela população, o que pode contribuir para a morte indiscriminada e recorrente desses animais. Esse trabalho teve por objetivo realizar uma campanha de conscientização acerca desses animais, tendo sido realizado no Parque Nacional de Ubajara (PARNA), localizado na Serra da Ibiapada, no estado do Ceará. A execução do trabalho ocorreu

durante o período do carnaval de 2017. Foram aplicados 100 questionários semiestruturados, no que concerne a conhecimentos básicos quanto ao grupo, com pessoas com idades e níveis de escolaridades variadas. Foram entrevistadas pessoas dos estados do Nordeste, Sudeste e Sul. Referente ao conhecimento dos entrevistados sobre répteis e anfíbios, a maioria não respondeu corretamente, porém os entrevistados demonstraram conhecer a importância da herpetofauna para a natureza e na cadeia alimentar, e que ao deparar-se diante de um acidente ofídico, o procedimento principal é a ida imediata ao hospital. Este trabalho teve importância para a disseminação do conhecimento e a conscientização das pessoas de diversas regiões para uma maior conscientização acerca da preservação da herpetofauna.

PALAVRAS-CHAVE: Anfíbios. Répteis. Conhecimento Popular. Planalto da Ibiapaba.

ABSTRACT: Amphibians and reptiles are generally associated with beliefs and myths by the population, which may contribute to the indiscriminate and recurrent death of these animals. The objective of this work was to carry out an awareness campaign about these animals, which was carried out in the Ubajara National Park (PARNA), located in the Serra da Ibiapaba, in the state of Ceará. The execution

of the work occurred during the carnival period of 2017. A total of 100 semi-structured questionnaires were applied, regarding basic knowledge about the group, with people of varying ages and levels of schooling. People from the Northeast, Southeast and South states were interviewed. Regarding the respondents' knowledge about reptiles and amphibians majority did not respond correctly, but the interviewees demonstrated the importance of the herpetofauna for nature and the food chain, and that when faced with an ophidian accident, the main procedure is the immediate trip to the hospital. This work had importance for the dissemination of knowledge and the awareness of the people of diverse regions for a greater awareness about the preservation of the herpetofauna.

KEY WORDS: Amphibians. Reptiles. Population knowledge. Ibiapaba Plateau.

1 | INTRODUÇÃO

A educação ambiental visa alcançar o cidadão (JACOBI, 2000), atuando sobre o respeito e desenvolvendo ações, como interação social e conservação do ambiente (JACOBI, 2005). Dessa maneira, a sensibilização da sociedade é importante para a preservação da fauna e da flora, visto que muitos animais são injustiçados por serem considerados perigosos. Nesse contexto, a falta de conhecimento implica no extermínio indiscriminado de muitas espécies (POUGH et al, 2001; RIBEIRO DE MOURA et al., 2010; FERNANDES-FERREIRA, 2011).

Dentre as espécies que sofrem julgamentos errôneos a respeito de sua periculosidade, estão os animais pertencentes à herpetofauna. Répteis e anfíbios, como serpentes, lagartos e sapos, sofrem com a interação negativa das pessoas (VIZOTTO, 2003; SILVA, 2006; JACOBI, 2005), sendo culturalmente rejeitados pela humanidade, que desde os primórdios os alocaram em lendas, mitos e crenças de diversas etnias e grupos religiosos (FERNANDES-FERREIRA, 2011). Tal aversão popular a respeito de alguns répteis e anfíbios, que quase nunca representam ameaças reais, contribui para que ocorram maiores índices de mortalidade desses animais (PAZINATO, 2013). Assim, é importante conhecer as importâncias ecológicas desses animais e a biologia, como um todo, sendo importante agregar o desenvolvimento de atividades de educação ambiental ao turismo ecológico.

Dessa maneira, popularizar e desmitificar crenças e mitos contribui para a sensibilização da população e assim a conservação da biodiversidade (PAZINATO, 2013). Esta ação é posta em prática quando se realizam estudos que envolvem populações humanas e seus saberes tradicionais e culturais, que são utilizados como ferramentas para o processo de conservação da natureza. Nesse contexto, o Parque Nacional de Ubajara foi sede da aplicação do projeto, devido ao fato de ter um grande fluxo de visitação, principalmente durante feriados prolongados, com média de 1.500 visitantes/dia das mais diversificadas regiões (INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO E BIODIVERSIDADE, 2017).

Nesse contexto, esse estudo teve como objetivo realizar uma campanha de conscientização sobre os animais pertencentes à herpetofauna no Parque Nacional de Ubajara (PARNA), tendo como objetivo específico evidenciar a importância destes animais no meio ambiente.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

O Parque Nacional de Ubajara (PARNA) (3.7543° S e 40.9108° W) (Figura 1) está localizado no complexo do Planalto da Ibiapaba que representa os fragmentos de floresta úmida no noroeste do Estado do Ceará (3.2050° S e 40.4241° W). Este complexo está localizado entre o Ceará e o Piauí, com solo de predomínio de areias quartzicas marinhas distróficas, latossolos vermelho-amarelos e latossolos vermelho-escuros. A área tem sua temperatura média anual entre 22 e 26° C, com precipitação média anual de $1.441,1$ mm (Bezerra et al. 1997).

MAPA REPRESENTANDO A LOCALIZAÇÃO DO PARNADE UBAJARA

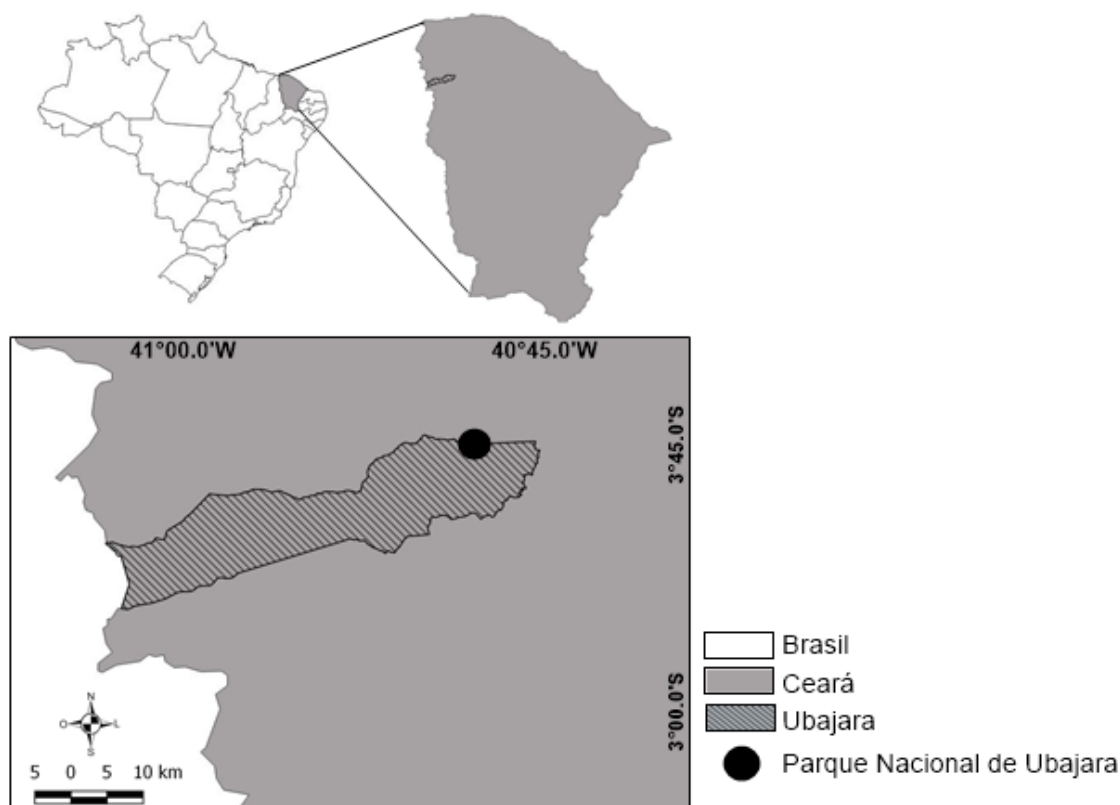


Figura 1: Localização do Parque Nacional de Ubajara (PARNA), no estado do Ceará, Brasil.

Fonte: Ingrid Andrade, 2018

O projeto foi aplicado na área de estudo durante o período do carnaval nos dias 27 e 28 de fevereiro e 1 de março de 2017, realizado em duas etapas. A primeira etapa consistiu na aplicação de cem questionários semi-estruturados com nove perguntas sobre anfíbios e répteis, com pessoas de variadas idades e níveis de escolaridades, desde não alfabetizado até pós-graduados.

Após a aplicação dos questionários, os visitantes do PARNA foram convidados a participar da segunda etapa do projeto, que consistia em um estande com a exposição de exemplares herpetológicos da coleção didática do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *Campus Acaraú*. Foram expostos em bandejas seis espécies de répteis, com quatro serpentes (*Micrurus ibiboboca*, *Oxyrhopus trigeminus*, *Pseudoboa nigra* e *Xenodon merremii*) e duas espécies de lagartos (*Hemidactylus agrius* e *Polychrus acutirostris*), e cinco espécies de anfíbios, com três anfísbenas (*Amphisbaena alba*, *Amphisbaena leposternon* e *Amphisbaena vermicularis*) e duas espécies de anuros (*Leptodactylus vastus* e *Rhinella granulosa*).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram entrevistadas cem pessoas entre doze e 87 anos de idade, sendo 51 indivíduos do sexo masculino e 49 do sexo feminino. Da região nordeste, 76 pessoas eram do estado do Ceará, 14 no Piauí, e duas no Maranhão. Já os entrevistados das outras regiões do Brasil apresentaram apenas oito visitantes, sendo representados pelos estados de São Paulo (5), Espírito Santo (1), Paraná (1) e Rio Grande do Sul (1). Quanto ao grau de escolaridade, o maior número de pessoas do sexo masculino (17) e feminino (14) apresentaram o nível superior completo.

Referente às perguntas, a primeira e a segunda estavam relacionadas com os anfíbios e répteis que as pessoas entrevistadas conheciam, respectivamente. Dentre os animais citados como anfíbios, além dos animais que realmente pertencem a esse grupo, foi dito animais rastejantes, calango, cavalo, cobra, lagartixa, grilo, inseto, jacaré, répteis, animais que vive na floresta, cobra d'água, tartaruga, tatu e onça; e trinta e seis pessoas não conseguiram dizer um exemplo de anfíbios. Enquanto que com relação aos répteis, foram citados cachorro (1), mosquito (1), grilo (1), anfíbio (1), com 15 pessoas não sabendo responder; entretanto, todas as outras pessoas souberam citar pelo menos um exemplo, seja geral, como lagarto, camaleão, cobra, jacaré, bem como exemplos específicos, como cascavel e jararaca.

Esse fato mostra que as pessoas demonstraram um conhecimento maior a respeito do termo réptil, o que provavelmente está associado à aversão existente as serpentes, por serem consideradas perigosas a população. O termo anfíbio estava esquecido na memória da maioria das pessoas mais velhas, sendo os exemplos corretos ditos por crianças e por pessoas que estudavam ou trabalhavam na área ambiental.

Com relação à pergunta relacionada sobre a frequência de encontro com esses animais, as maiorias das pessoas eram da capital, portanto raramente encontravam animais pertencentes à herpetofauna. Enquanto que 36 visitantes encontravam frequentemente, entretanto, a maioria dessas pessoas estavam referindo-se apenas a rãs, que geralmente são encontradas no banheiro. Quatorze via pouco esses animais,

oito nunca viam e uma pessoa disse que apenas cobra. Apesar de algumas pessoas encontrarem esses animais com frequência por morarem em região próxima a mata, não necessariamente eles sabiam dizer quais eram anfíbios e quais eram répteis, entretanto, eles conseguiam dizer quais animais eram perigosos os não.

Também foi indagada qual a reação ao encontrar um desses animais. As respostas foram variadas, como se afastar, tentar se aproximar, fotografar, procurar ajuda ou ficar com medo (Figura 2). É interessante notar que apenas três pessoas disseram matar esses animais. O fato é que o medo pode causar as mais variadas reações. Entretanto, esse fato pode ser atribuído porque de certa maneira, as pessoas que visitaram o PARNA durante o carnaval haviam tido um grau de estudo que os permitiam discernir sobre o que fazer em uma situação considerada perigosa.

REAÇÃO DOS ENTREVISTADOS AO ENCONTRAR UM ANIMAL PERTENCENTE À HERPETOFAUNA

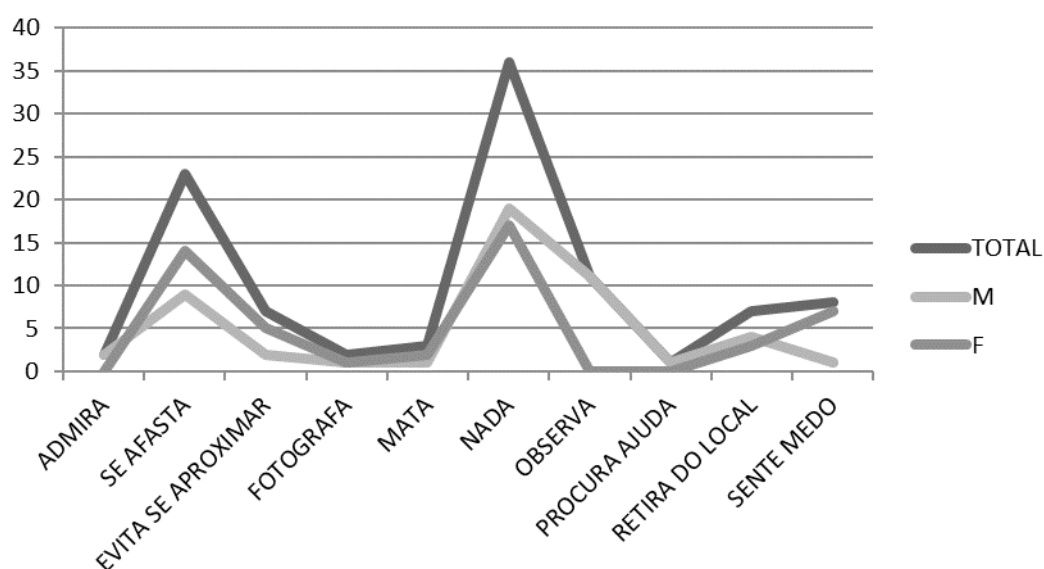


Figura 2. O que os entrevistados faziam ao encontrar anfíbios e répteis, em que M significa pessoas do sexo masculino e F, do sexo feminino.

Fonte: autores, 2017

Os entrevistados foram questionados se esses animais pertencentes à herpetofauna traziam algum risco à população. Vinte e nove pessoas disseram que apenas as cobras traziam risco. Onze pessoas disseram saber alguns perigosos, mas não quiseram citar. Seis disseram que são perigosos, mas não sabiam o motivo. Uma pessoa disse que não saber e outra que apenas os sapos são perigosos. Já outra pessoa falou que dependia da coloração. A resposta que não se enquadrou no contexto, foi a de que bois são os animais perigosos. Cinquenta pessoas afirmaram que os animais questionados não traziam perigo.

Também foi questionado como fazem para identificar uma serpente peçonhenta, já que o maior “vilão” desses animais são consideradas as cobras. A maioria dos entrevistados responderam que não sabiam a resposta. Outros entrevistados deram

características físicas para identificação, como o formato da cabeça ou da pupila, do rabo e da coloração (Figura 3). Muitas dessas respostas estão atreladas ao que foi aprendido há muitos anos na escola, como o formato da cabeça, que acaba trazendo uma informação errônea para a população. A jiboia foi citada como perigosa mesmo não sendo peçonhenta, mostrando que as serpentes no geral são discriminadas.

MANEIRAS DE IDENTIFICAR SERPENTES PEÇONHENTAS DE ACORDO COM OS ENTREVISTADOS

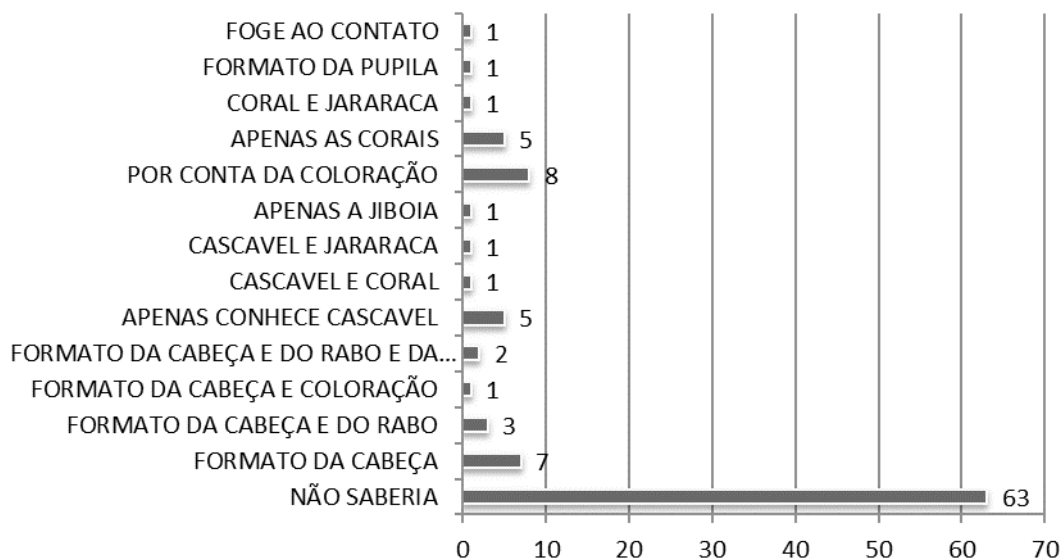


Figura 3. Como os entrevistados fariam para identificar uma serpente peçonhenta.

Fonte: autores, 2017

Outro aspecto importante a ser abordado foi com relação ao procedimento adotado ao ser picado por uma serpente. A maioria dos entrevistados responderam correntemente, que é a ida imediata ao hospital. Outros ainda completaram citando que levariam a serpente e a importância do soro antiofídico. Entretanto alguns não fariam nada, ou cortaria o local da picada e chuparia o veneno. Um dos entrevistados iria atrás do Butantan (ressaltando que era um turista de São Paulo, onde existe a sede do Butantan) (Figura 4).

PROCEDIMENTOS ADOTADOS PELOS ENTREVISTADOS CASO SEJAM PICADOS POR UMA SERPENTE

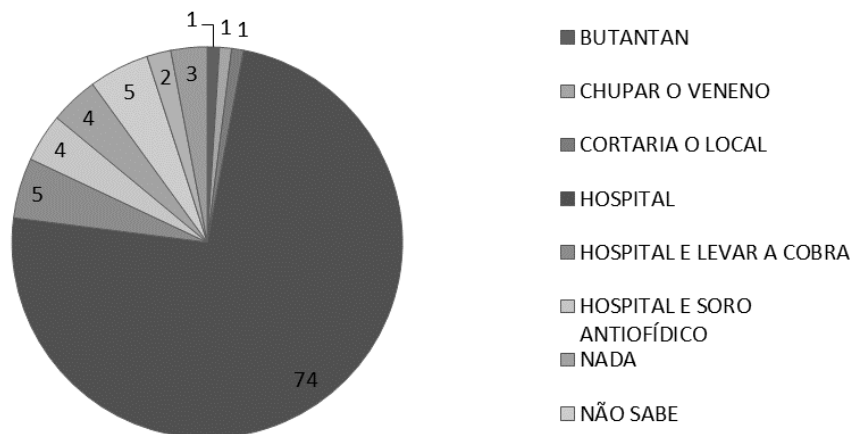


Figura 4. Quais procedimentos deveriam ser adotados pelo entrevistado ao ser picado por uma serpente.

Fonte: autores, 2017

Outro ponto importante esteve relacionado com a importância desses animais na natureza. Os visitantes relataram sobre a cadeia alimentar e da importância que os animais tem na natureza, sobre o equilíbrio ambiental, controle biológico, que são animais bioindicadores e sua importância medicinal. Mais outros visitantes responderam não saber a importância (Figura 5).

IMPORTÂNCIA DA HERPETOFAUNA DE ACORDO COM OS ENTREVISTADOS

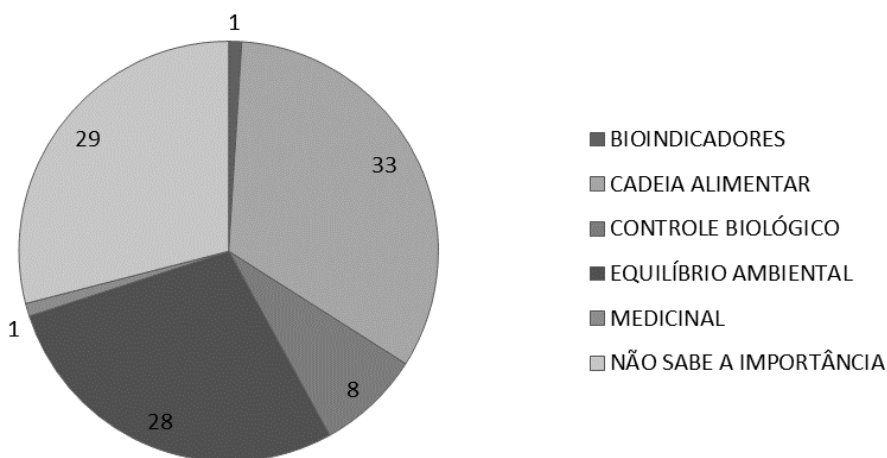


Figura 5. A importância que os entrevistados acreditavam que a herpetofauna tem para a natureza.

Fonte: autores, 2017

O último questionamento na verdade esteve relacionada a um espaço aberto para as pessoas contarem as histórias, mitos ou lendas conhecidos por eles. Entretanto 65 pessoas disseram não conhecer, seis não lembraram e 29 contaram algum caso. A

maioria das histórias foram atreladas a serpentes que perseguiram algum parente do entrevistado, ou alguém que conseguiu hipnotizar esses animais.

4 | CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos através dos questionários, pode-se observar que a localidade e o nível de escolaridade influenciaram nas respostas, principalmente na interação dessas pessoas com os animais pertencentes a esses grupos. Dessa forma, a educação ambiental desse trabalho teve importância para a disseminação do conhecimento e na sensibilização das pessoas de diversas regiões para uma maior conscientização acerca da preservação desses animais. Com isso, houve a significativa contribuição para a melhor interação do homem com a natureza.

REFERÊNCIAS

BEZERRA, E.C., BEZERRA, J.E.G.; MENDES, M.F.S. 1997. **Precipitações In Atlas do Ceará** (Instituto de Planejamento do Estado do Ceará, ed.). Secretaria do Planejamento, Governo do Estado do Ceará, Fortaleza, p.22-23.

FERNANDES-FERREIRA, H. et al. **Crenças associadas a serpentes no estado do Ceará, Nordeste do Brasil**. *Sitientibus*, v. 11, n. 2, p. 153-163, 2012.

INSTITUTO CHICHO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Guia do visitante**. Acesso em: <08 de abril de 2017>. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/parnaubajara/guia-do-visitante.html>>.

JACOBI, P. R. **Meio ambiente e redes sociais: dimensões intersetoriais e complexidade na articulação das práticas coletivas**. *Revista de Administração Pública*. Rio de Janeiro: Fundação Getúlio Vargas, v. 34, n. 6, p. 131-158, 2000.

_____. **Educação ambiental: o desafio da construção de um pensamento crítico, complexo e reflexivo**. *Educação e pesquisa*, v. 31, n. 2, 2005

PAZINATO, D. M. M. **Estudo etnoherpetológico: Conhecimentos populares sobre anfíbios e répteis no município de Caçapava do Sul, Rio Grande do Sul**. 2013. Monografia de Especialização - UFSM, Santa Maria.

POUGH, F.H., et al. **Herpetology**. Prentice Hall, New Jersey. 2001.

RIBEIRO DE MOURA, M. et al. **O relacionamento entre pessoas e serpentes no leste de Minas Gerais, sudeste do Brasil**. *Biota Neotropica*, v. 10, n. 4, 2010.

SILVA, M.V. **Serpentes do Estado do Acre: riqueza, dieta, etnoconhecimento e acidentes ofídicos**. 2006. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Acre, Rio Branco.

VIZOTTO, L.D. 2003. **Serpentes: lendas, mitos, superstições e crendices**. Plêiade, São Paulo.

SOBRE A ORGANIZADORA

DAIANE PATRICIA OLDIGES Possui graduação em Biomedicina pela Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (2010), com habilitação em Análises Clínicas e Bioquímica. Mestre (2011) e doutora (2016) pelo programa de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com período de estágio sanduíche na Washington State University (Pullman - WA). Seu foco de pesquisa é a caracterização de proteínas com potencial uso no desenvolvimento de vacinas contra o carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*, bem como na manipulação gênica do protozoário *Babesia bovis* no intuito de utilizá-lo como plataforma vacinal.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-85107-61-1



9 788585 107611