

JONAS FERRARI MORAIS

**AS SERPENTES *Bothrops* WAGLER, 1824 (VIPERIDAE) DA
ZONA DA MATA MINEIRA: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE
FATORES ABIÓTICOS SOBRE AS POPULAÇÕES DA REGIÃO,
OFIDISMO E CARACTERIZAÇÃO TOXICOLÓGICA DAS
PEÇONHAS DAS ESPÉCIES**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Biologia Animal para a
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M827s
2017

Morais, Jonas Ferrari, 1990-
As serpentes Bothrops Wagler, 1824 (Viperidade) da Zona da Mata Mineira : análise da influência de fatores abióticos sobre as populações da região, ofidismo e caracterização toxicológica das peçonhas das espécies / Jonas Ferrari Moraes. – Viçosa, MG, 2017.

xiii, 70f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Renato Neves Feio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Cobras venenosas - Veneno. 2. Jararaca (Cobra).
 3. Toxicologia. 4. Populações animais - Fatores climáticos.
- I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-graduação em Biologia Animal.
II. Título.

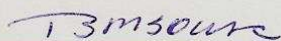
CDD 22 ed. 597.963

JONAS FERRARI MORAIS

AS SERPENTES *Bothrops* WAGLER, 1824 (VIPERIDAE) DA ZONA DA MATA MINEIRA: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS SOBRE AS POPULAÇÕES DA REGIÃO, OFIDISMO E CARACTERIZAÇÃO TOXICOLÓGICA DAS PEÇONHAS DAS ESPÉCIES

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 12 de maio de 2017.



Bernadete Maria de Sousa



Leandro Licursi de Oliveira



Renato Neves Feio
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Da elaboração do projeto, passando por todo o trabalho de pesquisa e laboratório, até a discussão dos resultados, muitas pessoas participaram do processo que resultou nesta Dissertação. Percebo hoje que, de diferentes formas, cada pessoa teve sua importante contribuição.

Agradeço profundamente as seguintes pessoas:

Ao amigo e orientador **Renato Neves Feio**, pelas inúmeras vezes que me auxiliou em todas as fases do estudo, por seus comentários e revisões no texto, por estar ao meu lado sempre que precisei e principalmente por dividir comigo estes dois anos de pesquisa. É claro pela oportunidade que me deu de aprimoramento profissional;

Assim como ao amigo e co-orientador **Oswaldo Pinto Ribeiro Filho**, por me co-orientar neste período, com paciência e conhecimento, por disponibilizar material e recurso financeiro, pelos comentários, sugestões e críticas em todos os momentos em que precisei;

Ao professor **Leandro Licursi de Oliveira**, que abriu as portas de seu laboratório e me recebeu com todo o acolhimento, me instruindo e ensinando durante todo o período em que passamos juntos, sempre com muita animação e vontade. Foi alguém inspirador como profissional para mim;

Ao professor **Paulo Roberto Cecon** e minhas amigas **Jerusa de Oliveira** e **Pollyanna Alves de Barros**, por me auxiliarem nas análises estatísticas dos artigos;

Ao professor **Sérgio Damata** e equipe, por ter aberto as portas de seu laboratório e me auxiliado nas análises histológicas;

Aos amigos **Thiago Mariani** e **Carla da Silva G.**, por todo o apoio nas análises e elaboração das pranchas fotográficas dos artigos. Vocês foram demais;

A toda a equipe do laboratório do **Beagle**, em especial as minhas amigas e "chefes" **Cynthia** e **Ariana**, e ao professor **Jorge Dergan** por me receber tão bem no laboratório, sempre dando sugestões e críticas nos momentos em que precisei;

A todos os professores que de alguma forma contribuíram com minha formação com seus conselhos e ensinamentos;

A **DSc. Williams Pinto Marques Ferreira** e a equipe da EPAMIG, por me auxiliarem na elaboração dos mapas;

Aos funcionários curadores responsáveis pelas coleções herpetológicas que visitei durante minha pesquisa. Locais estes onde fui extremamente bem recebido;

Agradeço à **SOS Mata Atlântica**, ao **Ministério da Saúde** e ao **Instituto Nacional de Meteorologia (INMET)** por gentilmente cederem os dados para minha pesquisa;

Agradeço imensamente ao **Departamento de Biologia Animal**, que através de sua pós-graduação, me concedeu a oportunidade de crescer profissionalmente e aprender muito nesses dois anos;

A todos os amigos que fiz no **Museu de Zoologia João Moojen**, local onde jamais esquecerei, pois aprendi muito com todos que conheci nestes dois anos de vivência. Um local especial que jamais irei esquecer e quero voltar muitas vezes para rever a todos;

Um agradecimento especial aos amigos **Anderson Marcos (Tibeição)**, **Clodoaldo Lopes**, **Douglas Silva**, **Fred Machado**, **Henrique Folly** e **Pedro Rocha (Toshibinha)**, por todo o companheirismo, apoio, ensinamentos e experiências. Espero manter nossas amizades para vida toda. NHAC!;

Aos meus pais, **Geraldo de Assis Fernandes Moraes** e **Regina Célia Ferrari Moraes**, pela paciência, apoio, amor, carinho, e principalmente, por confiar em minha capacidade;

A meus irmãos, parentes e amigos pelo apoio dado durante essa jornada de dois anos;

A minha companheira, amiga, e amor, **Gabriella F. Calçado**. Pois sem você nada disso teria sentido, pois foi seu apoio e incentivo que me fizeram querer ir além;

Agradeço à banca examinadora, professor **Leandro Licursi de Oliveira** e professora **Bernadete Maria de Sousa**, por aceitarem com tanta simpatia o convite e porque sei que vão contribuir para a melhoria deste trabalho;

Assim, agradeço a **todos** que de alguma forma cooperaram para o desenvolvimento deste mestrado. Muito obrigado!

"As espécies que sobrevivem não são o mais forte ou as mais rápidas, nem mesmo as mais inteligentes; mas sim aquelas que se adaptam melhor às mudanças."

-Charles Darwin

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIACÕES.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERÊNCIAS.....	3
3. A INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS SOBRE A POPULAÇÕES DE SERPENTES DO GÊNERO <i>Bothrops</i> WAGLER, 1824 (VIPERIDAE), OCORRENTES NA REGIÃO DA ZONA DA MATA MINEIRA MINAS GERAIS, BRASIL.....	4
1. RESUMO.....	5
2. ABSTRACT	6
3. INTRODUÇÃO	7
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
4.1 CONJUNTO DE DADOS DE ESPÉCIES	11
4.2 LEVANTAMENTO DAS VARIÁVEIS PREDITORAS	11
4.3 ANÁLISE DE DADOS	12
5. RESULTADOS	14
6. DISCUSSÃO	22
7. CONCLUSÃO.....	26
8. REFERÊNCIAS.....	27
9. APÊNDICES.....	34
4. COMPARAÇÃO DA TOXICIDADE DOS VENENOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Bothrops</i> (WAGLER, 1824) (SERPENTES: VIPERIDAE) NA ZONA DA MATA MINEIRA, MINAS GERAIS, BRASIL.....	40
1. RESUMO.....	40
2. ABSTRACT	40
3. INTRODUÇÃO	43
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1. ESPÉCIES E VENENOS	45

4.2. ANIMAIS.....	45
4.3. ANÁLISE ELETROFORÉTICA	45
4.4. ANÁLISE QUANTITATIVA DE PROTEÍNAS	45
4.5. ESTIMATIVA DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA	46
4.6. ESTIMATIVA DA ATIVIDADE DE INDUÇÃO DE EDEMA.....	46
4.7. ESTIMATIVA DA ATIVIDADE NECROSANTE.....	46
4.8. ATIVIDADE COAGULANTE EM PLASMA HUMANO	47
4.9. ATIVIDADE HEMOLÍTICA DIRETA.....	47
4.10. ESTIMATIVA DA ATIVIDADE DE FOSFOLIPASE A2.....	47
4.11. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SOBRE CASEÍNA	47
4.12. ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE	48
4.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5. RESULTADOS	49
5.1. ELETROFORESE	49
4.2. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	49
4.3. ATIVIDADE COAGULANTE EM PLASMA HUMANO	50
4.4. ESTIMATIVA DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA	51
4.5. ESTIMATIVA DA ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA	52
4.6. ESTIMATIVA DA ATIVIDADE NECROSANTE.....	57
4.7. ATIVIDADE HEMOLÍTICA DIRETA.....	54
4.8. ESTIMATIVA DA ATIVIDADE DE FOSFOLIPASE A2.....	54
4.9. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SOBRE CASEÍNA	55
4.10. ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE	55
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÃO.....	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
5. CONCLUSÃO GERAL	70

LISTA DE FIGURAS

3. A INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS SOBRE A POPULAÇÕES DE SERPENTES DO GÊNERO *Bothrops* WAGLER, 1824 (VIPERIDAE), OCORRENTES NA REGIÃO DA ZONA DA MATA MINEIRA MINAS GERAIS, BRASIL

Figura 01. Em vermelho a mesorregião da Zona da Mata Mineira, Minas Gerais, Brasil (Fonte: IBGE)..... 09

Figura 02. Registros de serpentes do gênero *Bothrops* em toda a região da ZMM, por microrregião. Em tons de verde, os municípios que apresentaram maior número de registros de acordo com a escala da legenda..... 14

Figura 03. Distribuição das espécies de *Bothrops* na Zona da Mata Mineira. O maior número de registros foi feito na microrregião de Viçosa..... 15

Figura 04. Distribuição dos registros de serpentes *Bothrops* em relação ao gradiente altitudinal 16

Figura 05. Agrupamento das microrregiões da ZMM após análise de Tocher. As microrregiões de Ubá e Cataguases se diferenciam das demais pelo regime pluviométrico apresentado..... 16

Figura 06. Distribuição dos registros de serpentes em relação a temperatura máxima anual e precipitação anual. A ZMM apresenta a temperatura máxima anual homogênea enquanto que a precipitação anual varia bastante por toda a região no eixo nordeste sudoeste..... 17

Figura 07. ACP com a utilização das variáveis ofidiofauna (PC1) e antropismo (CP2). Novamente as microrregiões de Ubá e Cataguases são influenciadas pelos valores de precipitação total. A microrregião de Manhuaçu é fortemente influenciada pelos valores de AOF e DCV..... 19

Figura 08. Mapa de cobertura vegetal da ZMM em 2015, com distribuição de acidentes ofídicos por município e registros de capturas de serpentes. A cobertura vegetal é quase inexistente em grande parte da ZMM..... 20

Figura 09. ACP com a utilização das variáveis antropismo (CP2) e temperatura ideal (PC3). Os resultados se mostraram melhor agrupados a utilização destas variáveis..... 21

Figura 10. Relação entre AOF e TPMAX para todas as microrregiões, entre 2001 e 2015. Nem sempre as temperaturas mais altas tem relação direta com o aumento de acidentes..... 21

Figura 11. Análise discriminante para agrupamento de AOF. Observamos que PCt apresenta uma relação negativa com o aumento de casos de acidentes botrópicos, enquanto que DCV tem relação positiva..... 21

4. COMPARAÇÃO DA TOXICIDADE DOS VENENOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Bothrops* (WAGLER, 1824) (SERPENTES: VIPERIDAE) NA ZONA DA MATA MINEIRA, MINAS GERAIS, BRASIL

Figura 01. Perfil proteico das amostras de veneno analisadas.....	49
Figura 02. Evolução da atividade coagulante de plasma das amostras dentro de um intervalo de tempo (15 min). A amostra de <i>B. neuwiedi</i> apresentou uma curva diferente em relação as demais, com sobreposição de atividade anticoagulante.....	50
Figura 03. Medida dos alos hemorrágicos em cm ² . <i>Bothrops cf. jararaca</i> apresentou resultados que se destacam das demais.....	51
Figura 04. Fotografia dos alos hemorrágicos das amostras analisadas.....	52
Figura 05. Atividade edematogênica das amostras analisadas. Todas as amostras apresentaram altos valores.....	53
Figura 06. Patas usadas para medir a ação edematogênica amostras.....	53
Figura 07. Atividade hemolítica direta. Destaque para a atividade apresentada pela amostra de <i>Bothrops moojeni</i>	54
Figura 08. Atividade fosfolipásica. <i>Bothrops jararaca</i> e <i>Bothrops moojeni</i> apresentaram os maiores valores.....	55
Figura 09. Atividade proteolítica sobre a caseína. <i>Bothrops jararacussu</i> apresentou diferença significativa em relação a <i>B. moojeni</i>	56
Figura 10. Atividade hemaglutinante. Apenas <i>B.jararaca</i> e <i>B. neuwiedi</i> apresentaram resultado positivo.....	56
Figura 11. Corte longitudinal. Região periférica de tecido conjuntivo e epitelial de pata, comparando a atividade necrosante das amostras.....	58
Figura 12. Corte longitudinal. Região de fibras musculares esqueléticas de pata, comparando a atividade necrosante das amostras.....	58
Figura 13. Corte transversal. Almofada da pata, comparando a atividade necrosante das amostras.	58

LISTA DE TABELAS

3. A INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS SOBRE A POPULAÇÕES DE SERPENTES DO GÊNERO *Bothrops* WAGLER, 1824 (VIPERIDAE), OCORRENTES NA REGIÃO DA ZONA DA MATA MINEIRA MINAS GERAIS, BRASIL

Tabela 01: Coeficiente de correlação entre as espécies de serpentes *Bothrops* registradas na Zona da Mata Mineira..... 15

Tabela 02: Valores médios (com desvio padrão), das variáveis preditoras para todas as microrregiões e para a Zona da Mata Mineira como um todo. Os valores representam a média entre os anos de 2001 a 2015..... 18

Tabela 03: Correlações entre todas as variáveis analisadas, após aplicação da análise de CPP (Correlações paramétricas de Pearson). A relação entre as variáveis mostrou-se significativa apenas entre TPMIN e AOF, UMD e NWD. A relação entre Nan e MJN não foi considerada devido a baixa amostragem de MJN.. 18

LISTA DE ABREVIATÖES

3. A INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS SOBRE A POPULAÇÕES DE SERPENTES DO GÊNERO *Bothrops* WAGLER, 1824 (VIPERIDAE), OCORRENTES NA REGIÃO DA ZONA DA MATA MINEIRA MINAS GERAIS, BRASIL

ZMM - Zona da Mata Mineira

SINAN - Sistema nacional de Agravos de Notificação

TPMAX - Temperatura máxima

TPMIN - Temperatura mínima

UMD - Umidade do ar

Pct - Precipitação total

ISt - Insolação total

DCV - Decremento de cobertura vegetal

AOF - Acidentes ofídicos

NAN - Número de animais

NSP - Número de espécies

JCA - *Bothrops jararaca*

JCU - *Bothrops jararacussu*

NWD - *Bothrops neuwiedi*

MJN - *Bothrops moojeni*

ATN - *Bothrops alternatus*

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia

BDMEP - Banco de dados meteorológicos para ensino e pesquisa

CPP - Correlações paramétricas de Pearson

ACP - Análise de componentes principais

4. COMPARAÇÃO DA TOXICIDADE DOS VENENOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Bothrops* (WAGLER, 1824) (SERPENTES: VIPERIDAE) NA ZONA DA MATA MINEIRA, MINAS GERAIS, BRASIL

B. jca - *Bothrops jararaca*

B. jssu - *Bothrops jararacussu*

B. nwd - *Bothrops neuwiedi*

B. mjn - *Bothrops moojeni*

B. cf. jca - *Bothrops cf. jararaca*

RESUMO

MORAIS, Jonas Ferrari, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2017. **As serpentes *Bothrops wagler*, 1824 (viperidae) da Zona da Mata Mineira: análise da influência de fatores abióticos sobre as populações da região, ofidismo e caracterização toxicológica das peçonhas das espécies.** Orientador: Renato Neves Feio. Coorientador: Oswaldo Pinto Ribeiro Filho.

A Zona da Mata Mineira é uma das doze mesorregiões do estado brasileiro de Minas Gerais. Seu relevo é caracterizado pelo predomínio de colinas e vales, com altitudes variando de 1.889m até 100m. O clima é tropical, com médias térmicas anuais entre 24° C e 14° C, com valores anuais da pluviosidade de 3500mm. A vegetação nativa de Mata Atlântica, hoje se encontra com apenas 3% de sua cobertura original. As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por mais de 90% dos acidentes ofídicos no Brasil. Seu veneno contém uma mistura complexa de proteínas e peptídeos, de ações proteolítica, necrosante, coagulante, hemorrágica e nefrotóxica. Para analisar a relação entre fatores abióticos e a ocorrência de serpentes do gênero *Bothrops* na Zona da Mata Mineira, foram coletados dados coleções herpetológicas, estações meteorológicas, e acrescentados dados de fragmentação de habitat e da topografia regional. Para as análises toxicológicas, foram comparadas as peçonhas das serpentes *Bothrops* ocorrentes na região, utilizando-se onze diferentes metodologias. As análises biogeográficas propiciaram o registro de cinco espécies de *Bothrops* na Zona da Mata Mineira. Os resultados indicaram que interações entre os diversos fatores abióticos e as espécies de *Bothrops*, podem refletir nas distribuições regionais das espécies. O número de registros apresentou relação com topografia regional, com maior volume próximos a fragmentos preservados em áreas mais elevadas. Foram observadas variações na composição dos venenos dentro do gênero e nos resultados da literatura para outras regiões amostradas. Em um aspecto mais amplo, observa-se que os fatores abióticos influenciam as populações de serpentes do gênero *Bothrops* tanto em aspectos comportamentais quanto na composição das toxinas, interagindo através do metabolismo destes animais.

ABSTRACT

MORAIS, Jonas Ferrari, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2017. **The snakes *Bothrops* Wagler, 1824 (viperidae) from Zona da Mata Mineira: analysis of the influence of abiotic factors on the populations of the region, snakebite and toxicological characterization of the venoms of species.** Adviser: Renato Neves Feio. Co-adviser: Oswaldo Pinto Ribeiro Filho.

Zona da Mata Mineira is one of the twelve mesoregions of the Brazilian state of Minas Gerais. Its relief is characterized by the predominance of hills and valleys, with altitudes varying from 1,889m to 100m. The climate is tropical, with annual thermal averages between 24 ° C and 14 ° C, with annual rainfall values of 3500mm. The native vegetation of the Atlantic Forest, today it is only 3% of its original cover. *Bothrops* snakes are responsible for more than 90% of ophidian accidents in Brazil. Its venom contains a complex mixture of proteins and peptides, proteolytic, necrotizing, coagulant, hemorrhagic and nephrotoxic. To analyze the relationship between abiotic factors and the occurrence of snakes of the genus *Bothrops* in the Zona da Mata Mineira, data were collected on herpetological collections, meteorological stations, and data on habitat fragmentation and regional topography were added. For the toxicological analyzes, the venoms of the *Bothrops* snakes occurring in the region were compared, using eleven different methodologies. The biogeographic analyzes allowed the registration of five species of *Bothrops* in the Zona da Mata Mineira. The results indicated that interactions between the different abiotic factors and the *Bothrops* species, may reflect in the regional distributions of the species. The number of records presented a relation with regional topography, with greater volume near fragments preserved in higher areas. Variations were observed in venom composition within the genus and in the literature results for other sampled regions. In a broader aspect, it is observed that abiotic factors influence the populations of *Bothrops* snakes both in behavioral aspects and in the composition of toxins, interacting through the metabolism of these animals.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As serpentes são importantes fontes de conhecimento do estado de conservação de regiões naturais, pois ocupam normalmente posição ápice em cadeias alimentares, exigindo assim uma oferta alimentar que sustente suas populações. Além disso, funcionam como excelentes bioindicadores de primitividade dos ecossistemas ou, por outro lado, de diferentes níveis de alteração ambiental (Moura-Leite *et al.*, 1993).

A família Viperidae, com cerca de 170 espécies distribuídas pelo Mundo, é formada por serpentes com aparelho inoculador do tipo solenóglifo (Belluomini, 1984). A identificação dos principais gêneros de Viperídeos pode ser feita com certa facilidade, utilizando caracteres morfológicos externos somados ao já mencionado. As serpentes do gênero *Bothrops* são caracterizadas por possuírem fosseta loreal (crotalíneos), e cauda sem maiores modificações geralmente com escamas subcaudais em pares (Willemse, 1978). Tem distribuição por toda a América do Sul, ocupando todos os biomas brasileiros.

A Zona da Mata Mineira é uma das doze mesorregiões do estado brasileiro de Minas Gerais, formada por 142 municípios agrupados em sete microrregiões. Situa-se na porção sudeste do estado, próxima à divisa dos estados do Rio de Janeiro e do Espírito Santo (Amorim e Ferreira, 2000). Segundo a classificação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a mesorregião da Zona da Mata é formada por sete microrregiões, sendo elas: Cataguases, Juiz de Fora, Manhuaçu, Muriaé, Ponte Nova, Ubá e Viçosa.

Seu relevo é caracterizado pelo predomínio de colinas e vales estreitos e algumas serras, onde as altitudes variam de 1.889m na região mais montanhosa até valores em torno dos 100m nos vales do Rio Pomba e Paraíba Sul. Em decorrência dessas altitudes, o clima tropical é quente, com médias térmicas anuais na casa dos 24° C para temperatura máxima e 14° C para temperatura mínima, além de valores anuais da pluviosidade variando entre 290mm e 320mm anuais (IBGE, 2015; Inmet, 2015).

A densa cobertura florestal, em suas condições originais, deu origem ao nome Zona da Mata. A vegetação nativa era a floresta tropical de Mata

Atlântica, que ligava as regiões serranas da vertente leste para o interior (Amorim e Ferreira, 2000).

Hoje essa vegetação se encontra quase totalmente inexistente, com apenas 3% de sua cobertura original. As matas restantes reduzem-se a pequenas manchas e fragmentos nas encostas íngremes e dentro de reservas, áreas de proteção permanente (APP) e parques estaduais. Apesar de sua composição florestal quase inexistente atualmente, está é propícia para a ocorrência de diversas espécies de serpentes, dentre elas as do gênero *Bothrops*, popularmente conhecidas como jararacas.

As espécies do gênero *Bothrops*, devido à ampla distribuição geográfica e abundância, são responsáveis por aproximadamente 90% dos acidentes ofídicos no Brasil (Ribeiro et al., 1998; Ministério da Saúde, 2001; Araújo et al., 2003; Mise et al., 2007; Oliveira et al., 2010). Sua peçonha é uma complexa mistura de substâncias, em sua maioria de natureza proteica, que podem interferir bruscamente na homeostase, atuando em diversos processos fisiológicos. De modo geral são constituídos de neurotoxinas, cardiotoxinas (citotoxinas), miotoxinas e fatores que alteram a hemóstase (incluindo as hemorraginas) (Meier e Stocker, 1995).

Pesquisas sobre as relações ambiente e populações são de grande importância. Acredita-se que onde a fragmentação artificial da paisagem prevalece e os usos da terra estejam mudando rapidamente, as espécies serão incapazes de migrar a uma taxa suficiente para acompanhar as mudanças no meio abiótico (Pearson e Dawson, 2003). O conhecimento sobre estas relações são de grande importância para a compreensão das respostas dos organismos às mudanças no meio em que habitam.

Além disso, variações interespecíficas nos venenos de serpentes de mesmo gênero estão bem documentadas (Chippaux et al., 1991). Essa variabilidade pode se dar por exemplo, por idade, sexo, dieta e distribuição geográfica, variando até mesmo dentro da mesma espécie. Com as mudanças acontecendo no meio abiótico onde as serpentes habitam, é esperado que de algum modo estas mudanças se reflitam na composição das toxinas destas serpentes.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, D. D., FERREIRA, M. E. Um estudo sobre a qualidade das águas do Rio Paraíba do Sul no Vale do Paraíba do Sul no período de 1978 a 1994. *Resumos do XIII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos*, Belo Horizonte, MG. 2000.

ARAÚJO, F. A. A.; SANTA LÚCIA, M. & CABRAL, R. F. (2003). Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Pp. 6-12, SP.

BELLUOMINI, H. E. Conhecimentos sobre as serpentes brasileiras e medidas de prevenção de acidentes. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, 12(45):82-96, 1984.

CHIPPAUX JP, WILLIAMS V, WHITE J. (1991). Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 29 (11): 1279-303.

MEIER, J.S., STOCKER, K.F. (1995). Biology and distribution of venoms snake of medical importance and the composition of snake venoms. *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*. Meier, J.S., White, J. Boca Raton, CRC Press: 367.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2001). Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. *Brasília*:131.

MISE, Y.F., LIRA-DA-SILVA, R.M., and CARVALHO, F.M. (2007). Envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* no Estado da Bahia: aspectos epidemiológicos e clínicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40:569-573.

MOURA-LEITE, J. C.; BÉRNILS, R.S. & MORATO, S.A.A. 1993. Método para a caracterização da herpetofauna em estudos ambientais. *Maia*, 2: 1-5.

OLIVEIRA, F.N., BRITO, M.T., MORAIS, I.C.O., FOOK, S.M.L., and ALBUQUERQUE, H.N. (2010). Accidents caused by *Bothrops* and *Bothropoides* in the State of Paraíba: epidemiological and clinical aspects. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43:662-667.

PEARSON RG, DAWSON TP (2003) Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimatic envelope models useful? *Global Ecology and Biogeography*, 12, 361-371.

RIBEIRO, L.A., ALBUQUERQUE, M.J., CAMPOS, V.A.F.P., KATZ, G., TAKAOKAN, Y., LEBRÃO, M.L., and JORGE, M.T. (1998). Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93. *Revista da Associação Médica Brasileira* 44:312-318.

WILLEMSE, G. T. Individual variation in snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology* (B), 61(4): 553-557, 1978.

ARTIGO 01

A INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS SOBRE A POPULAÇÕES DE SERPENTES DO GÊNERO *Bothrops* WAGLER, 1824 (VIPERIDAE), OCORRENTES NA REGIÃO DA ZONA DA MATA MINEIRA, MINAS GERAIS, BRASIL

Jonas Ferrari Morais

Orientador: Prof. Dr. Renato Neves Feio

VIÇOSA - MINAS GERAIS

- 2017 -

RESUMO

MORAIS, Jonas Ferrari, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2017. **A influência de fatores abióticos sobre a populações de serpentes do gênero *Bothrops* wagler, 1824 (Viperidae), ocorrentes na região da Zona da Mata Mineira, Minas Gerais, Brasil.** Orientador: Dr. Renato Neves Feio. Coorientador: Dr. Oswaldo Pinto Ribeiro Filho.

Componentes abióticos dos ecossistemas, como o regime pluviométrico, a temperatura, a umidade e o fotoperíodo, são variáveis ambientais que atuam, direta ou indiretamente, na história de vida de diferentes populações animais, em especial na estrutura das comunidades de serpentes. A Zona da Mata Mineira, uma das doze mesorregiões do estado Minas Gerais, sudeste do Brasil, situa-se no bioma Mata Atlântica, um dos hotspots de biodiversidade mundial. Apesar da baixa cobertura florestal remanescente, este bioma é propício para a ocorrência de diversas espécies de serpentes, dentre elas o gênero *Bothrops*, popularmente conhecido como jararacas. Para analisar a relação entre fatores abióticos e a ocorrência serpentes do gênero *Bothrops*, foram coletados dados das espécies em coleções herpetológicas de referência na região, e dados sobre fatores abióticos em estações meteorológicas ao longo de quinze anos (2001–2015). Foram acrescentados dados de fragmentação de habitat cedidos pela SOS Mata Atlântica, e dados da topografia regional. A análise dos dados propiciou o registro de cinco espécies de *Bothrops* na região (*B. jararaca*; *B. jaracussu*, *B. neuwiedii*, *B. moojeni* e *B. alternatus*). O clima se mostrou bastante diversificado, com variações de temperatura e precipitação. A análise de correlação apresentou resultados que indicam interações entre os diversos fatores abióticos e as espécies do gênero *Bothrops*, podendo refletir nas distribuições das espécies na região. A temperatura e a umidade foram os fatores climáticos mais relevantes na análise. O número de registros das diferentes espécies de jararaca apresentou relação com topografia regional. Tal fato, associado aos altos índices de desmatamento em áreas mais baixas, culminou com maior volume de registros próximos a fragmentos preservados, que se concentram nas regiões mais elevadas da Zona da Mata Mineira.

Palavras-chave: Jararacas; mudanças climáticas; Mata Atlântica; víboras.

ABSTRACT

MORAIS, Jonas Ferrari, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2017. **The influence of abiotic factors on the populations of snakes of the genus *Bothrops wagler*, 1824 (Viperidae), occurring in the region of Zona da Mata Mineira, Minas Gerais, Brazil.** Adviser: Dr. Renato Neves Feio. Co-adviser: Dr. Oswaldo Pinto Ribeiro Filho.

Abiotic components of ecosystems, such as pluviometric regime, temperature, humidity and photoperiod, are environmental variables that act, directly or indirectly, on the life history of different animal populations, especially in the structure of snake communities. Zona da Mata Mineira, one of the twelve mesoregions of Minas Gerais, southeastern Brazil, is located in the Mata Atlântica biome, one of the world's biodiversity hotspots. Despite the low forest cover remaining, this biome is suitable for the occurrence of several species of snakes, among them the genus *Bothrops*, popularly known as jararacas. To analyze the relationship between abiotic factors and the occurrence of snakes of the genus *Bothrops*, species data were collected from reference herpetological collections in the region, and data on abiotic factors in meteorological stations over fifteen years (2001-2015) were collected. Habitat fragmentation data provided by SOS Mata Atlântica and regional topography data were added. The analysis of the data allowed the registration of five species of *Bothrops* in the region (*B. jararaca*, *B. jaracussu*, *B. neuwiedii*, *B. moojeni* and *B. alternatus*). The climate was very diversified, with variations in temperature and precipitation. The analysis of correlation presented results that indicate interactions between the different abiotic factors and the species of the genus *Bothrops*, being able to reflect in the distributions of the species in the region. Temperature and humidity were the most relevant climatic factors in the analysis. The number of records of the different species of jararaca presented a relation with regional topography. This fact, associated to the high rates of deforestation in lower areas, culminated in a higher volume of records near preserved fragments, which are concentrated in the higher regions of the Zona da Mata Mineira.

Keywords: Jararacas; climate changes; Atlantic forest; Pit vipers.

1. INTRODUÇÃO

Variáveis ambientais são os componentes abióticos dos ecossistemas que atuam, direta ou indiretamente, através de interações biológicas, na história de vida de diferentes populações animais (Chesson, 2003; Smith e Smith, 2012). Diferentes comunidades ecológicas são afetadas de formas específicas por variações climáticas ao longo do tempo, levando a alterações na fenologia e na dispersão das populações (Root *et al* 2003; Hijmans and Graham, 2006). A compreensão dos fatores ecológicos e históricos envolvidos na formação das comunidades atuais podem fornecer informações valiosas sobre como as espécies respondem às variações climáticas de diferentes formas (bióticas e abióticas), sendo de importância fundamental para sua conservação (Hannah *et al.*, 2002; Cadle and Greene, 1993).

Dentre os diversos fatores abióticos existentes, destacam-se o regime pluviométrico, temperatura, umidade e o fotoperíodo, sendo estes, elementos atuantes na estrutura das comunidades de serpentes (e.g. Hau, 2001). Variações sazonais de temperatura (Marques, 1998) e índices pluviométricos (Martins, 1994), são variáveis importantes a serem consideradas em estudos sobre a distribuição de populações de serpentes. Contudo, a inserção de novas variáveis abióticas nas análises, tais como fotoperíodo, cobertura vegetal e umidade, podem refletir resultados diferentes do esperado, espelhando novos aspectos comportamentais destes animais antes não observados. A resposta comportamental de serpentes às variações ambientais pode elucidar melhor os potenciais das mudanças climáticas para a biodiversidade deste grupo em regiões temperadas (Whittaker *et al.*, 2005).

Pelo fato de serem ectotérmicas, as serpentes são particularmente mais sensíveis as variações de temperatura do ambiente (Deutsch *et al.*, 2008; Buckley, Hurlbert & Jetz, 2012; Araújo *et al.*, 2013). Espécies de regiões temperadas, como as florestas tropicais, podem apresentar maior sensibilidade a variações bruscas de temperatura (Gunderson, Stillman & Gunderson, 2015). Com isso, existe a hipótese de que as espécies ectotérmicas das regiões temperadas podem se dividir em "nichos climáticos", através de uma seleção do comportamento termorregulador e de tolerâncias fisiológicas (Moura *et al*, 2016¹).

Os Viperidae são uma família de serpentes encontradas em quase todo o mundo, apresentando denteção solenóglifa altamente especializada para inoculação do veneno. Os Crotalinae, representante exclusiva dessa família no Novo Mundo, são uma subfamília amplamente distribuída, possuindo a fosseta loreal como principal sinapomorfia. Incluso nesta subfamília está o gênero *Bothrops* Wagler, 1824 (Campbell e Lamar, 2004), objeto deste estudo. Com a maior representatividade de espécies na América do Sul (52), sendo que destas, 29 ocorrem no Brasil (Carrasco et al., 2012; Costa & Bérnils, 2015; Barbo et al., 2016).

Algumas espécies do gênero *Bothrops*, devido à ampla distribuição geográfica e abundância, associados a um comportamento defensivo tido como agressivo, favorecem a ocorrência de acidentes ofídicos, sendo responsáveis por aproximadamente 90% dos acidentes no Brasil (Ribeiro et al., 1998; Ministério da Saúde, 2001; Araújo et al., 2003; Mise et al., 2007; Waldez e Vogt, 2009; Oliveira et al., 2010). Apesar da baixa taxa de letalidade (em torno de 0,6% dos casos tratados) (Ministério da Saúde, 2001), as espécies do gênero *Bothrops* despertam tanto o temor pela comunidade, devido ao risco de acidentes, quanto o grande interesse por parte dos pesquisadores em sua história natural, comportamento ou mesmo pelas composição das toxinas presentes nos venenos destes animais.

A Zona da Mata Mineira é uma das doze mesorregiões do estado brasileiro de Minas Gerais, formada por 142 municípios agrupados em sete microrregiões. Situa-se na porção sudeste do estado, próxima à divisa dos estados do Rio de Janeiro e do Espírito Santo (Amorim e Ferreira, 2000) (Figura 01). A vegetação nativa era a floresta tropical de Mata Atlântica, que ligava as regiões serranas da vertente leste para o interior (Amorim e Ferreira, 2000). Sua composição florestal, mesmo que quase inexistente atualmente, é propícia para a ocorrência de diversas espécies de serpentes, dentre elas as do gênero *Bothrops*, popularmente conhecidas como jararacas.

A Mata Atlântica tem alta variação na estabilidade climática, apresentando diferentes regimes climatológicos dentro de sua distribuição. Na região que sobrem-se sobre a Zona da Mata mineira, apresenta verões chuvosos no sul (Grimm, 2003). A composição da fauna de serpentes do gênero *Bothrops* é melhor favorecida pelo clima da região (Carnaval et al.,

2014). As condições quentes e úmidas proporcionam mais oportunidades para a coexistência de espécies ao longo de gradientes ambientais em larga escala (MacArthur & Levins, 1967).

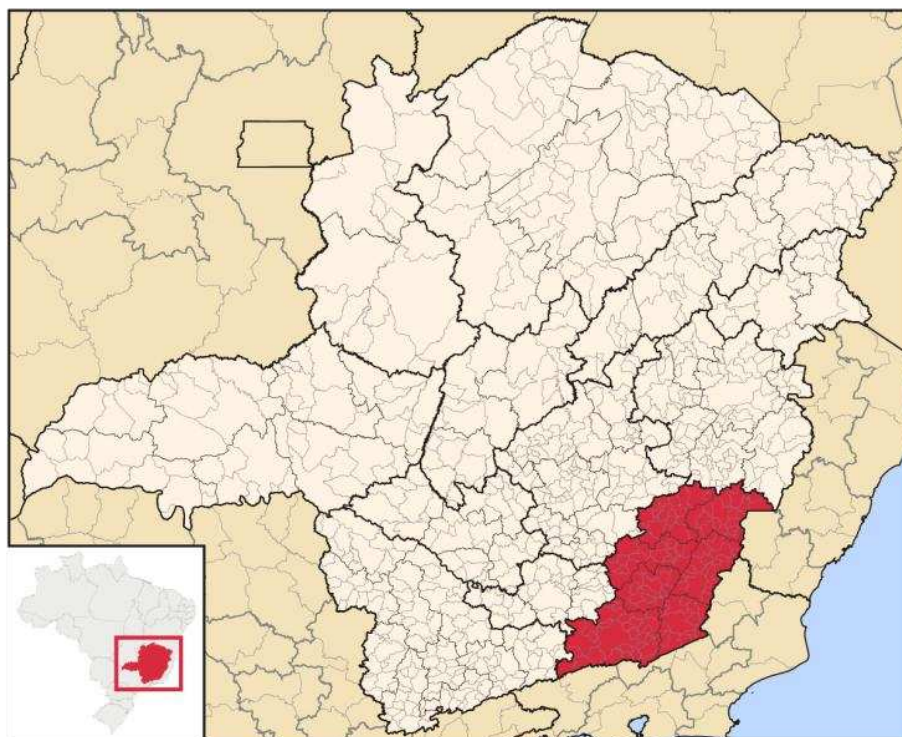


Figura 01: Em vermelho a mesorregião da Zona da Mata Mineira, Minas Gerais, Brasil (Fonte: IBGE).

A composição topográfica da região da Zona da Mata Mineira também é outro fator importante para a composição da população de serpentes do gênero *Bothrops*. A região abriga parcialmente duas importantes cadeias de montanhas sul-americanas (Serra do Mar e Serra da Mantiqueira). As altitudes variam de 1.889m na região mais montanhosa até valores em torno dos 100m nos vales do Rio Pomba e Paraíba Sul. Tal complexidade topográfica atua como uma barreira climática histórica na distribuição de serpentes (Moura et al., 2016²).

Aqui, investigou-se a relação existente entre fatores abióticos e a composição da população de serpentes do gênero *Bothrops*, dentro de uma região fragmentada do hotspot da Mata Atlântica (Zachos & Habel, 2011), a Zona da Mata Mineira, localizado no sudeste de Minas Gerais. Em contrapartida, foram analisados também a relação entre fatores abióticos e a distribuição das espécies do gênero com a distribuição de acidentes ofídicos na região da Zona da Mata Mineira.

Com isso, comparou-se o grau de influência de diferentes fatores abióticos sobre as populações do gênero, possivelmente influenciando a dispersão e a composição das comunidades de *Bothrops*, além do número de acidentes ofídicos registrados ao longo do período de estudo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Conjunto de dados de espécies

O conjunto de dados aqui utilizados abrange um compilado de informações entre anos de 2001 a 2015, coletadas nos acervos de cinco das nove coleções herpetológicas consultadas. São elas: Coleção Herpetológica do Museu de Zoologia João Moojen (Universidade Federal de Viçosa - UFV), Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Coleção Herpetológica da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e Coleção Herpetológica do Museu Nacional (Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ). Foram utilizados apenas os dados considerados satisfatórios, os quais continham no mínimo: Identificação da espécie, data, local da coleta, e quando possível georreferenciamento.

Utilizando os pontos de localização (latitude e longitude) de cada espécime registrado e/ou da localidade do registro da captura, modelou-se a distribuição geográfica potencial do gênero *Bothrops* ao longo de toda a região da Zona da Mata Mineira. Os modelos foram ajustados de acordo com as localidades conhecidas de cada espécie, e os dados serviram de base para a construção de mapas.

Dados sobre ofidismo botrópico (data, localidade e espécie) foram coletados junto ao SINAN (Sistema nacional de Agravos de Notificação), do Ministério da Saúde, de modo a relacionar seus registros na Zona da Mata Mineira com a distribuição de espécies e com outras variáveis.

2.2. Levantamento das variáveis preditoras

Foram utilizadas seis variáveis anuais para representar as condições ambientais da região de estudo: temperatura máxima média (TPMAX), temperatura mínima média (TPMIN), umidade relativa média (UMD), precipitação total (PCt), insolação total (ISt) e decréscimo da cobertura vegetal (DCV).

As variações climáticas TPMAX, TPMIN, UMD, PCt e ISt foram coletadas através do banco de dados do Banco de Dados Meteorológicos para

Ensino e Pesquisa (BDMEP), pertencente ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

O estudo da fragmentação de habitat natural do gênero *Bothrops* foi feita através da análise de dados referentes à vegetação da Zona da Mata mineira entre os anos de 2001 e 2015, cedidos pela SOS Mata Atlântica. Foram cedidas planilhas com informações de perda de cobertura vegetal nativa anual a nível de municípios e *shapes* para a compilação de mapas.

2.3. Análise de dados

Levou-se em conta que a falta de uma metodologia padronizada para os espécimes tombados nas coleções pode dificultar a interpretação dos resultados. Por isso analisamos os dados a nível de microrregião, subdividindo a região da Zona da Mata Mineira (ZMM) em sete microrregiões conforme dados do IBGE. São elas: Cataguases, Manhuaçu, Muriaé, Juiz de Fora, Ponte Nova, Viçosa e Ubá.

Espera-se que com isso, o volume de dados analisados oculte as falhas amostrais para algumas localidades, diminuindo assim o erro amostral. De modo geral, assumimos que as diferenças potenciais entre as microrregiões não estão relacionadas ao tipo de método de amostragem empregado.

Toda a análise estatística foi feita utilizando os programas PAST (Hammer et al., 2001) e SAEG (SAEG, 2007).

Para avaliar o grau de similaridade entre as microrregiões, inicialmente aplicou-se uma otimização por análise de agrupamento de Tocher, afim de analisar a distância euclideana entre o conjunto de dados de cada microrregião. Todas as variáveis preditoras foram analisadas, com a inclusão de mais sete variáveis complementares: acidentes ofídicos (AOF), número de espécies (NSP), número de animais (NAN) e espécies (*Bothrops jararaca* (JCA), *Bothrops jararacussu* (JCU), *Bothrops neuwiedi* (NWD), *Bothrops moojeni* (MJN) e *Bothrops alternatus* (ATN)).

Feito isso, analisou-se a média das variáveis e o desvio para cada microrregião e para a ZMM como um todo. Com isso, pode-se observar melhor o grau de variação entre as regiões.

Para analisar o grau de similaridade entre todas as variáveis, utilizou-se a técnica de Correlações paramétricas de Pearson (CPP), que compara as

variáveis individualmente umas com as outras, verificando uma possível influência direta entre elas. Buscamos verificar se existe alguma relação direta entre qualquer uma das variáveis preditoras com as variáveis complementares.

Utilizou-se o coeficiente de Correlações não-paramétricas de Spearman (CnPS), para analisar o grau de influência entre as variáveis espécies uma sobre as outras, com o interesse de avaliar o quanto a sobreposição de uma espécie pode influenciar a outra a longo de um período de tempo, positiva ou negativamente.

Observou-se um número alto de variáveis a serem analisadas, e com isso foi aplicada uma análise de componentes principais (ACP), de modo a reduzir o número de variáveis a uma quantidade mínima com maior grau de variância possível. Com isso, pôde-se analisar melhor os dados, com um menor número de variáveis possível.

Por fim, foram agrupados os acidentes ofídicos em sete categorias de acordo com o número de acidentes registrados por cidade: 0-50, 51-100, 101-150, 151-200, 201-250, 251-300 e 301-400. Após feito o agrupamento, aplicou-se uma análise discriminante de modo a agrupar as localidades com maior incidência de acidentes e verificar quais as variáveis preditoras que influenciam tal agrupamento.

Quanto à formulação dos mapas, utilizou-se a ferramenta ArcMap do programa ArcGIS 10.3.1. Os *shapes* utilizados para topografia, limites municipais, regionais e estaduais, foram conseguidos através do banco de dados do IBGE, e *shapes* de cobertura vegetal foram cedidos pela ONG SOS Mata Atlântica. Os dados de distribuição e fatores climáticos foram compilados com base nos dados levantados no presente estudo.

3. RESULTADOS

Após o levantamento dos dados nas coleções, encontrou-se um total de 431 registros para o gênero *Bothrops* divididos em cinco espécies: *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi*, *B. moojeni* (n=1) e *B. alternatus* (n=1) (Figura 02). As duas últimas são aqui tratadas como registros incertos umas vez que não apresentam mais do que um registro nas coleções ao longo dos últimos quinze anos para toda a região da ZMM.

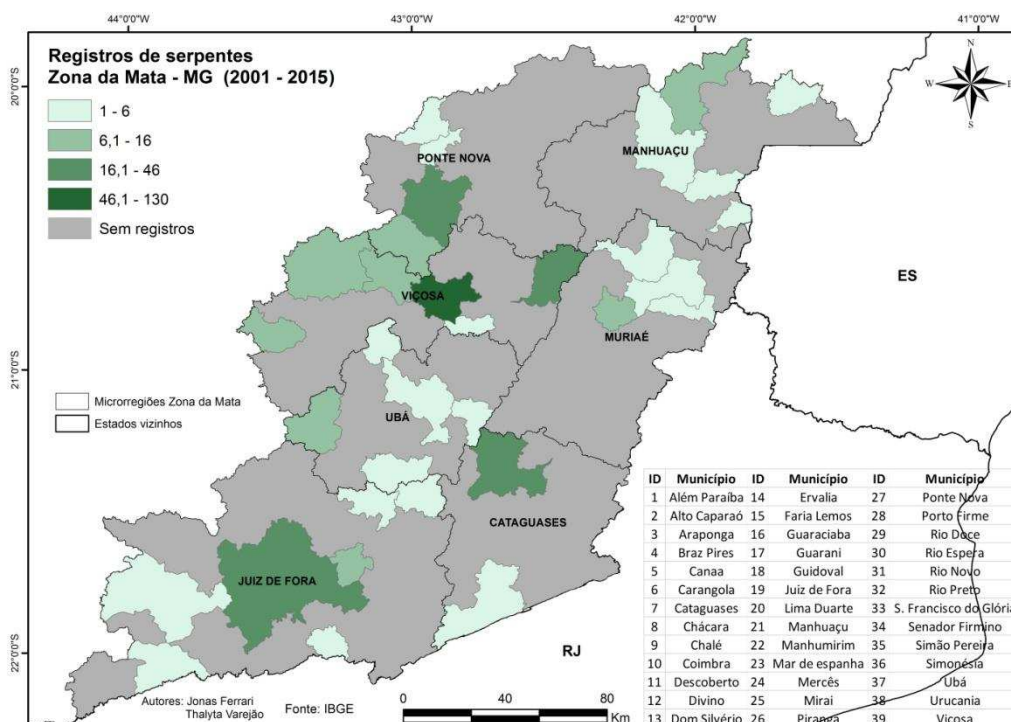


Figura 02: Registros de serpentes do gênero *Bothrops* em toda a região da ZMM, por microrregião. Em tons de verde, os municípios que apresentaram maior número de registros de acordo com a escala da legenda.

A correlação de Spearman mostrou uma relação positiva entre as espécies de *B. jararaca* e *B. jararacussu* (Tabela 01). Estas duas espécies, apesar de registradas apenas em três microrregiões, ocupam quase toda a região da ZMM em simpatria. No presente estudo foi registrada a presença de *B. jararacussu* na faixa norte da ZMM, assim como o único registro de *B. moojeni*. Em relação as espécies *B. neuwiedi* e *B. alternatus* (também com apenas um registro), ambas apresentam registros para a faixa sul da ZMM, apenas na microrregião de Juiz de Fora. *Bothrops jararaca* apresenta ampla distribuição por toda a região da ZMM, como já era esperado, assim como o maior número de registros (371 registros) (Figura 03).

Tabela 01: Coeficiente de correlação entre as espécies de serpentes *Bothrops* registradas na ZMM. Leg.: B. jararaca (JCA), B. jararacussu (JCU), B. neuwiedi (NWD), B. moojeni (MJN), B. alternatus (ATN).

	JCA	JCU	NWD	MJN	ATN
JCA	1	*0,23	0,08	0,07	0,25
JCU		1	0,005	*0,2	-0,04
NWD			1	-0,02	0,43
MJN				1	-0,01
ATN					1

* P < 0,05

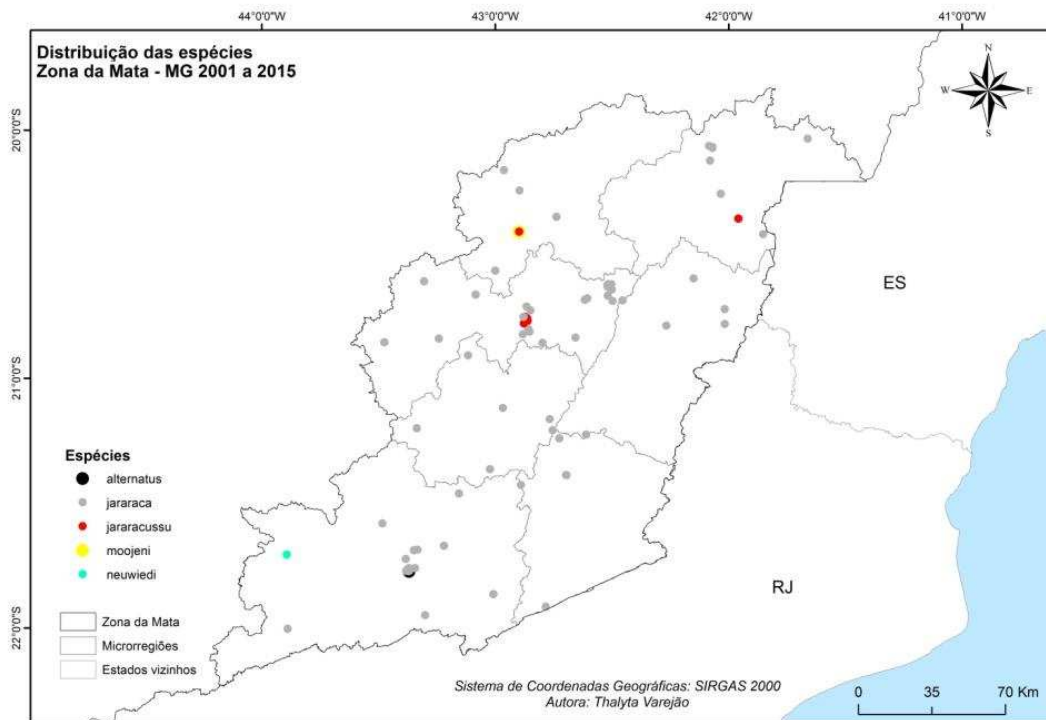


Figura 03: Distribuição das espécies de *Bothrops* na Zona da Mata Mineira. O maior número de registros foi feito na microrregião de Viçosa.

No que diz respeito ao gradiente altitudinal, segundo nossa amostragem, as serpentes *Bothrops* aparentam ter a tendência a locais com a altitude variando entre 500 e 1000 metros (Figura 04).

A análise de agrupamento de Tocher reuniu as microrregiões da ZMM em três subgrupos, de acordo com seu grau de similaridade das variáveis analisadas (Figura 05). As regiões se agruparam principalmente devido a precipitação total anual (Pct) e acidentes ofídicos (AOF).

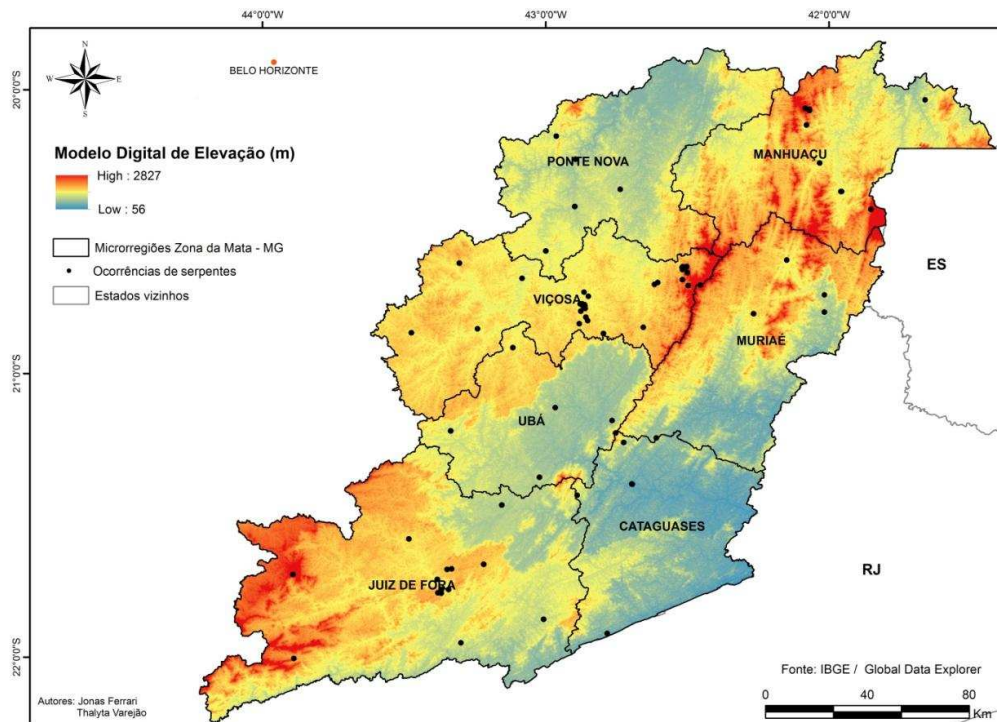


Figura 04: Distribuição dos registros de serpentes *Bothrops* em relação ao gradiente altitudinal.

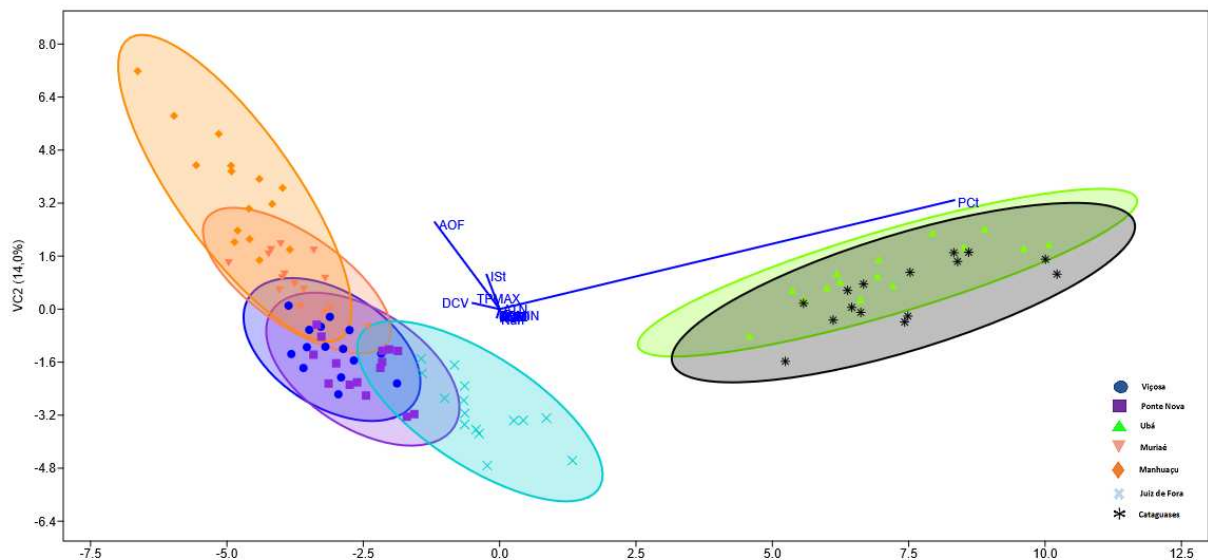


Figura 05: Agrupamento das microrregiões da ZMM após análise de Tocher. As microrregiões de Ubá e Cataguases se diferenciam das demais pelo regime pluviométrico apresentado.

A média e o desvio padrão para cada variável avaliada, foi compilada em uma tabela dividida por microrregião, com o valor médio de todas as variáveis também para ZMM como um todo (Tabela 02).

A análise de CPP mostrou uma relação positiva para acidentes ofídicos e o aumento de temperatura máxima, assim como para umidade e presença da espécie *Bothrops neuwiedi*. No caso dos acidentes ofídicos, observa-se claramente essa diferença comparando as regiões de Juiz de Fora (14,7 AOF/ano) e Manhuaçu (201,3 AOF/ano), nos extremos norte e sul da ZMM (Figura 06).

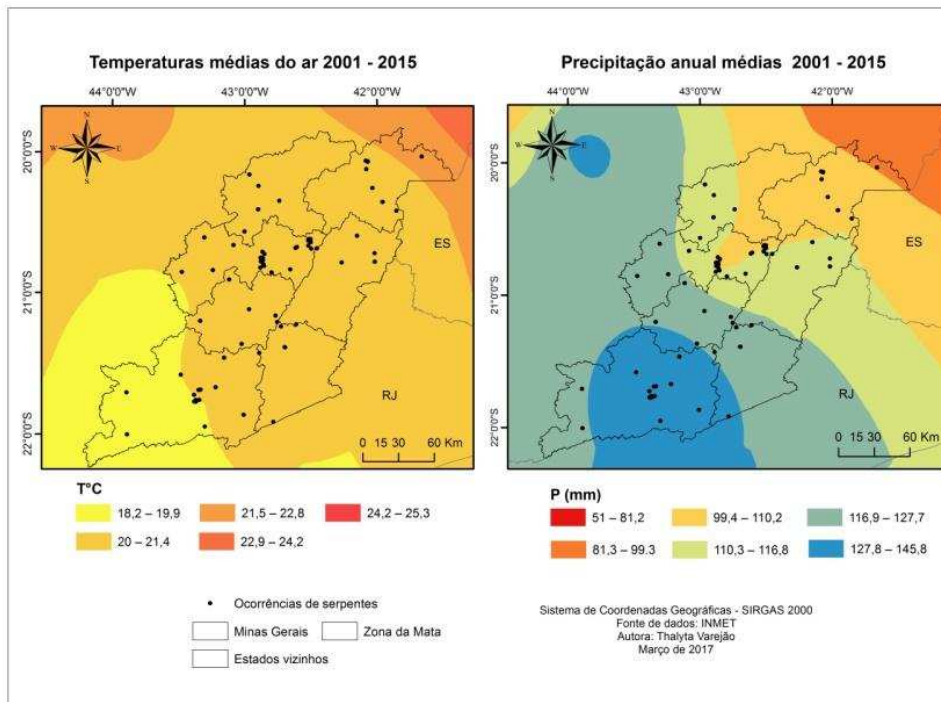


Figura 06: Distribuição dos registros de serpentes em relação a temperatura máxima anual e precipitação anual. A ZMM apresenta a temperatura máxima anual homogênea enquanto que a precipitação anual varia bastante por toda a região no eixo nordeste sudoeste.

Tabela 02: Valores médios (com desvio padrão), das variáveis predictoras para todas as microrregiões e para a Zona da Mata Mineira como um todo. Os valores representam a média entre os anos de 2001 a 2015.

Microrregião	TPMAX	$\pm\sigma$	TPMIN	$\pm\sigma$	UMD	$\pm\sigma$	Ist	$\pm\sigma$	Pct	$\pm\sigma$	DCV	$\pm\sigma$	NSP	$\pm\sigma$	Nan	$\pm\sigma$	AOF	$\pm\sigma$
Viçosa	22,99	$\pm 2,20$	13,14	$\pm 1,53$	63,38	$\pm 8,36$	176,28	$\pm 24,37$	109,27	$\pm 21,04$	40,9	$\pm 40,78$	1,46	$\pm 0,52$	16,67	$\pm 14,38$	64,87	$\pm 17,03$
Ponte Nova	22,99	$\pm 2,20$	13,14	$\pm 1,53$	63,38	$\pm 8,36$	176,28	$\pm 24,37$	109,27	$\pm 21,04$	40,11	$\pm 32,61$	1,33	$\pm 0,97$	3,26	$\pm 2,94$	33,87	$\pm 8,55$
Ubá	21,15	$\pm 1,12$	13,81	$\pm ,97$	60,51	$\pm 4,30$	169,99	$\pm 10,63$	693,25	$\pm 106,06$	9,11	$\pm 11,47$	0,4	$\pm 0,50$	2,93	$\pm 5,06$	33,87	$\pm 9,51$
Muriaé	25,09	$\pm 3,04$	15,64	$\pm 2,48$	57,25	$\pm 8,55$	198,35	$\pm 14,45$	102,11	$\pm 16,99$	15,73	$\pm 11,64$	0,47	$\pm 0,51$	4	$\pm 7,84$	72,73	$\pm 20,58$
Manhuaçu	21,79	$\pm 2,42$	12,32	$\pm 1,68$	63,96	$\pm 8,20$	193,35	$\pm 16,52$	110,12	$\pm 22,96$	71,92	$\pm 45,13$	0,47	$\pm 0,64$	1,33	$\pm 2,77$	201,33	$\pm 67,81$
Juiz de Fora	15,37	$\pm 1,97$	12,64	$\pm 1,19$	60,9	$\pm 7,89$	135,33	$\pm 27,44$	207,97	$\pm 31,81$	43,61	$\pm 47,69$	1,33	$\pm 0,72$	10,86	$\pm 14,19$	65,73	$\pm 15,72$
Cataguases	21,15	$\pm 1,12$	13,81	$\pm 0,97$	60,51	$\pm 4,30$	169,99	$\pm 10,63$	693,25	$\pm 106,06$	11,5	$\pm 15,31$	0,46	$\pm 0,64$	1,8	$\pm 2,78$	14,73	$\pm 3,69$
Zona da MATA	21,5	$\pm 3,49$	13,5	$\pm 1,82$	61,42	$\pm 7,47$	174,22	$\pm 26,79$	289,32	$\pm 265,42$	33,27	$\pm 38,18$	0,84	$\pm 0,79$	5,84	$\pm 9,92$	69,59	$\pm 63,91$

Tabela 03: Correlações entre todas as variáveis analisadas, após aplicação da análise de CPP (Correlações paramétricas de Pearson). A relação entre as variáveis mostrou-se significativa apenas entre TPMIN e AOF, UMD e NWD. A relação entre Nan e MJN não foi considerada devido a baixa amostragem de MJN.

	TPMAX	TPMIN	UMD	Ist	Pct	DCV	NSP	Nan	AOF	JCA	JCU	NWD	MJN	ATN
TPMAX	1	0,39	0,08	0,53	0,16	0,09	-0,12	-0,06	0,004*	-0,18	0,17	-0,29	0,02	-0,1
TPMIN		1	-0,06	0,27	0,1	-0,25	-0,1	0,02	-0,3	-0,02	-0,11	-0,03	-0,11	-0,08
UMD			1	0,04	-0,08	0,12	0,21	0,17	0,11	0,15	0,2	0,0007**	0,13	0,02
Ist				1	-0,18	-0,02	-0,3	-0,21	0,16	-0,23	-0,1	-0,3	-0,11	-0,16
Pct					1	-0,37	-0,29	-0,18	-0,45	-0,2	-0,26	-0,09	-0,07	-0,02
DCV						1	0,2	0,03	0,52	0,11	0,31	-0,05	-0,01	-0,04
NSP							1	0,55	-0,11	0,8	0,68	0,38	0,27	0,27
Nan								1	-0,03	0,48	0,2	0,38	0,002*	0,36
AOF									1	-0,07	-0,11	-0,58	-0,03	-0,01
JCA										1	0,26	0,1	0,08	0,08
JCU											1	0,01	0,2	-0,05
NWD												1	-0,02	0,44
MJN													1	-0,01
ATN														1

** p < 0,01 * P < 0,05

Outras variáveis mostraram ter uma relação próxima podendo estar sendo influenciadas pela amostragem, como por exemplo o número de animais (NAN) em relação à temperatura mínima (TPMIN) e declínio de cobertura vegetal (DCL), e temperatura mínima (TPMIN) em relação a espécie *Bothrops jararaca* (JCA) (Tabela 03).

Quanto à análise de componentes principais (ACP), após feitos os procedimentos chegou-se a três variáveis explicativas para nossa análise. São elas: ofidiofauna (23,2%), antropismo (15,5%) e temperatura ideal (12,9%). Cada uma delas apresenta um agrupamento específico de variáveis que contribuem para sua porcentagem de valor explicativo, e com isso foram nomeadas seguindo essas variáveis.

Quando utilizadas as duas primeiras variáveis (ofidiofauna + antropismo) para explicar o arranjo das microrregiões e das variáveis, observa-se que existem algumas relações incomuns de certo ponto (Figura 07). Por exemplo, o crescimento do número de animais e do número de espécies é diretamente proporcional ao crescimento do número espécimes de *Bothrops jararaca* e inversamente proporcional ao aumento da temperatura máxima e insolação total. Apesar disso, o agrupamento das microrregiões não sofre muitas alterações, sendo parecido aos resultados vistos na figura 05.

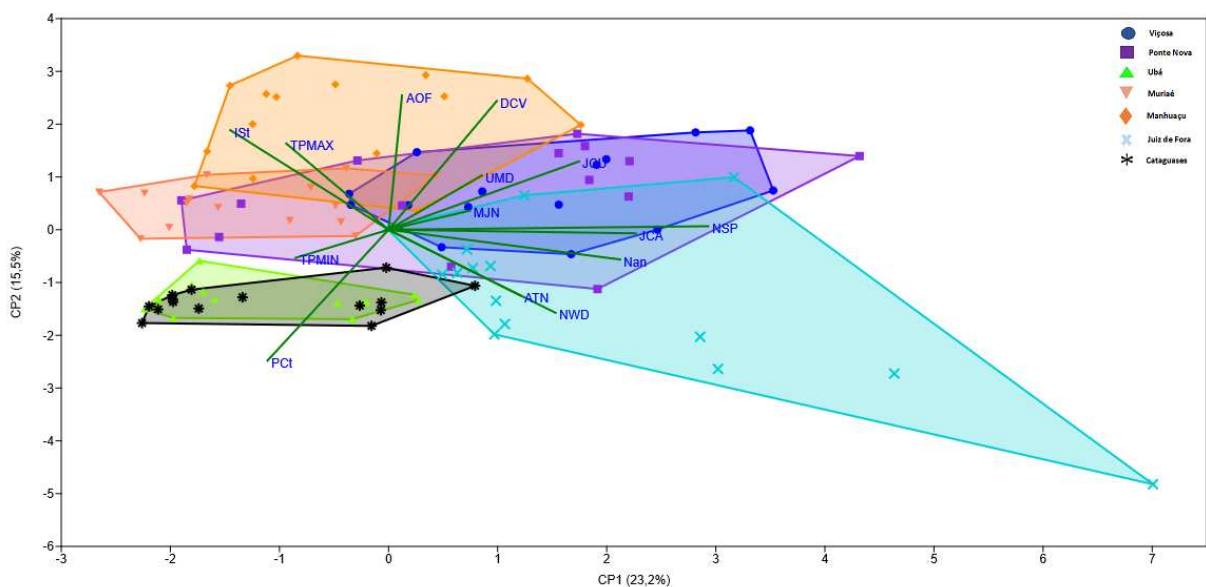


Figura 07: ACP com a utilização das variáveis ofidiofauna (PC1) e antropismo (CP2). Novamente as microrregiões de Ubá e Cataguases são influenciadas pelos valores de precipitação total. A microrregião de Manhuaçu é fortemente influenciada pelos valores de AOF e DCV.

Porém, ao utilizar as variáveis dois e três (antropismo + temperatura ideal), um arranjo menos modificado pela amostragem não padronizada utilizada nas coleções é observado (Figura 09). Nota-se que a espécie *Bothrops jararacussu* tem uma relação positiva com o aumento de T_{PMAX}, I_{St} e U_{MD}. *Bothrops neuwiedi* tem relação positiva com aumento de precipitação total. *Bothrops jararaca* manteve uma relação positiva com o aumento de espécies e espécimes. Além disso, o número de acidentes ofídicos também cresce na mesma proporção em que ocorre o aumento da perda de cobertura vegetal em algumas regiões (Figuras 09 e 08).

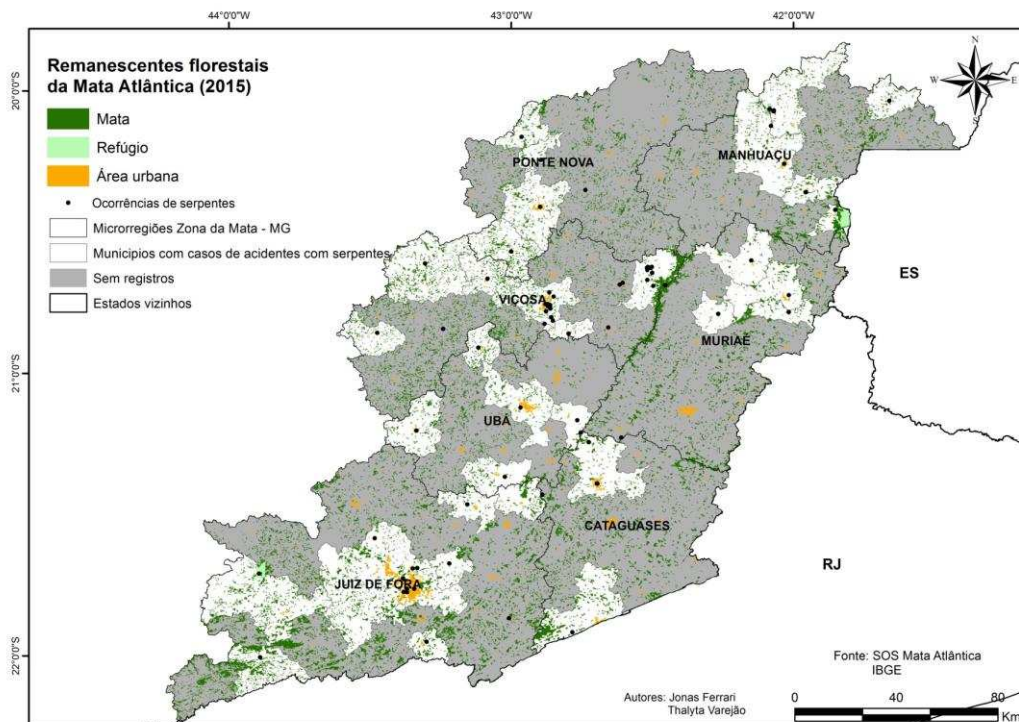


Figura 08: Mapa de cobertura vegetal da ZMM em 2015, com distribuição de acidentes ofídicos por município e registros de capturas de serpentes. A cobertura vegetal é quase inexistente em grande parte da ZMM.

Também foi analisada a relação das variáveis preditoras diretamente com os dados referentes a acidentes ofídicos, e observa-se novamente duas relações anteriormente encontradas. Há relação positiva para AOF com T_{PMAX} e DCV (Figuras 10 e 11).

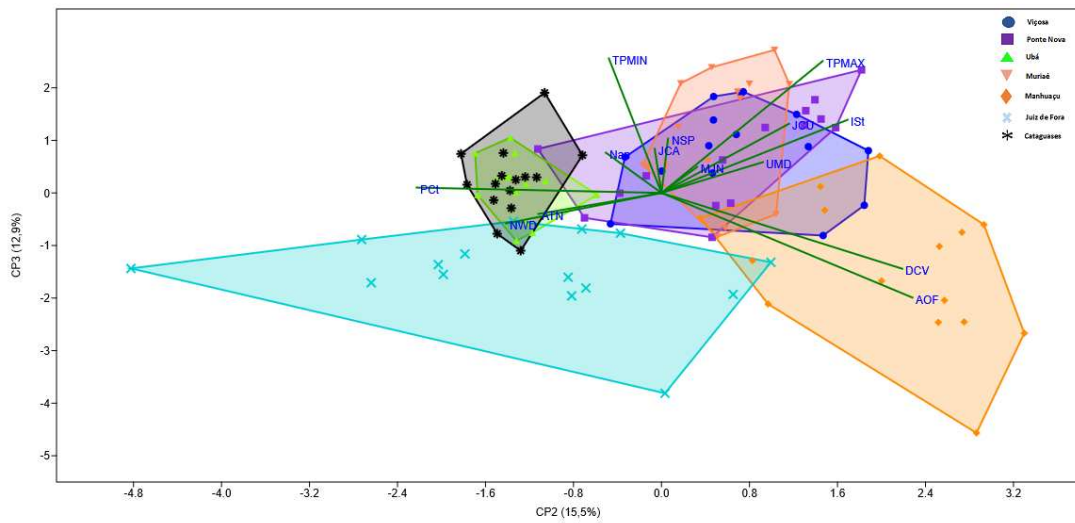


Figura 09: ACP com a utilização das variáveis antropismo (CP2) e temperatura ideal (PC3). Os resultados se mostraram melhor agrupados a utilização destas variáveis.

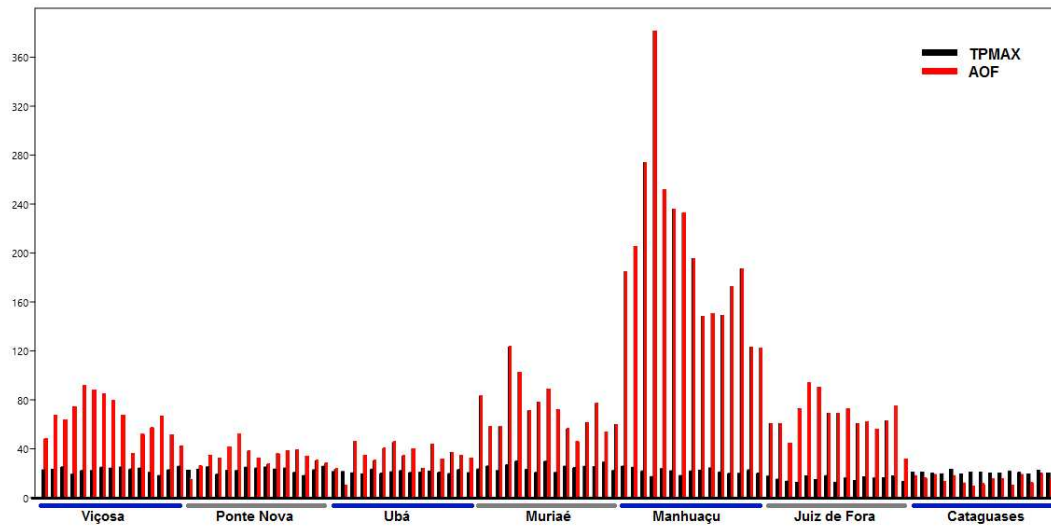


Figura 10: Relação entre AOF e TPMAX para todas as microrregiões, entre 2001 e 2015. Nem sempre as temperaturas mais altas tem relação direta com o aumento de acidentes.

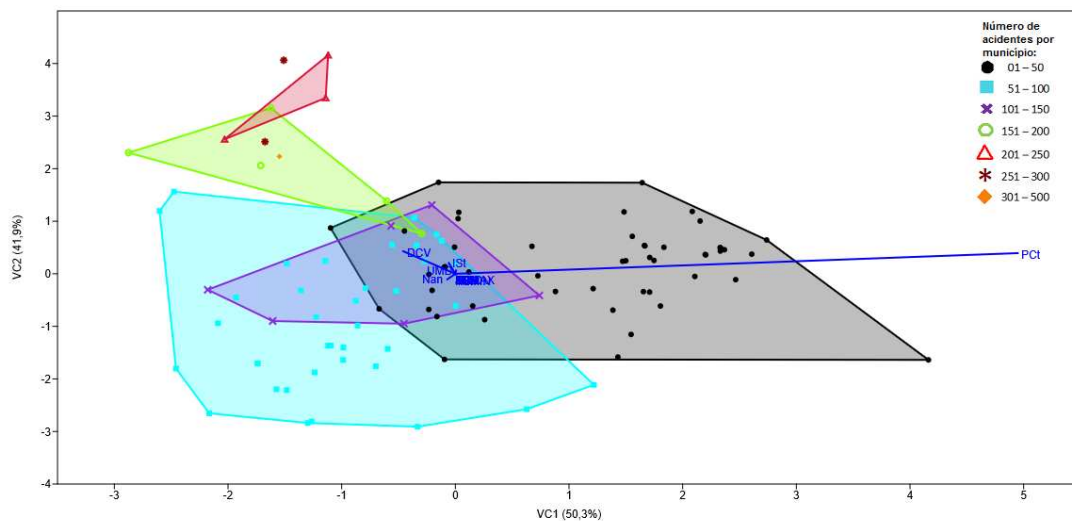


Figura 11: Análise discriminante para agrupamento de AOF. Observamos que Pct apresenta uma relação negativa com o aumento de casos de acidentes botrópicos, enquanto que DCV tem relação positiva.

4. DISCUSSÃO

Apesar dos registros de cinco espécies de serpentes do gênero *Bothrops* para região da ZMM, só pôde-se afirmar que três delas compõem a fauna da região (*B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. neuwiedi*). Isso porque as espécies de *B. moojeni* e *B. alternatus* possuem apenas um registro existente para a região, em nove coleções herpetológicas, sendo duas dessas inseridas na ZMM (Coleções herpetológicas da UFV e da UFJF), apesar de registradas anteriormente na ZMM em outros trabalhos (ver Costa et al., 2010; Borges et al., 2006).

Bothrops jararaca é uma das serpentes mais comuns da região sudeste do Brasil e em quase todo o estado de Minas Gerais. Tem sua distribuição desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Sul, ocorrendo também na Argentina e no Paraguai (Campbell & Lamar, 2004), principalmente em áreas florestadas da Mata Atlântica, mas também em bordas de matas e áreas antropizadas (Sazima, 1992; Sazima & Haddad, 1992). Pelo fato de adultos alimentarem-se basicamente de roedores (Sazima, 1992; Sazima & Haddad, 1992; Hartmann et al., 2003, Marques & Sazima, 2004), as áreas urbanas se tornam um atrativo para esse animal que vem sofrendo com sua perda de habitat natural. Devido a estes fatores, ela é com folga a serpente do gênero *Bothrops* mais registradas para a ZMM.

Acredita-se que relação direta encontrada para as espécies *B. jararaca* e *B. jararacussu* está mais ligada ao fato de que a distribuição dessas duas espécies se sobrepõem quase que por toda a sua área de abrangência (Campbell & Lamar, 2004). Ambas habitam regiões Mata Atlântica preservadas, podendo ocupar temporariamente regiões antropizadas (Chase, 2005). O fator diferencial é o fato de que *B. jararacussu* é uma espécie que possui maior sensibilidade à perda de habitat, ocupando frequentemente regiões com fragmentos de Mata Atlântica mais preservados (Marques & Sazima 2004; Pontes & Rocha 2008). Logo, as regiões onde ocorrem as duas espécies conseqüentemente, tendem a possuir fragmentos mais preservados em relação a locais de ocorrência apenas de *B. jararaca*.

A espécie *B. neuwiedi* por sua vez, pertence a um complexo grupo ainda hoje não resolvido completamente. Apesar de ser tida como uma espécie de

áreas abertas de campos e Cerrado (Campbell & Lamar, 1989; Sazima, 1992), a mesma foi bem documentada para a região de Juiz de Fora, com 22 exemplares entre os anos de 2001 e 2007, possuindo relação direta com regiões mais úmidas. Duas teorias podem ser plausíveis para o estabelecimento dessa espécie na região. A primeira delas seria de que a forte pressão sofrida pelos remanescente de florestas tropicais de Mata Atlântica com a antropização e, conseqüente, mudança de paisagem, moldou o bioma de modo que este veio a se tornar favorável a esta espécie ao longo dos anos (Young & Mitchell, 1994). A segunda seria a presença de campos de altitude na microrregião de Juiz de Fora, sendo estes uma derivação do bioma Mata Atlântica muito similar a regiões de Cerrado, o qual favorece a fixação da espécie no local (Hutchinson, 1957). Fato é que, a espécie *B. neuwiedi* já pode ser considerada uma espécie bem estabelecida dentro da ZMM, apesar de ausente em regiões mais ao Norte da ZMM, como na região de Viçosa, Ponte Nova e Manhuaçu por exemplo.

As regiões mais altas dentro da ZMM parecem ser um habitat escolhido preferencialmente pelas serpentes *Bothrops* (ver Myers et al., 2000; Myers, 2003; Campbell & Lamar, 2004; Fenwick et al., 2009). Fato é que, com a composição topográfica da região da ZMM, composta quase que completamente por morros e vales ao longo de toda sua área, associa-se ao fato de que a maior parte da cobertura vegetal localizada nas baixadas (<1200m) foram convertidas em paisagens humanas modificadas, restando na sua maioria, fragmentos menores totalmente desprotegidos (Tabarelli et al., 2010). Com isso, existe uma propensão dentro deste grupo para regiões mais altas, visto que a necessidade de termorregulação é um importante mecanismo para determinar as respostas das serpentes às condições ambientais (Moura et al., 2016b). Vale salientar que os dois maiores fragmentos de Mata Atlântica da ZMM se encontram nas regiões altas do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (microrregião de Viçosa) e no Parque Nacional do Caparaó (microrregião de Manhuaçu)

A perda de cobertura vegetal também afeta o ecossistema das serpentes de diversas outras maneiras, aumentando a temperatura dentro dos fragmentos de florestas e diminuindo a oferta hídrica (Pearson & Dawson, 2003). O número de acidentes ofídicos varia diretamente e positivamente com

o aumento da temperatura e a perda de cobertura vegetal. Essas duas variáveis estão diretamente ligadas (Ribeiro et al., 2009) e reforçam a hipótese de que com uma maior dificuldade de evitar o superaquecimento em paisagens fortemente fragmentadas, uma das alternativas encontradas pelas serpentes seria migrar para regiões mais altas ou para áreas antropizadas em busca de abrigo (Huey et al., 2009; Sunday et al., 2014). Como consequência disso, nota-se que os resultados refletem um aumento no número de acidentes ofídicos nas regiões com maiores valores de TPMAX e DCV.

O agrupamento das microrregiões mostrou que precipitação foi um fator determinante para o agrupamento das regiões mais baixas da ZMM. As microrregiões de Ubá e Cataguases apresentaram altos índices pluviométricos em relação as outras microrregiões. Infelizmente as duas localidades são pouco amostradas, sendo necessário o desenvolvimento de um estudo mais aprofundado nestas duas regiões para determinar a real influência destes altos índices pluviométricos para a ofidofauna regional, levando em conta que a capacidade destes animais em superar a variabilidade climática também depende dos regimes chuvosos e a disposição de fontes de água (Moura et al., 2016a; Kearney et al., 2013).

A região de Manhuaçu, área de predomínio de cultivo de cafeicultura, destacou-se pelos altos índices de DCV associados a um número elevado de AOF. Os altos níveis de perda de habitat associado ao crescimento de encontros acidentais com serpentes *Bothrops* destacam a necessidade urgente de uma melhor compreensão dos efeitos da perda de habitat sobre estes animais a médio e longo prazo (Gardner et al., 2007; Wearn et al., 2012).

Quando observados os resultados obtidos pela ACP, observa-se inicialmente que apesar da amostragem falha na maior parte da região da ZMM, a variável ofidofauna tem o maior percentual dentre as variáveis explicativas. Isso reforça o fato de que com uma amostragem heterogênea poderia refletir melhores resultados (Fenker et al., 2014). Mas para evitar que essa amostragem acabasse por mascarar os resultados finais, nossa opção por utilizar a relação entre as variáveis antropismo e temperatura ideal para comparar os resultados se mostrou positiva (Pearson & Dawson, 2003).

Ao observar o crescimento dos registros de *Bothrops jararaca* e *Bothrops jararacussu* com uma razão positiva direta para as variáveis TPMAX,

UMD e ISt, e com relação negativa para as variáveis DCV, pode-se hipotetizar que nas regiões onde houverem menor decréscimo de cobertura vegetal, associados um clima mais favorável para as populações destas espécies do gênero *Bothrops*, estas tendem a se estabilizar nestas regiões.

5. CONCLUSÃO

Com um total de cinco espécies registradas, apenas três foram tidas como fixadas na região. As espécies de *Bothrops moojeni* e *Bothrops alternatus*, apresentam apenas registros pontuais nas microrregiões de Viçosa e Juiz de Fora, e por não se tratarem de espécies típicas da região ou até mesmo do Bioma Mata Atlântica, foram consideradas encontros incomuns.

Os resultados relacionados ao ofidismo com serpentes do gênero *Bothrops* apenas corroboram, uma realidade preocupante para estes animais e para a saúde pública. A antropização de áreas naturais atua no crescimento do número de acidentes ofídicos na região.

A relação entre os fatores abióticos e as populações de serpentes *Bothrops* da Zona da Mata Mineira apresentou a visão de um complexo sistema de interações que compõem o ecossistema da região. A associação da perda de cobertura vegetal foi um fator relevante que, associado as mudanças nos regimes climáticos, mostraram ser uma ferramenta poderosa capaz de moldar o habitat das serpentes *Bothrops* na Zona da Mata Mineira, selecionando populações, não só de serpentes, que mais se adequem às suas características.

A necessidade de novas pesquisas deste tipo dentro dos regimes climáticos atuais se fazem necessárias uma vez que tais correlações não podem ser aplicadas em predições futuras, levando em conta que os fatores abióticos das relações espécie ambiente tendem a se moldar constantemente.

6. REFERÊNCIAS

Amorim, D. D., Ferreira, M. E (2000). Um estudo sobre a qualidade das águas do Rio Paraíba do Sul no Vale do Paraíba do Sul no período de 1978 a 1994. *Resumos do XIII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos*, Belo Horizonte, MG.

Araújo, F. A. A.; Santa Lúcia, M. & Cabral, R. F. (2003). Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Pp. 6-12, SP.

Araujo, M.B., Ferri-Yanez, F., Bozinovic, F., Marquet, P.A., Valladares, F. & Chown, S.L. (2013). Heat freezes niche evolution (ed D Sax). *Ecology Letters*, 16, 1206–1219.

Bardo, F.E.; Gasparini, J.L.; Almeida, P.A.; Zaher, H.; Graziotin, F.G.; Gusmão, R.B.; Ferrarini, J.M.G.; Sawaya, R.J. (2016). Another new and threatened species of lancehead genus *Bothrops* (Serpentes, Viperidae) from Ilha dos Franceses, Southeastern Brazil. *Zootaxa* 4097 (4): 511–529.

Borges, R.C.; De Oliveira, A.; Bernardo, N.; Martoni, R.; Costa, M.C. (2006). Diagnóstico da fauna silvestre apreendida e recolhida pela Polícia Militar de Meio Ambiente de Juiz de Fora, MG (1998 e 1999). *Revista Brasileira de Zoociências* 8(1): 23-33.

Buckley, L.B., Hurlbert, A.H. & Jetz, W. (2012) Broad-scale ecological implications of ectothermy and endothermy in changing environments. *Global Ecology and Biogeography*, 21, 873–885.

Cadle, J.E. & Greene, H.W. (1993). Phylogenetic patterns, biogeography, and the ecological structure of neotropical snake assemblage. In *Species diversity in ecological communities: historical and geographical perspectives* (R.E. Ricklefs & D. Schuller, eds.). University of Chicago Press, Chicago, p. 281-293.

Campbell, J.A. & W.W. Lamar. (1989). *The Venomous Reptiles of Latin America*. London, Comstock, 6th ed., 425p.

Campbell, J.A., and Lamar, W.W. (2004). *The venomous reptiles of the western hemisphere*, Volumes I-II, 1st edn. Cornell University Press, Ithaca, 475.

Carnaval, A.C., Waltari, E., Rodrigues, M.T., Rosauer, D., VanDerWal, J., Damasceno, R., Prates, I., Strangas, M., Spanos, Z., Rivera, D., Pie, M.R., Firkowski, C.R., Bornschein, M.R., Ribeiro, L.F. & Moritz, C. (2014) Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281, 20141461–20141461.

Carrasco, P.A., Mattoni, C.I., Leynaud, G.C., and Scrocchi, G.J. (2012). Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). *Zoologica Scripta* 41:109-124.

Chase J. M. (2005) Towards a really unified theory for metacommunities. *Funct. Ecol.* 19, 182–6.

Chesson P. (2003). Understanding the role of environmental variation in population and community dynamics. *Theoretical Population Biology* 64: 253-254.

Costa, H.C., Pantoja, D.L., Pontes, J.L.; Feio, R.N. (2010). Serpentes do Município de Viçosa, Mata Atlântica do Sudeste do Brasil. *Biota Neotrop.*, vol. 10, no. 3.

Costa, H.C.; Bérnis R.S. (2015). Répteis brasileiros: Lista de espécies 2015. *Herpetologia Brasileira* (4). n° 3 - Nov/2015.

Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Huey, R.B., Sheldon, K.S., Ghalambor, C.K., Haak, D.C., Martin, P.R., (2008). Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 6668–6672.

Fenker, J.; Tedeschi, L.G.; Pyron, R.A.; Nogueira, C.C. (2014). Phylogenetic diversity, habitat loss and conservation in South American pitvipers (Crotalinae: Bothrops and Bothrocophias). *Diversity and Distributions* 20(10): 1108–1119.

- Gardner, T., Barlow, J. & Peres, C. (2007) Paradox, presumption and pitfalls in conservation biology: the importance of habitat change for amphibians and reptiles. *Biological Conservation*, 138, 166–179.
- Grimm, A.M. (2003) The El Niño impact on the summer monsoon in Brazil: regional processes versus remote influences. *Journal of Climate*, 16, 263–280.
- Gunderson, A.R., Stillman, J.H. & Gunderson, A.R. (2015) Plasticity in thermal tolerance has limited potential to buffer ectotherms from global warming. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282, 1–8.
- Hammer, O., Harper, D.A.T., and P. D. Ryan, (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. Harper, D.A.T. (ed.). 1999. Numerical Palaeobiology. John Wiley & Sons.
- Hartmann, P.A., Hartmann, M.T. & Giasson, L.O. (2003). Uso do hábitat e alimentação em juvenis de *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae) na Mata Atlântica do Sudeste do Brasil. *Phyllomedusa* 2(1):35-41.
- Hannah, L., Midgley, G.F. & Millar, D. (2002) Climate change integrated conservation strategies. *Global Ecology and Biogeography*, 11, 485–495.
- Hau M. (2001). Timing of breeding in variable environments: tropical birds as model systems. *Hormones and Behavior* 40: 281-290.
- Hijmans, R.J., and Graham, C.H. (2006). The ability of climate envelope models to predict the effect of climate change on species distributions. *Global Change Biology* 12:2272-2281.
- Huey, R.B., Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Vitt, L.J., Hertz, P.E., Alvarez Perez, H.J., Garland, T., Perez, H.J.A. & Garland, T. (2009) Why tropical forest lizards are vulnerable to climate warming. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276, 1939–1948.
- Hutchinson, G.E. (1957) Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, 22, 415–457.

- Kearney, M.R., Simpson, S.J., Raubenheimer, D. & Kooijman, S.A.L.M. (2013) Balancing heat, water and nutrients under environmental change: a thermodynamic niche framework. *Functional Ecology*, 27, 950–966.
- MacArthur, R. & Levins, R. (1967) The limiting similarity, convergence, and divergence of coexisting species. *The American Naturalist*, 101, 377–385.
- Marques, O.A.V. (1998). Composição faunística, história natural e ecologia de serpentes da mata atlântica, na região da estação ecológica Juréia-Itatins, São Paulo, SP. *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, SP.
- Marques, O.A.V. & Sazima, I. (2004). História natural dos répteis da Estação Ecológica Juréia-Itatins. In *Estação Ecológica Juréia-Itatins: ambiente físico, flora e fauna* (O.A.V. Marques & W. Duleba, eds.). Holos, Ribeirão Preto, p.257-277.
- Martins, M. (1994). História Natural e Ecologia de uma taxocenose de serpentes de mata na região de Manaus, Amazônia Central, Brasil. *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Ministério da Saúde. (2001). Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. *Brasília*:131.
- Mise, Y.F., Lira-da-Silva, R.M., and Carvalho, F.M. (2007). Envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* no Estado da Bahia: aspectos epidemiológicos e clínicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40:569-573.
- Moura, M.R.; Garcia, P.C.A.; Jetz, W. (2016)a. The role of environmental gradients on the diversity of vertebrates. *Tese de Doutorado em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre*. Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.
- Moura, M.R., Argôlo, A.J. & Costa, H.C. (2016)b. Historical 735 and contemporary correlates of snake biogeographical subregions in the Atlantic Forest hotspot. *Journal of Biogeography*, 1–11.
- Myers, N. (2003) Biodiversity hotspots revisited. *BioScience*, 53, 916–917.

- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A. & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853–858.
- Oliveira, F.N., Brito, M.T., Morais, I.C.O., Fook, S.M.L., and Albuquerque, H.N. (2010). Accidents caused by Bothrops and Bothropoides in the State of Paraíba: epidemiological and clinical aspects. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43:662-667.
- Pearson RG, Dawson TP (2003) Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimatic envelope models useful? *Global Ecology and Biogeography*, 12, 361-371.
- Prentice, I.C. & Solomon, A.M. (1991) Vegetation models and global change. *Global changes of the past* (ed. by R.S. Bradley), pp. 365–383. UCAR/Office for Interdisciplinary Earth Studies, Boulder, CO.
- Pontes, J.A.L. & Rocha, C.F.D. (2008). Serpentes da Serra do Mendanha, Rio de Janeiro, RJ: ecologia e conservação. *Technical Books*, Rio de Janeiro.
- Ribeiro, M.C., Metzger, J.P., Martensen, A.C., Ponzoni, F.J. & Hirota, M.M. (2009) The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, 142, 1141–1153.
- Ribeiro, L.A., Albuquerque, M.J., Campos, V.A.F.P., Katz, G., Takaoka, Y., Lebrão, M.L., and Jorge, M.T. (1998). Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93. *Revista da Associação Médica Brasileira* 44:312-318.
- Root TL, Price JT, Hall KR, Schneider SH, Rosenzweig C, Pounds JA (2003). 'Fingerprints' of global warming on animals and plants. *Nature*, 421, 57-60.
- SAEG. Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: *Fundação Arthur Bernardes* - UFV - Viçosa, 2007.

Sazima, I. (1992). Natural history of the jararaca pitviper, *Bothrops jararaca*, in Southeastern Brazil. In *Biology of the pitvipers* (J.A. Campbell, E.D. & Brodie, eds.). Selva, Tyler, p.199-216.

Sazima, I. & Haddad, C.F.B. (1992). Répteis da Serra do Japi: notas sobre história natural. In *História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal do Sudeste do Brasil* (L.P.C. Morellato, org.). UNICAMP/FAPESP, Campinas, p.212-236.

Smith TM, Smith RL. (2012). Elements of ecology. San Francisco: *Pearson*.

Sunday, J.M., Bates, A.E., Kearney, M.R., Colwell, R.K., Dulvy, N.K., Longino, J.T. & Huey, R.B. (2014) Thermalsafety margins and the necessity of thermoregulatory behavior across latitude and elevation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 5610–5615.

Tabarelli, M., Aguiar, A. V, Ribeiro, M.C., Metzger, J.P. & Peres, C.A. (2010) Prospects for biodiversity conservation in the Atlantic Forest: lessons from aging human-modified landscapes. *Biological Conservation*, 143, 2328–2340.

Waldez, F., and Vogt, R.C. (2009). Aspectos ecológicos e epidemiológicos de acidentes ofídicos em comunidades ribeirinhas do baixo rio Purus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica* 39:681-692.

Wearn, O.R., Reuman, D.C. & Ewers, R.M. (2012) Extinction debt and windows of conservation opportunity in the Brazilian Amazon. *Science*, 337, 228–232.

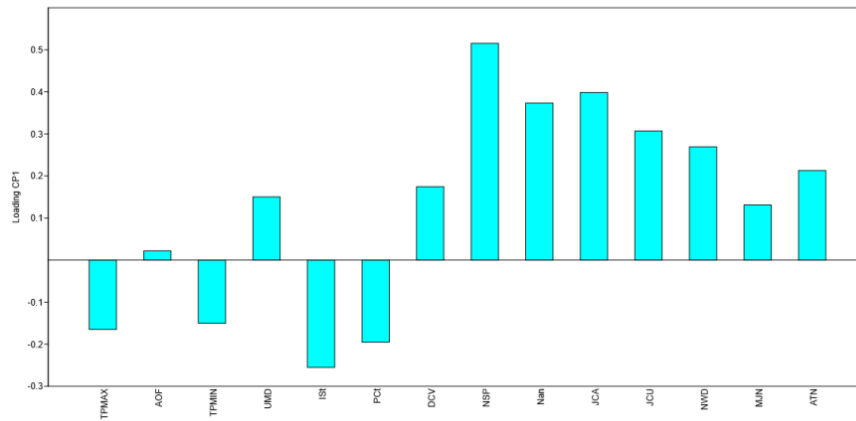
Whittaker, R.J., Araújo, M.B., Jepson, P., Ladle, R.J., Watson, J.E.M., and Willis, K.J. (2005). Conservation Biogeography: assessment and prospect. *Diversity and Distributions* 11:3-23.

Young A. & Mitchell N. (1994) Microclimate and vegetation edge effects in a fragmented podocarp-broadleaf forest in New Zealand. *Biol. Conserv.* 67, 63–72.

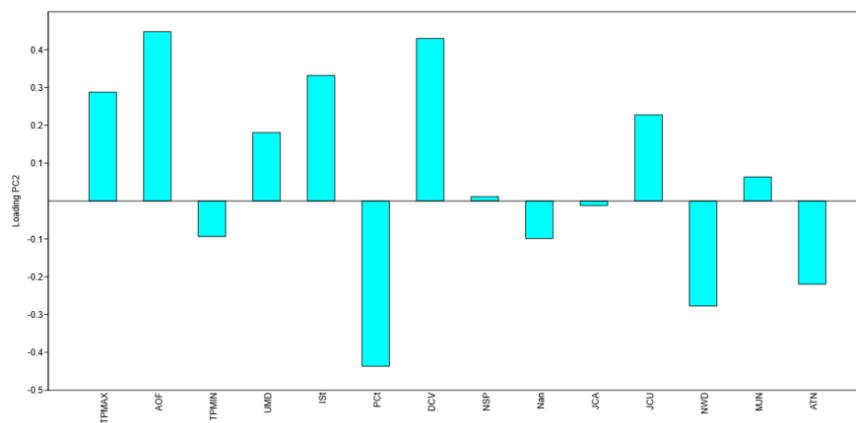
Zachos, F.E. & Habel, J.C. (2011) Biodiversity Hotspots: distribution and protection of conservation priority areas (eds FE Zachos and JC Habel). *Springer Berlin Heidelberg*, Berlin.

7. APÊNDICES

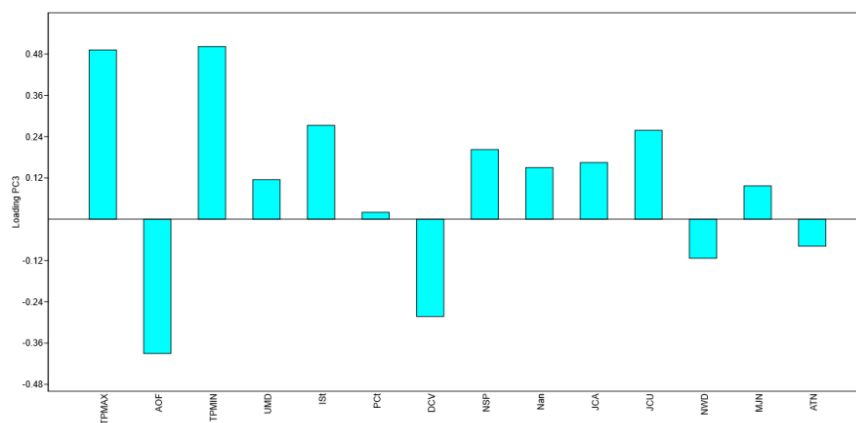
A - Scores. Influencia de cada variável inicial em relação às variáveis obtidas na ACP.



A1 - Scores ofidofauna, análise ACP.



A2 - Scores antropismo, análise ACP.



A3 - Scores temperatura, análise ACP.

B: Planilha de dados com todos os valores coletados para as sete microrregiões entre 2001 e 2015.

ANO	MR	TPMAX	TPMIN	UMD	Ist	Pct	DCV	GN	NSP	Nan	AOF	JCA	JCU	NWD	MJN	ATN
2001	1	22,86	12,65	65,55	200,06	96,68	34,91	1	2	14	48	1	1	0	0	0
2002	1	23,27	13,69	58,62	199,47	106,14	34,91	1	1	27	67	1	0	0	0	0
2003	1	25,28	15,65	72,25	192,41	95,07	34,91	1	1	28	64	1	0	0	0	0
2004	1	19,27	11,72	55,57	159,38	149,83	34,91	1	1	35	75	1	0	0	0	0
2005	1	22,32	14,79	75,39	157,33	119,67	34,91	1	2	45	92	1	1	0	0	0
2006	1	22,28	11,50	71,01	145,63	100,24	108,00	1	2	9	88	1	1	0	0	0
2007	1	25,00	15,55	52,54	137,32	84,13	108,00	1	2	7	85	1	1	0	0	0
2008	1	24,23	11,79	67,92	173,82	140,80	108,00	1	2	35	80	1	1	0	0	0
2009	1	25,14	13,51	47,19	165,52	130,62	14,00	1	1	23	68	1	0	0	0	0
2010	1	23,45	11,64	69,93	187,54	112,63	14,00	1	1	2	36	1	0	0	0	0
2011	1	24,29	14,13	64,36	164,10	119,48	0,00	1	2	6	52	1	1	0	0	0
2012	1	20,78	10,62	51,72	194,11	107,49	83,00	1	1	2	57	0	1	0	0	0
2013	1	18,16	12,43	67,42	149,68	110,33	0,00	1	2	13	67	1	1	0	0	0
2014	1	22,85	13,54	66,67	221,14	68,72	0,00	1	1	2	52	1	0	0	0	0
2015	1	25,75	13,96	64,60	196,68	97,21	4,00	1	1	2	42	1	0	0	0	0
2001	2	22,86	12,65	65,55	200,06	96,68	79,93	1	2	6	15	1	1	0	0	0
2002	2	23,27	13,69	58,62	199,47	106,14	79,93	1	2	6	26	1	1	0	0	0
2003	2	25,28	15,65	72,25	192,41	95,07	79,93	1	2	8	35	1	1	0	0	0
2004	2	19,27	11,72	55,57	159,38	149,83	79,93	1	2	6	33	1	1	0	0	0
2005	2	22,32	14,79	75,39	157,33	119,67	79,93	1	2	5	42	1	1	0	0	0
2006	2	22,28	11,50	71,01	145,63	100,24	28,00	1	3	6	53	1	1	0	1	0
2007	2	25,00	15,55	52,54	137,32	84,13	28,00	1	2	3	38	0	1	1	0	0
2008	2	24,23	11,79	67,92	173,82	140,80	28,00	1	2	6	33	1	1	0	0	0
2009	2	25,14	13,51	47,19	165,52	130,62	14,00	1	0	0	27	0	0	0	0	0
2010	2	23,45	11,64	69,93	187,54	112,63	14,00	1	0	0	36	0	0	0	0	0
2011	2	24,29	14,13	64,36	164,10	119,48	0,00	1	0	0	39	0	0	0	0	0
2012	2	20,78	10,62	51,72	194,11	107,49	57,00	1	1	1	39	1	0	0	0	0
2013	2	18,16	12,43	67,42	149,68	110,33	0,00	1	1	1	34	1	0	0	0	0
2014	2	22,85	13,54	66,67	221,14	68,72	0,00	1	0	0	30	0	0	0	0	0
2015	2	25,75	13,96	64,60	196,68	97,21	33,00	1	1	1	28	0	1	0	0	0

2001	3	21,37	14,58	60,45	183,65	784,54	3,54	1	0	0	23	0	0	0	0	0
2002	3	21,46	14,49	63,45	177,84	654,49	3,54	1	1	8	10	1	0	0	0	0
2003	3	20,35	14,60	60,99	182,19	769,08	3,54	1	0	0	46	0	0	0	0	0
2004	3	19,51	12,22	55,70	169,97	592,29	3,54	1	1	2	35	1	0	0	0	0
2005	3	23,40	14,19	63,95	159,52	575,41	3,54	1	0	0	30	0	0	0	0	0
2006	3	20,08	12,51	56,27	144,80	512,09	26,00	1	1	4	40	1	0	0	0	0
2007	3	21,28	13,09	56,78	157,43	672,12	26,00	1	0	0	45	0	0	0	0	0
2008	3	22,25	13,56	67,99	178,84	628,38	26,00	1	0	0	34	0	0	0	0	0
2009	3	20,66	14,90	52,07	176,70	716,45	2,50	1	1	12	40	1	0	0	0	0
2010	3	20,88	14,51	62,68	177,97	635,68	2,50	1	0	0	24	0	0	0	0	0
2011	3	21,82	13,96	64,64	162,64	638,27	0,00	1	1	16	44	1	0	0	0	0
2012	3	20,88	14,02	58,01	173,73	852,33	31,00	1	1	2	32	1	0	0	0	0
2013	3	19,79	11,75	63,32	165,88	676,89	0,00	1	0	0	37	0	0	0	0	0
2014	3	23,05	14,34	57,51	171,63	816,98	0,00	1	0	0	35	0	0	0	0	0
2015	3	20,48	14,47	63,89	167,00	873,80	5,00	1	0	0	33	0	0	0	0	0
2001	4	23,54	19,20	53,05	220,89	82,49	25,59	1	1	16	83	1	0	0	0	0
2002	4	25,94	16,84	59,89	214,53	92,91	25,59	1	1	3	58	1	0	0	0	0
2003	4	22,22	16,51	55,72	199,19	128,54	25,59	1	1	4	58	1	0	0	0	0
2004	4	27,08	12,62	56,44	175,76	93,21	25,59	1	0	0	123	0	0	0	0	0
2005	4	30,06	17,20	68,59	187,73	114,62	25,59	1	1	28	103	1	0	0	0	0
2006	4	23,10	14,95	45,08	177,32	115,43	26,00	1	1	5	71	1	0	0	0	0
2007	4	20,74	12,79	52,62	213,08	90,48	26,00	1	0	0	79	0	0	0	0	0
2008	4	29,85	16,10	69,06	184,83	136,44	26,00	1	1	3	89	1	0	0	0	0
2009	4	20,68	17,30	47,13	201,68	90,56	9,00	1	0	0	72	0	0	0	0	0
2010	4	25,85	17,55	53,05	197,51	107,06	9,00	1	1	1	56	1	0	0	0	0
2011	4	24,73	13,84	73,03	184,06	118,16	0,00	1	0	0	46	0	0	0	0	0
2012	4	25,70	18,34	67,13	206,71	95,08	12,00	1	0	0	62	0	0	0	0	0
2013	4	25,39	9,84	48,84	197,25	99,13	0,00	1	0	0	77	0	0	0	0	0
2014	4	29,09	16,01	52,71	218,24	83,16	0,00	1	0	0	54	0	0	0	0	0
2015	4	22,32	15,55	56,49	196,47	84,41	0,00	1	0	0	60	0	0	0	0	0

2001	5	25,90	13,72	65,51	205,98	103,43	99,78	1	0	0	185	0	0	0	0	0
2002	5	24,89	12,77	72,66	202,39	116,56	99,78	1	1	1	206	1	0	0	0	0
2003	5	21,95	10,57	70,70	202,92	91,74	99,78	1	0	0	274	0	0	0	0	0
2004	5	17,28	8,60	59,49	156,77	119,13	99,78	1	1	1	382	1	0	0	0	0
2005	5	23,81	12,85	60,57	178,81	130,63	99,78	1	0	0	252	0	0	0	0	0
2006	5	22,07	10,96	78,92	173,47	127,03	95,00	1	0	0	237	0	0	0	0	0
2007	5	18,15	12,26	64,68	211,14	90,01	95,00	1	0	0	233	0	0	0	0	0
2008	5	21,92	13,47	59,83	188,35	154,32	95,00	1	0	0	196	0	0	0	0	0
2009	5	22,58	12,14	66,74	203,71	121,76	31,50	1	2	9	149	1	1	0	0	0
2010	5	24,40	13,67	65,28	199,62	125,58	31,50	1	0	0	151	0	0	0	0	0
2011	5	21,07	12,66	59,27	175,17	132,51	0,00	1	1	7	149	1	0	0	0	0
2012	5	19,97	15,15	63,99	196,41	79,08	151,00	1	1	1	173	1	0	0	0	0
2013	5	19,94	10,15	60,83	186,72	101,32	0,00	1	0	0	187	0	0	0	0	0
2014	5	22,83	12,00	68,86	218,26	78,51	16,00	1	1	1	123	1	0	0	0	0
2015	5	20,15	13,91	42,06	200,55	80,20	65,00	1	0	0	123	0	0	0	0	0
2001	6	17,72	11,90	62,76	129,99	235,36	16,44	1	3	42	61	1	0	1	0	1
2002	6	15,17	12,93	71,85	119,53	196,35	16,44	1	2	45	61	1	0	1	0	0
2003	6	13,56	11,63	55,00	154,98	230,72	16,44	1	2	16	45	1	0	1	0	0
2004	6	12,17	12,33	55,10	174,78	177,68	16,44	1	1	3	73	1	0	0	0	0
2005	6	17,82	10,57	47,86	133,49	172,62	16,44	1	1	3	95	1	0	0	0	0
2006	6	14,85	11,07	52,71	111,46	153,62	126,00	1	0	0	91	0	0	0	0	0
2007	6	18,09	10,95	65,18	121,89	201,64	126,00	1	2	9	69	1	1	0	0	0
2008	6	12,67	12,80	67,00	177,88	188,51	126,00	1	1	6	69	1	0	0	0	0
2009	6	16,15	13,88	61,90	162,91	214,93	45,00	1	1	8	73	1	0	0	0	0
2010	6	13,35	14,34	65,05	148,87	190,70	45,00	1	2	6	61	1	0	1	0	0
2011	6	16,43	13,90	56,53	139,78	191,48	5,00	1	1	17	62	1	0	0	0	0
2012	6	16,17	13,10	55,19	120,38	255,70	85,00	1	1	1	56	1	0	0	0	0
2013	6	15,83	12,97	73,70	150,69	203,07	0,00	1	1	3	63	1	0	0	0	0
2014	6	17,21	13,47	53,14	75,52	245,09	6,00	1	1	3	75	1	0	0	0	0
2015	6	13,36	13,90	70,57	107,83	262,14	8,00	1	1	1	32	1	0	0	0	0

2001	7	21,37	14,58	60,45	183,65	784,54	3,86	1	0	0	18	0	0	0	0	0
2002	7	21,46	14,49	63,45	177,84	654,49	3,86	1	0	0	16	0	0	0	0	0
2003	7	20,35	14,60	60,99	182,19	769,08	3,86	1	0	0	19	0	0	0	0	0
2004	7	19,51	12,22	55,70	169,97	592,29	3,86	1	0	0	12	0	0	0	0	0
2005	7	23,40	14,19	63,95	159,52	575,41	3,86	1	0	0	18	0	0	0	0	0
2006	7	20,08	12,51	56,27	144,80	512,09	34,77	1	0	0	12	0	0	0	0	0
2007	7	21,28	13,09	56,78	157,43	672,12	34,77	1	1	4	9	1	0	0	0	0
2008	7	22,25	13,56	67,99	178,84	628,38	34,77	1	1	6	11	1	0	0	0	0
2009	7	20,66	14,90	52,07	176,70	716,45	0,00	1	0	0	15	0	0	0	0	0
2010	7	20,88	14,51	62,68	177,97	635,68	0,00	1	0	0	15	0	0	0	0	0
2011	7	21,82	13,96	64,64	162,64	638,27	0,00	1	1	2	9	1	0	0	0	0
2012	7	20,88	14,02	58,01	173,73	852,33	38,00	1	0	0	19	0	0	0	0	0
2013	7	19,79	11,75	63,32	165,88	676,89	0,00	1	1	2	12	1	0	0	0	0
2014	7	23,05	14,34	57,51	171,63	816,98	0,00	1	2	4	20	1	1	0	0	0
2015	7	20,48	14,47	63,89	167,00	873,80	11,00	1	1	9	16	1	0	0	0	0

MR - Microrregião: 1. Viçosa, 2. Ponte Nova, 3. Ubá, 4. Muriaé, 5. Manhuaçu, 6. Juiz de Fora, 7. Cataguases; TPMAX - temperatura máxima média (°c); TDMIN - temperatura mínima média (°c); UMD - umidade relativa média (%); PCt - precipitação total (mm); ISt - insolação total (hs); DCV - decréto de cobertura vegetal (he); GN - gênero; NSP - número de spp; NAn - número de animais; AOF - acidentes ofídicos; *Bothrops jararaca* (JCA), *Bothrops jararacussu* (JCU), *Bothrops neuwiedi* (NWD), *Bothrops moojeni* (MJN), *Bothrops alternatus* (ATN).

C - Quadro de animais revisados nas coleções.

INSTITUIÇÃO	<i>Bothrops jararaca</i>	<i>Bothrops jararacussu</i>	<i>Bothrops neuwiedi</i>	<i>Bothrops moojeni</i>	<i>Bothrops alternatus</i>
FUNED	18; 20; 19; 38; 39; 40; 59; 60; 61; 62; 75; 76; 77; 78; 86; 87; 41; 114; 115; 02; 21; 43; 64; 116; 03; 25; 28; 29; 30; 44; 45; 65; 66; 88; 122; 123; 124; 126; 125; 127; 04; 104; 107; 105; 106; 117; 05; 06; 07; 08; 48; 96; 128; 129; 130; 133; 131; 132; 134; 135; 136; 49; 89; 97; 109; 110; 120; 118; 119; 09; 33; 32; 50; 51; 70; 82; 83; 92; 103; 102; 137; 138; 10; 11; 13; 52; 54; 55; 14; 34; 56; 72; 73; 71; 84; 85; 15; 16; 17; 35; 57; 74; 94; 95; 93; 58; 36.	22; 42; 63; 108; 31; 69; 79; 80; 81; 91; 100; 99; 112; 111; 121; 139; 12; 53; 37.	27; 23; 24; 46; 47; 67; 68; 90; 98; 113.	101	26
MNRJ	MNRJ 15258; 14139; 14140; 14134; 14135; 14141; 24519.	-	-	-	-
UFJF	845; 846; 847; 848; 980; 884; 885; 850; 851; 982; 877; 890; 876; 887; 873; 874; 1058; 1059; 292; 295; 331; 459; 577; 619; 576; 578; 608; 599; 602; 945; 941; 834; 968; 969; 939; 967; 988; 1000; 642; 1476.	-	667	-	-
UFMG	2798; 1561; 1575; 1565; 1552; 1560; 1543; 2490; 2491; 1553; 1554; 1549; 1589; 1590; 1591; 1596; 2350; 1623.	1564; 1576.	-	-	-
UFV	MZUFV 1010; 1124; 1215; 1489; 1490; 1491; 1492; 1493; 1494; 1495; 1499; 1500; 1504; 1505; 1506; 1513; 1525; 1558; 1559; 1583; 1584; 1669; 1670; 1671; 1674; 1579; 1664; 1675; 1676; 1702; 1703; 1704; 1705; 1706; 1708; 1715; 1724; 1725; 1726; 1727; 1728; 1729; 1759; 1677; 1770; 1855; 1292; 1887; 1852; 2193; 2125; 2117; 2361; 2362; 2363; 2364; 2365; 2122; 2105; 2114; 2113; 2186; 2268; 2280; 2281; 2331; 2396; 2397; 2398; 2399; 2400; 2401; 2415; 2416; 2431; 1716; 2091; 2250; 1379; 1113; 1386; 1548; 1551; 1552; 1514; 1063; 1052; 1053; 1054; 1056; 1200; 1201; 236; 1475; 1025; 1014; 1024; 1026; 1030; 1033; 1034; 1035; 1036; 1065; 1142; 1143; 1144; 1145; 1146; 1147; 1293; 1275; 1276; 1280; 1281; 1282; 1279; 1283; 1284; 1285; 1302; 1315; 1316; 1317; 1318; 1319; 1320; 1321; 1322; 1323; 1324; 1325; 1326; 1327; 1328; 1329; 1330; 1331; 1332; 1333; 1334; 1335; 1336; 1337; 1338; 1339; 1340; 1341; 1342; 1343; 1344; 1345; 1346; 1347; 1348; 1349; 1350; 1309; 1310; 1311; 1312; 1423; 1419; 1420; 1393; 1479; 1477; 1605; 1606; 1480; 1684; 1503; 1527; 1528; 1565; 1585; 1717; 1771; 1685; 1924; 1919; 1951; 2004; 2089; 2086; 2087; 2084; 2088; 2085; 2090; 2092; 2093; 2164; 2149; 2169; 2235; 2356; 2428; 2424.	MZUFV 2284; 1111; 1112; 1254; 1271; 1255; 1289; 1301; 1306; 1307; 1308; 1366; 1830; 1382; 1425; 1603; 1604; 1564; 1629; 1990; 1921; 1952; 1934; 2018; 2076; 2170.	-	-	-

ARTIGO 02

**COMPARAÇÃO DA TOXICIDADE DOS VENENOS DE ESPÉCIES
DO GÊNERO *Bothrops* (WAGLER, 1824) (SERPENTES:
VIPERIDAE) NA ZONA DA MATA MINEIRA, MINAS GERAIS,
BRASIL**

Jonas Ferrari Morais

Orientador: Prof. Dr. Renato Neves Feio

VIÇOSA - MINAS GERAIS

- 2017 -

RESUMO

MORAIS, Jonas Ferrari, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2017. **Comparação da toxicidade dos venenos de espécies do gênero *Bothrops* (Wagler, 1824) (Serpentes: Viperidae) na Zona da Mata Mineira, Minas Gerais, Brasil.** Orientador: Dr. Renato Neves Feio. Coorientador: Dr. Oswaldo Pinto Ribeiro Filho.

A peçonha das serpentes atua principalmente para facilitar o processo de digestão das presas, além de possuírem função tanto como mecanismo de defesa quanto de ataque, apresentando componentes direcionados para incapacitação e morte de suas presas. Os venenos dos ofídios do gênero *Bothrops* contêm uma mistura complexa de proteínas com e sem atividade enzimática, proteínas de pequena massa molecular e peptídeos com atividades químicas e biológicas distintas, além de ações proteolítica ou necrosante, coagulante, hemorrágica e nefrotóxica. Nos modelos experimentais, diferentes propriedades de diferentes amostras de venenos de espécies do gênero *Bothrops* podem variar em valores substanciais, sendo que tais variações refletem sua ação no organismo. No presente estudo comparativo da toxicologia das espécies de *Bothrops*, foram utilizadas onze diferentes metodologias para comparar a peçonha das serpentes *Bothrops* ocorrentes na Zona da Mata mineira. observadas variações na composição dos venenos, tanto dentro do gênero *Bothrops*, quanto entre os resultados obtidos na literatura para as mesmas espécies em outras regiões amostradas. Os resultados corroboram ainda mais a ideia de que a variação toxicológica dentro das peçonhas de uma mesma espécie pode variar de acordo com o habitat que esta ocupa, criando assim um perfil toxicológico regional.

ABSTRACT

MORAIS, Jonas Ferrari, M.Sc., Federal University of Viçosa, May 2017..
Advisor: Dr. Renato Neves Feio. Co-advisor: Dr. Oswaldo Pinto Ribeiro Filho.
Comparison of venom toxicity of species of the genus *Bothrops* (Wagler, 1824) (Serpentes: Viperidae) in Zona da Mata Mineira, Minas Gerais, Brazil.
Advisor: Dr. Renato Neves Feio. Co-advisor: Dr. Oswaldo Pinto Ribeiro Filho.

The venom of snakes acts mainly to facilitate the process of prey digestion, besides having a function as a defense mechanism as well as attack, presenting components directed to the incapacitation and death of their prey. Bothrops venoms contain a complex mixture of proteins with and without enzymatic activity, small molecular weight proteins and peptides with distinct chemical and biological activities, as well as proteolytic or necrotizing, coagulant, hemorrhagic and nephrotoxic actions. In experimental models, different properties of different venom samples from species of the genus Bothrops can vary in substantial values, and such variations reflect their action in the organism. In the present comparative study of the toxicology of Bothrops species, eleven different methodologies were used to compare the venom of the Bothrops snakes occurring in the Zona da Mata mineira. Observed variations in the composition of the venom, both within the genus Bothrops and between the results obtained in the literature for the same species in other sampled regions. The results further corroborate the idea that toxicological variation within venoms of the same species may vary according to the habitat it occupies, thus creating a regional toxicological profile.

1. INTRODUÇÃO

A peçonha das serpentes atua principalmente para facilitar o processo de digestão das presas, além de possuírem função tanto como mecanismo de defesa quanto de ataque, apresentando componentes direcionados para incapacitação e morte de suas presas (Hider *et al.*, 1991). Estas peçonhas são uma complexa mistura de substâncias, em sua maioria de natureza proteica, que podem interferir bruscamente na homeostase, atuando em diversos processos fisiológicos. De modo geral são constituídos de neurotoxinas, cardiotoxinas (citotoxinas), miotoxinas e fatores que alteram a hemóstase (incluindo as hemorraginas).

Os venenos dos ofídios do gênero *Bothrops* contêm uma mistura complexa de proteínas com e sem atividade enzimática, proteínas de pequena massa molecular e peptídeos com atividades químicas e biológicas distintas. Sua composição contém hialuronidase, que explica a rapidez da absorção pelo aumento da perfusão através dos tecidos, hemotoxinas e citolisinas, que causam inflamação local, necrose e danos vasculares, fosfolipase A2, e esterase, que alteram a permeabilidade da membrana e liberam histaminas e bradicininas (Meier & Stocker, 1995). O veneno também possui ação proteolítica ou necrosante, coagulante, hemorrágica e nefrotóxica (Mendez & Riet-Correa, 1995). De modo geral, estas características estão associadas a determinadas famílias proteicas que são caracterizadas de acordo com as atividades enzimáticas desempenhadas (Metaloproteases, Serinoproteases, Fosfolipases, Desintegrinas, Peptídeos biologicamente ativos, Lectinas, Fatores de crescimento) (Odell *et al.*, 1998; Odell *et al.*, 1999).

Variações interespecíficas nos venenos de serpentes de mesmo gênero estão bem documentadas (Chippaux *et al.*, 1991). No gênero *Bothrops*, atividade coagulante, necrosante, bem como miotoxinas não são igualmente distribuídas dentro de cada espécie (Ferreira *et al.*, 1992). Essa variabilidade pode se dar por exemplo, por idade, sexo, dieta e distribuição geográfica, variando até mesmo dentro da mesma espécie.

Nos modelos experimentais, diferentes propriedades de diferentes amostras de venenos de espécies do gênero *Bothrops* podem variar em

valores substanciais (Dias-Da-Silva *et al.*, 1989), sendo que tais variações refletem sua ação no organismo.

Essa variação é fundamental para o diagnóstico de acidentes ofídicos quando este só pode ser identificado através dos sintomas clínicos. Tais observações indicam que o envenenamento devido a acidentes por cada espécie de *Bothrops*, podem diferir de acordo com a quantidade e qualidade das diferentes toxinas presentes em cada veneno de cada espécie.

O presente artigo desenvolve um estudo comparativo da toxicologia das espécies de *Bothrops* ocorrentes na Zona da Mata Mineira, comparando onze propriedades diferentes de cada amostra de veneno. Tal abordagem, é fundamental para efeito de comparação com trabalhos similares desenvolvidos em outras localidades. Além disso, pode auxiliar na identificação do grau de intoxicação de acordo com as atividades presentes no veneno das espécies que ocorrem na região, aqui destacadas, sendo esta uma importante ferramenta da literatura médica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Espécies e Venenos

Foram utilizadas amostras de venenos das seguintes serpentes do gênero *Bothrops*: *B. jararaca*; *B. jararacuçu*, *B. moojeni* e *Bothrops* cf. *jararaca*. Os animais utilizados foram capturados na região da Zona da Mata Mineira, e pertencem ao serpentário do Museu de Zoologia João Moojen de Oliveira – UFV, Viçosa – MG. Estes são todos fêmeas, foram isolados em terrários individuais no serpentário do Museu de Zoologia João Moojen de Oliveira e alimentados controladamente com a coleta de veneno ocorrendo 20 dias após a alimentação.

2.2. Animais

Para as metodologias *in vitro* (Atividades edematogênicas, necrosante e hemorrágica) foram utilizados camundongos isogênicos, do sexo masculino, pesando 18-22 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Brasil), previamente autorizados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA/UFV) através do processo 03/2017.

2.3. Análise eletroforética

Com o objetivo de separar por tamanho as proteínas, cada uma das cinco amostras de peçonha (10 µl 1:500) foi colocada em gel de acrilamida, seguindo o método de Laemmli (1970). Para comparação foi utilizado o padrão de peso molecular (Pharmacia) que usa proteínas de 30 KDa a 94 KDa.

2.4. Análise quantitativa de proteínas

A quantificação das proteínas presentes nas amostras, seguiu o protocolo sugerido por Furtado e Rocha (2007), com algumas adaptações. Para este experimento, cada amostra (10 µl, 1:500) foi feita em triplicata (n=3). O valor para leitura no espectrofotômetro foi de 660 nm.

2.5. Estimativa da atividade hemorrágica

A Atividade hemorrágica foi estimada de acordo com Kondo *et al.* (1960), com adaptações de Ownby *et al.* (1984). Camundongos foram injetados na região dorsal com soluções de 20 μ l (1:50) de cada veneno, em triplicata. Após uma hora, os camundongos foram eutanasiados com deslocamento cervical, a pele retirada do dorso e colocada em uma prancha. O diâmetro foi determinado para o alo hemorrágico medindo sua área mais interna (alo mais escuro) e mais externa (alo mais claro) com o programa ImageJ. A análise foi feita utilizando a média da triplicata de cada amostra. Os resultados foram expressos em cm².

2.6. Estimativa da atividade de indução de edema

A atividade de indução de edema dos venenos foi ensaiada de acordo com o método de Yamakawa *et al.* (1976). Os camundongos foram injetados na almofada da pata do membro posterior com 20 μ l (1:50) de cada veneno no pé direito e solução salina na esquerda, em triplicata. Após uma hora, os animais foram sacrificados com deslocamento cervical e ambas as pernas amputadas na altura do tornozelo e pesadas individualmente. O aumento de peso devido a edema foi calculado subtraindo do peso da perna controle. Os resultados foram expressos em mg/ μ l de veneno.

2.7. Estimativa da atividade necrosante

A necrose foi avaliada após análise do edema das patas. Foram utilizadas as patas do ensaio de edema, preparadas para descalcificação em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), trocando a solução a cada 24 horas por 21 dias. Após esse período, estas foram fixadas em resina e, posteriormente, cortes histológicos foram feitos na altura da almofada das patas para análise da necrose. As laminas foram preparadas e coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e fotografadas em escala de 50 μ m. A necrose foi avaliada comparando as lâminas das cinco amostras de veneno com a pata controle que foi injetada com PBS, verificando o grau de degradação tecidual encontrado nas lâminas.

2.8. Atividade coagulante em plasma humano

Foi registrado o tempo de coagulação de 200 µl de plasma humano preparado pelo método adaptado de (Theakston e Reid, 1983), incubando a 37°C, 5 µl de veneno ressuspendido em 50 µl de CaCl₂, por 45 minutos. Após esse período, leu-se os resultados em um espectrofotômetro de placas, por 15 minutos. Estes foram expressos através de um gráfico de linhas ilustrando a evolução da taxa de coagulação de cada veneno dentro do intervalo de tempo estimado.

2.9. Atividade Hemolítica Direta

Foram feitas triplicatas de 25 µl de solução de hemácias 2% incubadas com amostras de 5 µl de veneno bruto, por uma hora a 37°C. Células lisadas com água (100% de lise) ou incubadas com PBS (0% de lise) foram usadas como controles. Após incubação os tubos foram centrifugados por 10 min a 800 xg, e a absorvância do sobrenadante foi lida a 412 nm (Mayer, 1971).

2.10. Estimativa da atividade de fosfolipase A2

O método de Marinetti (1965), com ligeiras modificações, foi usado para avaliação da atividade fosfolipásica. Em uma suspensão de 3 ml de tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,0, e de gema de ovo, 250 µl (1:100) de cada veneno foi adicionado. A atividade de fosfolipase foi avaliada como os valores de redução da absorvância sobre um período incubação de 5 minutos, em triplicata, lida em 740 nm. Uma unidade de atividade de fosfolipase corresponde a uma redução de 0,001 de absorvância.

2.11. Atividade proteolítica sobre caseína

Para determinação da atividade proteolítica foi utilizado o método de Lomonte & Gutierrez (1983). Um mililitro da solução de caseína 1% é adicionada a 1 µl da amostra do veneno bruto. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C. As reações foram interrompidas com a adição de 3,0 ml de ácido tricloroacético a 5%. Os tubos foram mantidos em repouso em temperatura ambiente por 30 minutos. A seguir centrifugou-se o material por 10

minutos a 3000 rpm e a absorbância do sobrenadante lida a 280 nm, usando como "branco" amostra onde o veneno é substituído por água destilada. Uma unidade de atividade caseinolítica corresponde a um aumento de $A_{280} = 0,001$ /min.

2.12. Atividade Hemaglutinante

As hemácias foram lavadas com solução salina e centrifugadas a 4.000 rpm, durante 5 minutos, por 2 vezes. A atividade hemaglutinante foi determinada em placa de 96 poços com diluições seriadas, em triplicata, para a determinação da mínima concentração capaz de aglutinar diferentes hemácias. Foi feita uma diluição seriada de 100 μ l de PBS + 5 μ l de veneno bruto em dez poços. Em cada poço foi adicionado 25 μ l de suspensão de hemácias a 3% em PBS. As microplacas foram incubadas a temperatura ambiente e a atividade aglutinante verificada após 2 horas. Considerou-se como reação negativa para hemaglutinação, a formação de um precipitado de hemácias no fundo do poço e, reação positiva, a formação de uma camada heterogênea cobrindo todo o fundo (adaptado de Figueiroa & Lajolo, 1997).

2.13. Análise estatística

As análises estatísticas dos resultados foram executadas utilizando ANOVA de 1 via, Tukey e erro padrão da média. Para isso, usamos o software Graph Pad Prism 6. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3. RESULTADOS

3.1. Eletroforese

Na eletroforese, os perfis proteicos se mostraram similares para a maioria das amostras (Figura 01).

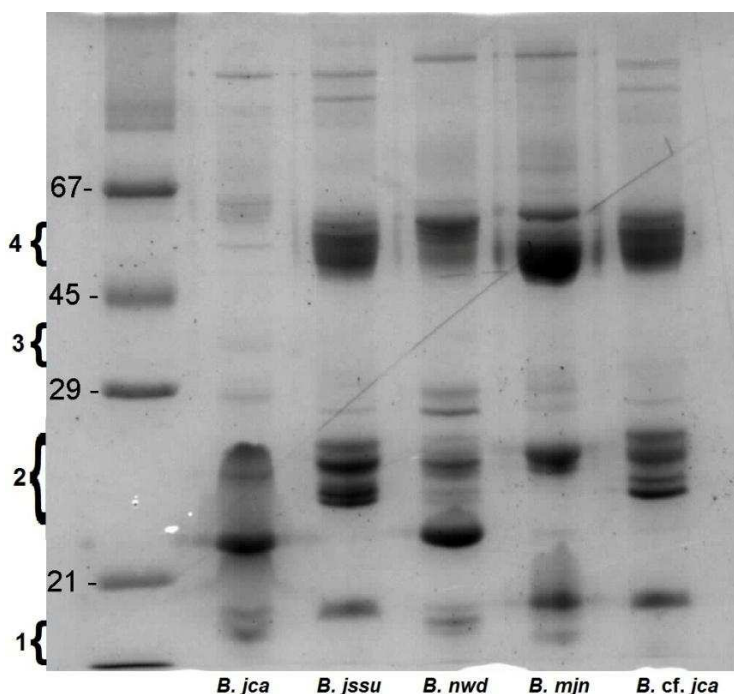


Figura 01: Perfil proteico das amostras de veneno analisadas.
Leg.: B. jca (*B. jararaca*); B. jssu (*B. jararacussu*); B. nwd (*B. neuwiedi*); B. mjn (*B. moojeni*); B. cf. jca (*B. cf. jararaca*).

Em uma visão geral, podemos observar um perfil de *B. jararaca* com abundância de proteínas menores que 29 KDa, destacando-se uma majoritária de aproximadamente 23KDa. *Bothrops jararacussu* e *B. cf. jararaca* com abundancia de proteínas na faixa de 45-67 KDa e 21-29 KDa, e perfis extremamente semelhantes. *B. neuwiedi* com abundancia de proteínas na faixa de 45-67 KDa e 21-29 KDa, destacando-se uma majoritária de aproximadamente 23KDa, semelhante à *B. jararaca* e *B. moojeni* com abundancia de proteínas na faixa de 45-67 KDa e 21-29 KDa, destacando-se uma majoritária de aproximadamente 50KDa.

3.2. Quantificação de proteínas

Os resultados apresentaram valores mais altos na quantificação das proteínas presentes nas peçonhas de *B. moojeni* (279,2435 mg/ml) seguida por

B. jararaca (236,1275 mg/ml). Os valores obtidos para as amostras de *B. jararacussu* (197,0312 mg/ml), *B. neuwiedi* (191,6238 mg/ml) e *B. cf. jararaca* (189,901 mg/ml), foram muito semelhantes, levando em conta a variação inferior a 10mg/ml entre as três amostras.

Apesar da maior diferença entre os valores encontrados para *Bothrops moojeni* e *Bothrops cf. jararaca* e em relação as outras amostras, estes não refletem a diferença entre as características destas peçonhas, uma vez que a associação entre estas proteínas é que dão ao veneno suas singularidades.

3.3. Atividade coagulante em plasma humano

A atividade coagulante apresentada pelos venenos de três das cinco espécies analisadas mostraram resultados bem parecidos (Figura 02).

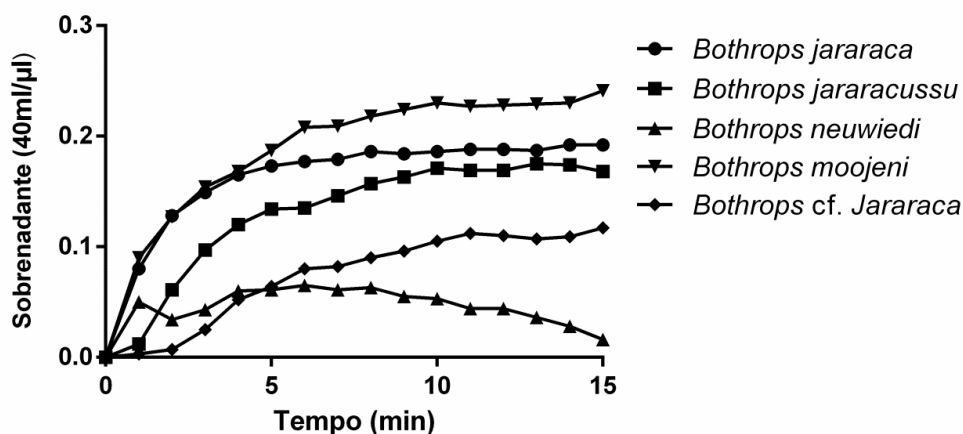


Figura 02: Evolução da atividade coagulante de plasma das amostras dentro de um intervalo de tempo (15 min). A amostra de *B. neuwiedi* apresentou uma curva diferente em relação as demais, com sobreposição de atividade anticoagulante.

O veneno de *B. moojeni* apresentou o maior pico de atividade coagulante, seguida por *B. jararaca* e *B. jararacussu* respectivamente.

A curva apresentada pelas três amostras foram similares, atingindo sua taxa de crescimento mais alta nos primeiros seis minutos.

Bothrops jararaca apresentou certa estabilidade com variações mínimas a partir dos cinco minutos, enquanto *B. jararacussu* e *B. moojeni* continuaram a apresentar um fator de crescimento, mesmo que mínimo.

Bothrops cf. jararaca apresentou um perfil de atividade coagulante muito baixa nos primeiros dois a três minutos. Após esse intervalo, pode-se observar

um crescimento constante de atividade, decrescendo entre onze e treze minutos.

Já *B. neuwiedi* apresentou resultados totalmente diferente das outras amostras, com valores inconstantes nos primeiros quatro minutos onde atingiu seu ponto mais alto da curva. Do minuto cinco em diante, os valores despencaram mostrando uma toxina com atividade anticoagulante muito potente.

3.4. Estimativa da atividade hemorrágica

Todas as amostras analisadas apresentaram atividade hemorrágica, porém sem diferenças significativas (Figuras 03 e 04). Pode-se observar que *B. cf. jararaca* apresentou os maiores índices, estando acima das demais. *B. jararacussu* apresentou picos um pouco mais altos em relação aos demais, com variação mínima entre os valores encontrados para os alos interno e externo.

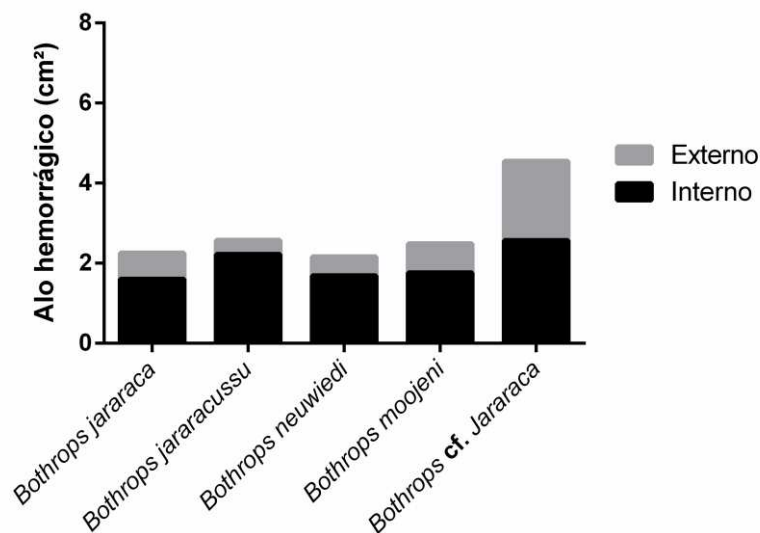


Figura 03: Medida dos alos hemorrágicos em cm². *Bothrops cf. jararaca* apresentou resultados que se destacam das demais.

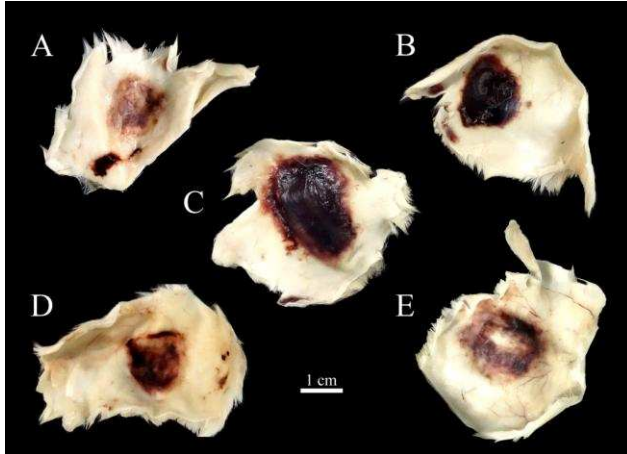


Figura 04: Fotografia dos alos hemorrágicos das amostras analisadas. **A-** *B. jararaca*; **B-** *B. jararacussu*; **C-** *B. cf. jararaca*; **D-** *B. moojeni*; **E-** *B. neuwiedi*.

Bothrops moojeni, *B. neuwiedi* e *B. jararaca* respectivamente apresentaram valores muito parecidos, com uma variação mínima entre estes.

3.5. Estimativa da atividade edematogênica

A ação edematogênica do veneno no organismo, está normalmente associada à quantidade de veneno inoculada pela serpente. Com um experimento controlado, pode-se observar melhor a diferença entre as espécies do gênero *Bothrops*.

Os maiores valores encontrados foram para *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* respectivamente. *Bothrops cf. jararaca* apresentou resultados levemente superiores aos de *B. jararaca* e *B. moojeni* respectivamente (Figuras 05 e 06).

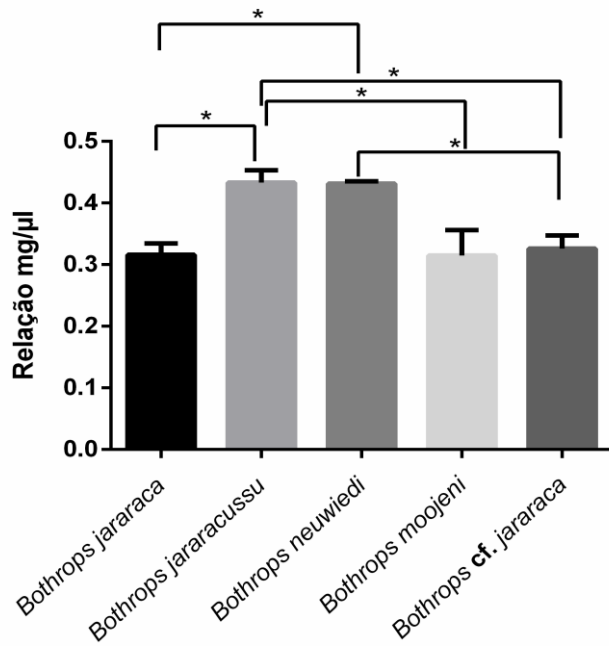


Figura 05: Atividade edematogênica das amostras analisadas. Todas as amostras apresentaram altos valores.

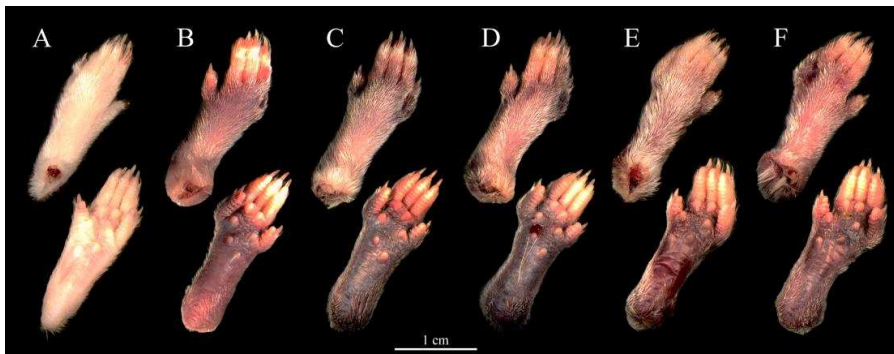


Figura 06: Patas usadas para medir a ação edematogênica amostras. **A-** Controle (PBS); **B-** *B. jararaca*; **C-** *B. jararacussu*; **D-** *B. neuwiedi*; **E-** *B. moojeni*; **F-** *B. cf. jararaca*.

Houve diferença significativa entre as amostras de *B. jararacussu* para *B. jararaca*, *B. cf. jararaca* e *B. moojeni*, além de *B. jararaca* e *B. cf. jararaca* para *B. moojeni*.

Essa pequena variação entre as amostras, apesar de possuir valor significativo para fins de comparação, não leva em conta a variação inter e intraespecífica existente na composição e nos efeitos dos venenos de serpentes.

3.6. Atividade Hemolítica Direta

Após passado o período de uma hora de incubação, *Bothrops moojeni* apresentou valores que extrapolaram em relação as demais, indicando a ocorrência de 100% de lise. Todas as outras amostras apresentaram valores muito baixos, não caracterizando a ação hemolítica direta (abaixo de 3%) (Figura 07).

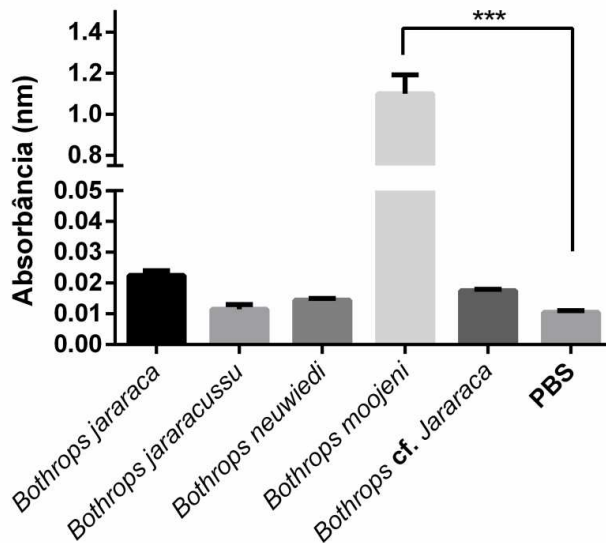


Figura 07: Atividade hemolítica direta. Destaque para a atividade apresentada pela amostra de *Bothrops moojeni*.

3.7. Estimativa da atividade de fosfolipase A2

Todas apresentaram resultados significativos para a atividade fosfolipásica, destacando além de *B. jararacussu*, as amostras de *B. neuwiedi* e *B. jararaca*, respectivamente (Figura 08).

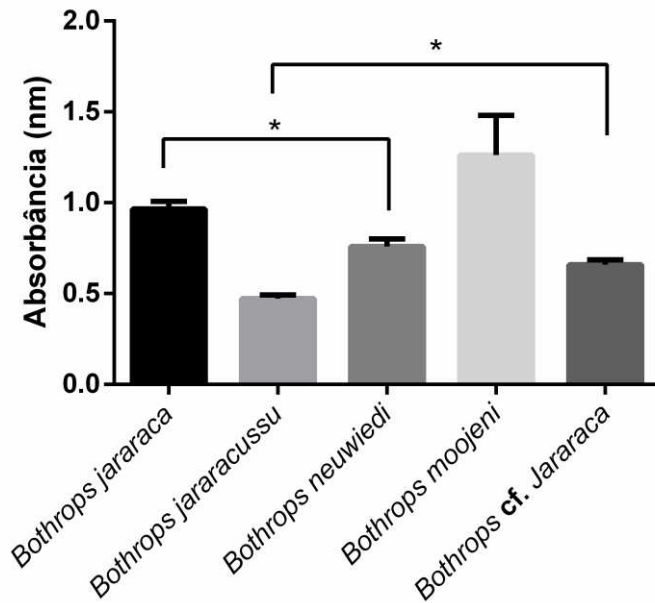


Figura 08: Atividade fosfolipásica. *Bothrops jararaca* e *Bothrops moojeni* apresentaram os maiores valores.

A atividade fosfolipásica apresentou diferença significativa entre as amostras de *B. jararacussu* e *B. moojeni*.

A atividade apresentada por *B. jararaca*, *B. neuwiedi* e *B. cf. jararaca* podem ser consideradas similares devido a variação mínima entre as amostras.

3.8. Atividade proteolítica sobre caseína

Todas as amostras apresentaram atividade proteolítica (Figura 09).

Bothrops moojeni apresentou os maiores valores. *B. jararaca* apresentou diferença significativa em relação à *B. neuwiedi*, enquanto *B. cf. jararaca* apresentou diferença significativa para a amostra de *B. jararacussu*.

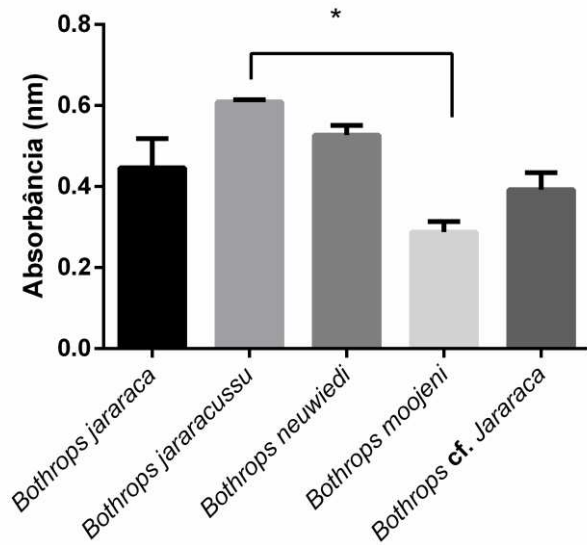


Figura 09: Atividade proteolítica sobre a caseína. *Bothrops jararacussu* apresentou diferença significativa em relação a *B. moojeni*.

3.9. Atividade hemaglutinante

Dentre as cinco amostras avaliadas, apenas *B. jararaca* e *B. neuwiedi* apresentaram atividade aglutinante sobre as hemácias (Figura 10). Sendo que a diluição máxima para *Bothrops jararaca* foi de 0,63 μ l e de *Bothrops neuwiedi* foi de 0,313 μ l.

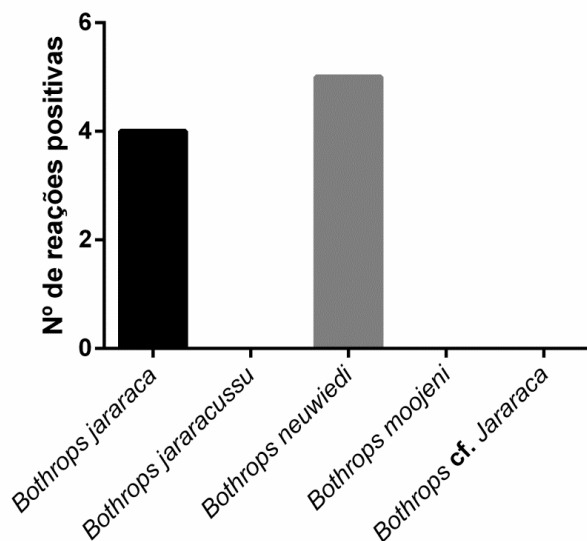


Figura 10: Atividade hemaglutinante. Apenas *B. jararaca* e *B. neuwiedi* apresentaram resultado positivo.

3.10. Estimativa da atividade necrosante

Todas as amostras analisadas apresentaram resultados bem similares, com degradação tecidual e celular intensa, derramamento de conteúdo intracelular, destruição das fibras musculares, e algumas amostras com decomposição tecidual mais avançada (Figuras 11, 12 e 13).

As amostras de *B. neuwiedi*, *B. jararacussu* e *B. cf. jararaca* apresentaram os resultados mais avançados em degradação tecidual. *Bothrops jararaca* e *B. moojeni* apresentaram uma atividade de degradação tecidual menos intensa, porém com maior acúmulo de células nas regiões de tecido muscular.

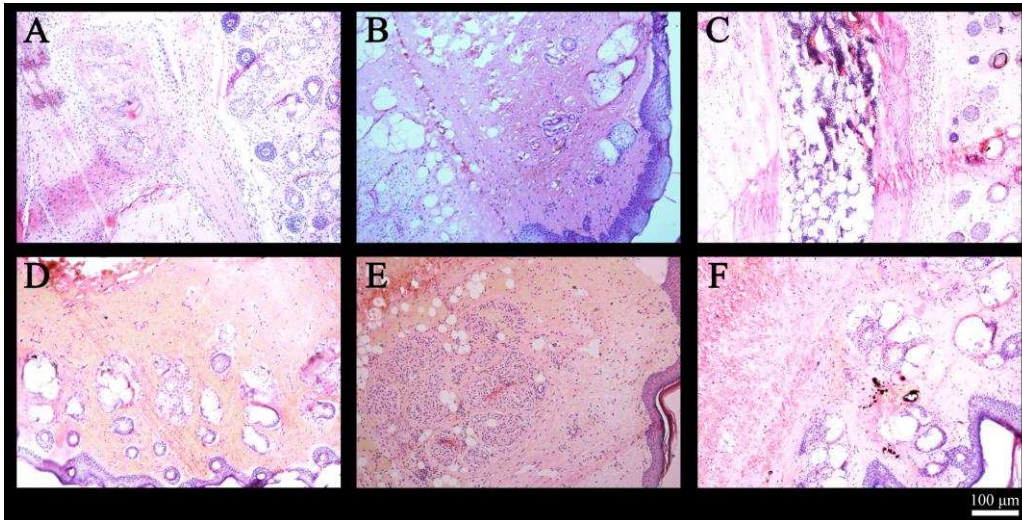


Figura 11: Corte longitudinal. Região periférica de tecido conjuntivo e epitelial de pata, comparando a atividade necrosante das amostras. A- Controle (PBS); B- *B. jararaca*; C- *B. jararacussu*; D- *B. neuwiedi*; E- *B. moojeni*; F- *B. cf. jararaca*.

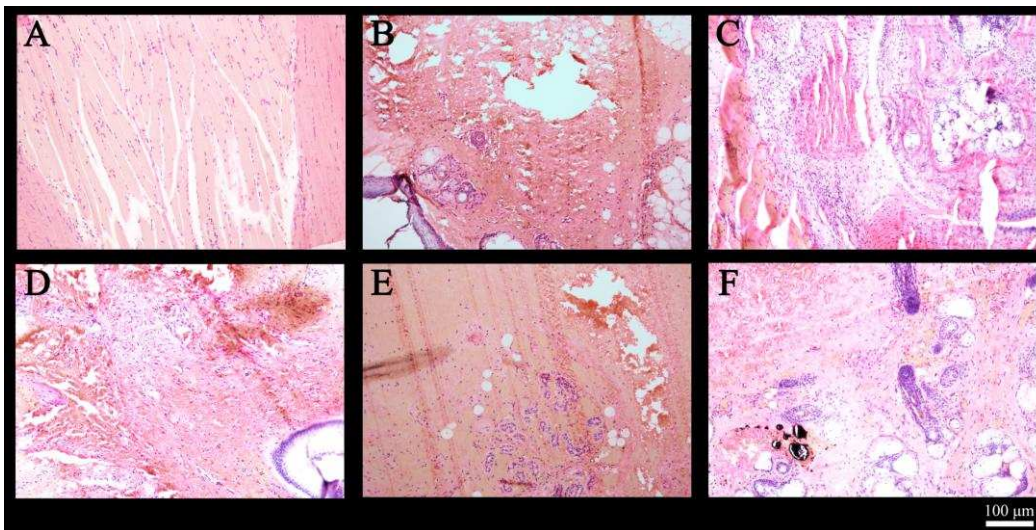


Figura 12: Corte longitudinal. Região de fibras musculares esqueléticas de pata, comparando a atividade necrosante das amostras. A- Controle (PBS); B- *B. jararaca*; C- *B. jararacussu*; D- *B. neuwiedi*; E- *B. moojeni*; F- *B. cf. jararaca*.

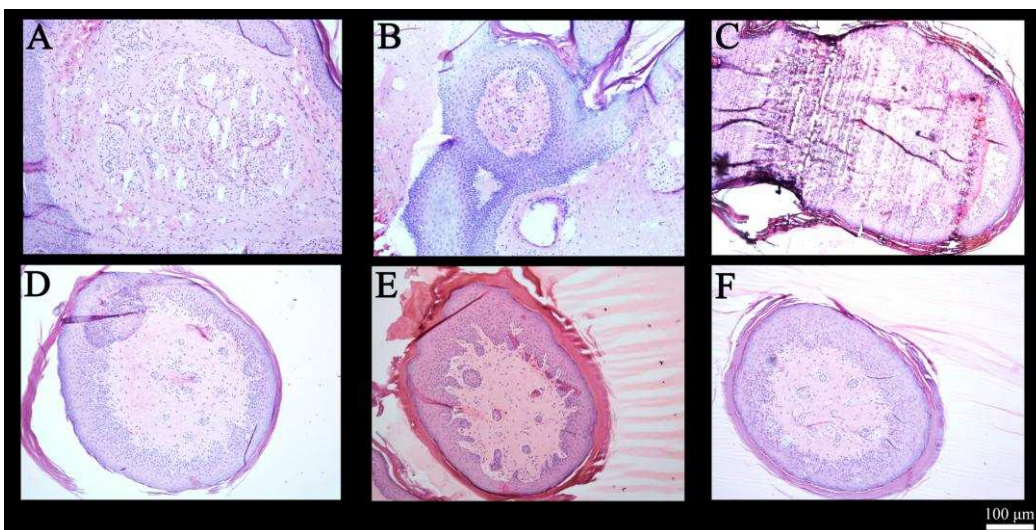


Figura 13: Corte transversal. Almofada da pata, comparando a atividade necrosante das amostras. A- Controle (PBS); B- *B. jararaca*; C- *B. jararacussu*; D- *B. neuwiedi*; E- *B. moojeni*; F- *B. cf. jararaca*.

4. DISCUSSÃO

Assim como observado em estudos anteriores, como os de Nahas et al. (1979), Furtado et al. (1991), Ferreira et al. (1992), Sanchez et al. (1992), Saad et al. (2012) e Barros et al. (2012), as principais toxinas presentes no veneno de serpentes do gênero *Bothrops* não são distribuídas igualmente entre as espécies.

Bothrops jararaca apresentou um perfil proteico bem diferente em relação aos encontrados nos trabalhos de Terra e Lema (2007) e Saad et al. (2012), e muito diferente das outras amostras analisadas neste estudo, com uma concentração de proteínas abaixo de 28KDa, na região dois.

As outras amostras apresentaram perfis que se dividem em duas regiões maiores (2 = 21-29 KDa e 4 = 45-67 KDa). Os resultados para *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* são semelhantes aos de Furtado et al. (1991).

Na região 2, destacam-se as fosfolipases e as enzimas inibidoras das serinoproteases da cascata de coagulação e proteolíticas (Bothroctetin, Bothrojaracin e Bothrombin), com valores próximos a 28 KDA, além de inibidores proteicos de trombina com valores de 27 KDA (Bothroalternin) (Terra e Lema, 2007; Rocha e Furtado, 2005).

As proteínas hemorrágicas (como Bothropasin e Alternagin) com 55KDa, apresentam valores que se encaixam na região quatro (4), onde o perfil das amostras estudadas, com exceção da *B. jca*, também se destacaram.

O resultado mais relevante no entanto, foi a semelhança encontrada entre os perfis das amostras de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops cf. jararaca*. Tal semelhança poderia ser relacionada com o grau de parentesco entre estas espécies, não fosse tamanho grau de variação existente na composição proteica da peçonha de animais até da mesma espécie.

No que diz respeito a quantificação de proteínas, apesar da significativa diferença entre os valores encontrados para *B. moojeni* e *B. cf. jararaca*, estes não refletem a diferença entre as características destas peçonhas, uma vez que a associação entre estas proteínas é que dão ao veneno suas singularidades (Terra e Lema, 2007). Porém, se isoladas e quantificadas individualmente, as proteínas podem revelar sua real relação quanto ao volume e potencial tóxico dentro de cada amostra.

A atividade coagulante em plasma humano mostrou-se mais potente para o veneno de *B. moojeni*, assim como observado por outros autores. Contudo, nossos resultados mostram uma baixa atividade coagulante para o veneno de *B. neuwiedi*, apresentando uma ação, aparentemente inibidora de serino proteases, após passado os primeiros cinco minutos no experimento *in vitro*. Foi observada também uma alta atividade para o veneno de *B. jararaca*, resultados estes divergentes de outros autores (Furtado et al., 1991; Ferreira et al., 1992; Sanchez et al., 1992).

A atividade edematogênica apresentou resultados significativos para todas as amostras analisadas. Diferente dos resultados obtidos por Sanchez et al. (1992) e Ferreira et al. (1992), as amostras de *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* apresentaram os maiores valores. Além de diferentes metodologias adotadas, fatores como a dieta empregada e as variações ambientais podem influenciar a atividade edematogênica (Saad et al., 2012).

Os altos valores para atividade edematogênica obtidos para todas as amostras, ressalta a potência do veneno botrópico em sua ação local, que pode ser observada nos casos de acidente com esses animais, onde, quase sempre, o acometido apresenta edema intenso (Amaral et al., 1991).

Alguns autores relatam que a atividade proteolítica está diretamente relacionada com as atividades coagulante e edematogênica, uma vez que as serino proteases atuam principalmente em componentes da cascata de coagulação resultando em desequilíbrio hemostático, e como precursoras de atividade inflamatória (Serrano, 2013; De Souza et al., 2015).

Já outros autores, analisando a variabilidade ontogênica dos seus venenos, mostraram que as enzimas proteolíticas podem apresentar uma correlação inversa com alguns fatores pró-coagulantes (Furtado et al., 1991).

Com resultados similares aos encontrados na literatura, *B. moojeni* apresentou um alto grau de atividade proteolítica, seguida por *B. jararaca*. Houve diferença significativa para os valores de *B. jararaca* / *B. neuwiedi* e *B. cf. jararaca* / *B. jararacussu*.

Bothrops neuwiedi apresentou baixos valores tanto em nossos resultados quanto dentro dos resultados na literatura (Furtado et al., 1991; Ferreira et al., 1992; Sanchez et al., 1992; De Souza et al., 2015). Apesar

disso, os valores obtidos não evidenciam nenhuma relação direta com a baixa atividade coagulante apresentada pela amostra da Zona da Mata.

Igualmente, não houve evidências de relação direta entre a atividade proteolítica e a atividade edematogênica dentro dos resultados obtidos, como apresentado por outros autores (Furtado et al., 1991; De Souza et al., 2015). Tais resultados podem estar relacionados com as diferentes metodologias utilizadas, ou mesmo com atividade de precursores enzimáticos específicos que desencadeiam tais atividades, e que, podem ter sua concentração variada por fatores diversos.

Fosfolipases A₂ constituem a maior parte dos componentes tóxicos das peçonhas botrópicas (Schaloske & Dennis, 2006). A atividade fosfolipásica sendo predominantemente alta em *B. jararacussu*, e baixa em *B. moojeni*, foge um pouco dos resultados apresentados na literatura. De Souza et al. (2015) e Ferreira et al. (1992), mesmo que com metodologias diferentes, apresentaram resultados semelhantes, onde estas espécies mostraram baixa atividade fosfolipásica.

As atividades edematogênicas e necrosantes, hora ligadas diretamente à atividade fosfolipásica, corroboram os resultados apresentados para fosfolipase A₂, uma vez que apresentam padrões que se assemelham aos encontrados para esta atividade dentro dos resultados.

A estreita relação entre a atividade fosfolipásica e a indução de edema, observada em outros estudos (Ferreira et al., 1992; De Souza et al., 2015) também foi observada em nossos resultados, estando relacionada com a atividade catalisadora de hidrólise de glicerofosfolípidos e promovendo a liberação de lisofosfolípidos e ácido araquidônico, precursores de moléculas envolvidas no processo inflamatório em tecidos e edema (Carvalho et al., 2013). Do mesmo modo, a fosfolipase A₂ pode estar atuando no aumento da reação inflamatória no local da inoculação do veneno e facilitando a necrose induzida pelo mesmo (Ferreira et al., 1992).

A baixa atividade fosfolipásica observada em *Bothrops moojeni* refuta os resultados encontrados em estudos anteriores, onde está apresentou os maiores valores (Ferreira et al., 1992; De Souza et al., 2015).

A atividade hemolítica está presente no veneno de todos os crotalíneos sulamericanos. Dentre estes, esta atividade é mais elevada no gênero *Crotalus*, porém também muito presente nos gêneros *Bothrops* e *Lachesis* (Farsky *et al.*, 2000).

A ausência de atividade hemolítica direta já havia sido relatada para outros grupos de serpentes do gênero *Bothrops*. A maioria das espécies do gênero apresenta atividade hemolítica indireta (Farsky *et al.*, 2000; Gutierrez *et al.*, 1984; Saldarriaga *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2004). Em nosso estudo não foi diferente, com exceção da espécie *B. moojeni*, que apresentou altos valores para atividade hemolítica direta.

A atividade hemolítica, está fortemente ligada a danos sistêmicos em órgãos vitais como os rins por exemplo, podendo causar hematúria e posteriormente IRA (insuficiência renal aguda) e falência renal (Boer-Lima *et al.*, 1999).

Apesar de apenas duas amostras (*B. jararaca* e *B. neuwiedi*) do experimento apresentarem atividade hemaglutinante, estudos com lectinas isoladas dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* tem mostrado o potencial hemaglutinante destas proteínas em outras espécies, incluindo as que apresentaram resultado negativo no presente experimento (Kassab, 2001; Ozeki, 1994; Carvalho, 1998; Panunto, 2006).

Simone *et al.*, 2006, mostraram que rendimento de lectina por mg de veneno bruto variou consideravelmente entre as diferentes amostras de veneno de espécies (*B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi* e *B. moojeni*) analisadas, sendo diretamente proporcional ao valor de proteínas totais encontradas nas amostras. Tal resultado não condiz com os encontrados neste trabalho, onde *B. moojeni*, por exemplo, apresenta a maior quantidade de proteínas e nenhuma atividade hemaglutinante.

Por outro lado, as lectinas podem apresentar afinidades bem específicas aos sítios de ligação. Como por exemplo as lectinas BJucuL (*B. jararacussu*) e BMool (*B. moojeni*) que apresentam maior afinidade para eritrócitos do tipo A humano, em comparação com os tipos B e O (Carvalho *et al.*, 1998; Kassab *et al.*, 2001). E a lectina Botrocetina (*B. jararaca*), que possui afinidade para indução de agregação plaquetária (Ozeki *et al.*, 1994). Todas estas variáveis

possivelmente influenciaram nos resultados obtidos no presente estudo, com exceção de *B. cf. jararaca*.

A atividade necrosante é uma característica muito bem observada e relatada nas peçonhas de víboras sulamericanas. As serpentes do gênero *Bothrops* apresentam tal atividade associada com a atividade edematogênica, como os principais traços sintomatológicos em acidentes. Sua ação desencadeia morte celular resultando em lise celular precoce, liberação de conteúdo intracelular nos tecidos circundantes, inflamação e edema (Ande et al., 2006).

Ferreira et al., 1992, observaram a existência de uma correlação direta entre as atividades fosfolipásicas e coagulantes com a atividade necrosante. A liberação de mediadores pró-inflamatórios responsáveis pela infiltração e ativação das células fagocíticas, auxiliando no aumento da reação inflamatória e da necrose induzida, é cauda pela atividade de fosfolipases (Pruzanski e vadas, 1991). Devido aos diferentes protocolos adotados, nossos resultados não podem refletir uma relação positiva ou negativa para estas atividades.

O que se pode observar é o alto potencial de atividade necrosante já esperado para as amostras de venenos do gênero *Bothrops*. Todas as amostras, apesar de algumas variações, apresentaram alto potencial necrosante como esperado. Assim como na literatura, *B. neuwiedi* apresentou maior atividade necrosante e *B. jararaca* menor intensidade desta atividade (Sanchez et al., 1992; Ferreira et al., 1992).

O fato de *B. cf. jararaca* novamente apresentar resultados relevantes para atividades locais do veneno, ressalta a importância de um estudo ainda mais a fundo com a peçonha deste animal ainda pouco estudado.

A atividade hemorrágica apresentou resultados semelhantes aos encontrados por Ferreira et al. (1992), com exceção da amostra de *B. cf. jararaca*, uma vez que essa é utilizada para este estudo pela primeira vez.

É interessante observar que a atividade hemorrágica foi mais potente na amostra de *B. cf. jararaca*. Isso ressalta a importância deste tipo de estudo, principalmente para aquelas espécies que venham a gerar alguma dúvida taxonômica, pois essas, assim como o exemplo de nosso experimento, podem apresentar singularidades na composição de sua peçonha.

Vale ressaltar que a ação hemorrágica, assim como a hemolítica, do veneno das serpentes viperídeas, é peça chave para complicações sistêmicas em órgãos vitais como os rins por exemplo (França & Fan, 1992). Ela age sobre as proteínas da matriz extracelular presente na membrana basal, associada a sua ação sobre células endoteliais causando a lise celular (Hati *et al.*, 1999; Gutiérrez e Rucavado, 2000; Oliveira-Júnior *et al.*, 2012).

5. CONCLUSÃO

Os resultados apontaram variações na composição dos venenos, tanto dentro do gênero *Bothrops*, quanto entre os resultados obtidos na literatura para as mesmas espécies. Com exceção do veneno da espécie *B. cf. jararaca*, que apresentou resultados que apontam um grande potencial para ação local no organismo. Apesar de apresentar um perfil proteico similar a *B. jararacussu*, esta possui um perfil toxicológico singular, e ainda pouco estudado.

No geral, estes corroboram outros achados da literatura, sugerindo que a composição do veneno vem a ser dependente de cada animal, podendo ser influenciado por diversos fatores bióticos e abióticos.

Essa variabilidade apresentada aponta a necessidade de uma maior amostragem a nível regional, uma vez que venenos de localidades diferentes, mesmo tratando-se da mesma espécie, podem vir a apresentar sintomatologias clínicas de diferentes intensidades, necessitando procedimentos clínicos diferentes. Consequentemente, novos estudos sobre a avaliação da eficácia do antiveneno para acidentes ofídicos em diferentes localidades se faz necessário.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDE, S. R., KOMMOJU, P. R., DRAXL, S., MURKOVIC, M., MACHEROUX, P., GHISLA, S., and FERRANDO-MAY, E. (2006). Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. *Apoptosis* 11, 1439–1451.

AMARAL, C. F. S., DOURADO, H. V., KOUYOUMDJIAN, J. A., CARDOSO, J. L., CAMPOS, J. A., AZEVEDO-MARQUES, M. M. and LOPES, P. F. A. (1991) *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos*.

BOER-LIMA, P. A., GONTIJO, J. A. R., AND CRUZ-HÖFLING, M. A. (1999). Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61(5), pp. 698–706.

CARVALHO, B. M., SANTOS, J. D., XAVIER, B. M., ALMEIDA, J. R., RESENDE, L. M., MARTINS, W., MARCUSSI, S., MARANGONI, S., STÁBELI and R. G., CALDERON, L. A. (2013). Snake venom PLA2s inhibitors isolated from Brazilian plants: Synthetic and natural molecules. *Biomed. Res. Int.* 2013, 153045.

CARVALHO, D. D., MARANGONI, S., OLIVEIRA, B. and NOVELLO, J. C. (1998). Isolation and characterization of a new lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Biochemistry and molecular biology international*, Vol. 44, No. 5, pp. 933-938.

CHIPPAUX JP, WILLIAMS V, WHITE J. (1991). Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 29 (11): 1279-303.

DE-SIMONE, S. G., NETTO, C. C. and SILVA JR., F. P. (2006). Simple affinity chromatographic procedure to purify β -galactoside binding lectins. *Journal of Chromatography B*, 838, pp. 135–138.

DE SOUZA, L. L., STRANSKY, S., GUERRA-DUARTE, C., FLOR-SÁ, A., SCHNEIDER, F. S., KALAPOTHAKIS, E., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. (2015). Determination of Toxic Activities in *Bothrops* spp. Snake Venoms Using Animal-Free Approaches: Correlation Between *In Vitro* Versus *In Vivo* Assays. *Toxicological Sciences*, 1–8.

DIAS-DA-SILVA, W., GUIDOLIN, R., RAW, I., HIGASHI, H. G., CARICATI, C. P., MORAIS, J. F., LIMA, M. L., YAMAGUCHI, I. K., NISHIKAWA, A. K., STEPHANO, M. A., MARCELINO, J. R., PINTO, J. R. and SANTOS, M. J. (1989). Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. *Mem. Inst. Butantan* 51, 153-168.

FARSKY, S.H.; GONÇALVES, L.R.C.; GUTIERREZ, J.M.; CORREA A.P.; RUCAVADO A.; GASQUE P. (2000). *Bothrops asper* snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system. Role in leucocyte recruitment, *Mediat Inflamm*, Oxford, v. 9, p.213–21.

FERREIRA, M. L., MOURA DA SILVA, A. M., FRANÇA, F. O. S., CARDOSO, J. L., and MOTA, I. (1992). Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. *Toxicon* 30: 1603–8.

FIGUEIROA, M. O. R., LAJOLO F.M. (1997). Effect of chemical modification of *Phaseolus vulgaris* lectins on their biological properties. *J Agric Food Chem.* 45:639–643.

FRANÇA, F.O.S. and FAN, H.W (1992). Acidente Botrópico. In: SCHVARTSMAN, S. Plantas venenosas e animais peçonhentos, *Sarvier*, pp. 149-160.

FURTADO, M. F. and ROCHA, M. M. T. (2007). Análise das atividades biológicas dos venenos de *Philodryas olfersii* (Lichtenstein) e *P. patagoniensis* (Girard) (Serpentes, Colubridae). *Revista Brasileira de Zoologia* 24 (2): 410–418, junho 2007.

FURTADO, M. F. D., MARUYAMA, M., KAMUGUTI, A. S., and ANTONIO, L. C. (1991). Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their juvenile. *Toxicon* 29: 219–26.

GONÇALVES, L. R. C., MARIANO, M. (2000). Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. *Mediators Inflamm.* 9: 101–7.

GUTIERREZ, J. M., and RUCAVADO, A. (2000). Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82:841–850.

HATI, R., P. MITRA, S. SARKER, AND K. K. BHATTACHARYYA. (1999). Snake venom hemorrhagins. *Critical Reviews in Toxicology* 29:1–19.

HIDER, R.C., KARLSSON, E., NAMIRANIAN, S. (1991). Separation and purification of toxins from snake venoms. *Snake toxins, international encyclopedia of pharmacology and therapeutics pergamon press.* Harvey, A.L. UK, Elsevier: 1-34.

HOGUE, A.R., ROMANO-HOGUE, S.A.R.W.L. (1978-79). Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. *Mem Inst Butantan* 42/43: 373-496.

KASSAB, B. H., DE CARVALHO, D. D., MARANGONI, S. and NOVELLO, J.C. (2001). Characterization of a hemagglutinating glycoprotein isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Protein and Peptide Letters*, Vol. 8, No. 1, pp. 13-20.

KONDO, H., KONDO, S., IKEZAWA, L, MURATA, R. AND OHSAKA, A. (1960) Studies of the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 13, 43-51 .

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, London*, v. 227, p. 680-685.

- LOMONTE B, GUTIÉRREZ J M. (1983). La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. *Rev. Biol. Tropical*. V. 31, n.1, p. 37-40.
- LOMONTE, B., GUTIERREZ, J.M. (1983). Proteolytic activity of snake venoms of Costa Rica on casein. *Rev Biol Trop*. 31(1): 37-40.
- MARINETTI, G. V. (1965) The action of phospholipase A² on lipoproteins. *Biochim . Biophys . Acta* 98, 554-558.
- MAYER, M.M. (1971). Complement and complement fixation. In: Chales, C. Experimental Immunchemistry. *Thomas Publisher*, 1971. Chapter 4, p.133-40.
- MEIER, J.S., STOCKER, K.F. (1995). Biology and distribution of venoms snake of medical importance and the composition of snake venoms. Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons. Meier, J.S., White, J. Boca Raton, CRC Press: 367.
- MENDEZ, M.C., RIET-CORREA, F. (1995). Snakebite in sheep. *Vet Hum Toxicol* 37(1): 62-3.
- NAHAS, L., KAMIGUTI, A. S., and BARROS, M. A. R. (1979). Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thromb. Haemostasis*, 41: 314–28.
- ODELL, G.V., FENTON, A.W., OWNBY, C.L., DOSS, M.P., SCHMIDT, J.O. (1999). "The role of venom citrate." *Toxicon* 37(3): 407-9.
- ODELL, G.V., FERRY, P.C., VICK, L.M., FENTON, A.W., DECKER, L.S., COWELL, R.L., OWNBY, C.L., GUTIERREZ, J.M. (1998). "Citrate inhibition of snake venom proteases." *Toxicon* 36(12): 1801-6.
- OLIVEIRA-JÚNIOR,N.G, SILVA, O. N., OLIVEIRA, V. C., DIAS S. C., FRANCO O. L. (2012). Toxicological and Histological Evaluation of *Bothrops itapetiningae* Venom. *Journal of Herpetology*, 46(4):653-657.
- OWNBY, C. L., COLBERG, T. R. AND ODELL G. V. (1984). A new method for quantitating hemorrhage induced by rattlesnake venoms: ability of polyvalent antivenom to neutralize hemorrhagic activity. *Toxicon* 22, 227-233.
- OZEKI,Y., MATSUI, T., HAMAKO, J., SUZUKI, M., FUJIMURA, Y., YOSHIDA, E., NISHIDA, S. and TITANI K. (1994). C-Type Galactoside-Binding Lectin from *Bothrops jararaca* Venom: Comparison of Its Structure and Function with Those of Botrocetin. *Archives of biochemistry and biophysics* Vol. 308, No. pp. 306-310.
- PANUNTO, P. C., DA SILVA, M. A., LINARDI, A., BUZIN, M. P., MELO, S. E. S. F. C., MELLO, S. M., PRADO-FRANCESCHI, J. and HYSLOP, S. (2006). Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon* 47, 21–31.

PRUZANSKI, W. and VADAS, P. (1991) Phospholipase A2 - mediator between proximal and distal effectors of inflammation . *Immunology Today* 12, 143-146.

ROCHA M M T, FURTADO M F. (2005). Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil. *Rev. Bras. de Zoologia*, v. 22, n. 2, p. 383-393, jun., 2005.

SAAD, E., BARROS, L. C., BISCOLA, N., PIMENTA, D., BARRAVIERA, S., BARRAVIERA, B. and FERREIRA JR, R. S (2012). Intraspecific variation of biological activities in venoms from wild and captive *Bothrops jararaca*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 75:1–10.

SALDARRIAGAA, M. M., OTERO, R., NÚÑEZ, V., TORO, M. F., DÍAZ, A. and GUTIÉRREZ J. M. (2003). Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon* 42, 405–411.

SANCHEZ, E. F., FREITAS, T. V., FERREIRA-ALVES, D. L., VELARDE, Z D. T., DINIZ, M. R., CORDEIRO, M. N., AGOSTINI-COTTA, G. and DINIZ, C. R. (1992). Biological activities of venoms from south american snakes. *Toxicon* vol.30, nº1. pp. 95-103.

SCHALOSKE, R.H.; DENNIS, E.A. (2006). The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys. Acta*; v.1761; p.1246-1259.

SERRANO, S. M. (2013). The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon* 62, 19–26.

SOARES, A. M., SESTITO, W. P., MARCUSSI, S., STÁBELI, R. G., ANDRIÃO-ESCARSO, S. H., CUNHA, O. A. B., VIEIRA, C. A. and GIGLIO, J. R. (2004). Alkylation of myotoxic phospholipases A2 in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 258–270.

TERRA, A. L. C; LEMA, T. (2007). Comparison of toxicity among pitvipers poison of the genus *Bothrops** present in the south and southeast regions of Brazil (*Serpentes: Viperidae). *Rev. bras. toxicol*; 20(1/2): 55-63.

THEAKSTON, R.D., REID, H.A. (1983). Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. *Bull World Health Organ* 61(6): 949-56.

YAMAKAWA, M., NOZAKI, M. and HOKAMA, Z. (1976). Fractionation of sakishima habu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal hemorrhagic and edema forming activities of the fractions. *Animal Plant and Microbial Toxins*, Vol. 1, p. 97.

5. CONCLUSÃO GERAL

Apesar de apenas três das cinco espécies registradas para a Zona da Mata Mineira serem consideradas como espécies regionais (*B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. neuwiedi*), o número de animais do gênero *Bothrops* registrados durante os quinze anos de estudo (2001-2015) foi muito alto. Isso ressalta o quão bem adaptados estão estes animais ao clima da região. As variações de temperatura e precipitação não mostraram grandes impactos no número de animais registrados nas coleções.

Com microclima bastante diversificado em toda a região da Zona da Mata Mineira, os fatores abióticos e as populações de serpentes *Bothrops* compõem um complexo ecossistema regional, através de suas constantes interações. A melhor compreensão destas interações necessita de pesquisas deste tipo dentro dos regimes climáticos atuais, levando em conta que os fatores abióticos e o ambiente tendem a se moldar constantemente.

O ofidismo com serpentes do gênero *Bothrops* mostrou relação direta com a antropização de áreas naturais, que atua no crescimento do número de acidentes ofídicos na região. Esse número também se mostrou maior nas regiões mais ao norte da Zona da Mata Mineira, onde a monocultura cafeeira é predominante e também tem sua influência nos altos números de acidentes registrados na região.

O conhecimento da capacidade de intoxicação dos venenos das serpentes tem importância direta para o tratamento dos acidentes ofídicos. A variabilidade do potencial toxicológico encontrado nas diferentes amostras da Zona da Mata Mineira analisadas aponta para a necessidade de uma maior amostragem a nível regional em outras localidades. Serpentes de localidades diferentes, mesmo tratando-se da mesma espécie, podem vir a causar acidentes com sintomatologias clínicas de diferentes intensidades, necessitando procedimentos clínicos específicos.

Em um aspecto mais amplo, observa-se que os fatores abióticos influenciam as populações de serpentes do gênero *Bothrops* de diferentes maneiras, seja em características comportamentais relacionados a sua distribuição, ou até mesmo na composição das toxinas, interagindo através do metabolismo destes animais.