**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
Centro de Energia Nuclear na Agricultura**

**Estado sanitário do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em
paisagens antropizadas no Estado de São Paulo**

Luís Antonio Bochetti Basset

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Ecologia Aplicada

**Piracicaba
2016**

Luís Antonio Bochetti Basset
Médico Veterinário

Estado sanitário do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em paisagens antropizadas no Estado de São Paulo

Orientadora:
Profa. Dra. **ELIANA REIKO MATUSHIMA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Ecologia Aplicada

Piracicaba
2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Basset, Luís Antonio Bochetti

Estado sanitário do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em paisagens antropizadas no Estado de São Paulo / Luís Antonio Bochetti Basset. - - Piracicaba, 2016.
85 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Centro de Energia Nuclear na Agricultura.

1. Crocodilianos 2. Hematologia 3. Bioquímica do sangue 4. Microbiologia
5. Antimicrobianos I. Título

CDD 639.394
B319e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Dra. Eliana Reiko Matushima, que tem me auxiliado durante minha vida na pós-graduação, quer pelo auxílio no mestrado, quer pela orientação no doutorado.

À minha orientadora acadêmica e coordenadora do PPGI-EA Professora Dra. Maria Victoria Ramos Ballester, por me assistir nos primeiros meses desta minha caminhada.

Ao Professor Dr. Luciano Martins Verdade pelos conselhos, pelas oportunidades e pela amizade demonstrada durante esses curtos 15 anos de convivência.

À minha esposa Limerici e as minhas filhas mais que amadas Nina e Sarah. Vocês são as razões de minha vida. Sem vocês nada faria sentido nessa nossa caminhada.

Aos meus pais eu digo: Não há maior demonstração de amor do que doar a vida pelos seus filhos. Que de boas árvores, perdurem bons frutos.

Aos irmãos e amigos Thiago “Salmão” Marques, Neliton “Larik” Lara e Thiago Portelinha. Ainda que eu escrevesse mil páginas, não seria suficiente para expressar minha gratidão e carinho por vocês.

À Antonia Mara Piacentini Casarin (secretária do PPGI-EA) por toda a sua disposição e paciência em me ajudar.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro.

Aos pesquisadores Dr. Pablo Sirosky, Dra. Gisela Poletta, Dra. Virgínia Parachu e Dr. Carlos Piña, pelo envio de valiosas informações.

À todas as demais pessoas que de uma forma ou outra me auxiliaram no desenvolvimento deste projeto.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE SIGLAS.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
Referências.....	20
2 VALORES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DO SANGUE DE JACARÉS-DE-PAPO-AMARELO (<i>Caiman latirostris</i>) EM ÁREAS ANTROPIZADAS: INTERVALOS DE REFERÊNCIA.....	25
Resumo.....	25
Abstract.....	25
2.1 Introdução.....	26
2.2. Material e Métodos.....	27
2.2.1 Área de estudo.....	27
2.2.2 Captura e marcação.....	31
2.2.3 Biometria e sexagem.....	32
2.2.4 Colheita de material.....	33
2.2.5 Processamento do material.....	34
2.2.5.1 Perfil Hematológico.....	34
2.2.5.1.1 Metodologia analítica.....	34
2.2.5.2 Perfil Bioquímico.....	39
2.2.6 Análise dos dados.....	39
2.3 Resultados.....	39
2.4 Discussão.....	47
2.5 Conclusões.....	52
Referências.....	52
3 CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA ORAL EM ASSOCIAÇÃO COM O TESTE DE PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS EM JACARÉS-PAPO-AMARELO (<i>Caiman</i> <i>latirostris</i>) DE VIDA LIVRE.....	61
Resumo.....	61

Abstract.....	61
3.1 Introdução.....	62
3.2 Material e Métodos.....	63
3.2.1 Área de estudo.....	63
3.2.2 Captura e marcação.....	65
3.2.3 Biometria e sexagem.....	66
3.2.4 Colheita do material.....	67
3.2.4.1 Processamento do material.....	68
3.2.4.1.1 Isolamento, identificação e caracterização microbiana.....	68
3.2.4.1.2 Testes de perfil de susceptibilidade a antimicrobianos.....	70
3.3 Resultados.....	71
3.4 Discussão.....	76
3.5 Conclusão.....	80
Referências.....	81

RESUMO

Estado sanitário do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em paisagens antropizadas no Estado de São Paulo

O jacaré-de-papo (*Caiman latirostris*) é considerado um crocodiliano de médio porte que apresenta uma ampla distribuição latitudinal na América do Sul. Possivelmente a espécie possui a situação mais complexa entre os crocodilianos brasileiros quanto ao aspecto da conservação, basicamente porque suas populações encontram-se fragmentadas em grande parte de sua área de distribuição original e por utilizarem áreas com fortes atividades antrópicas. Embora a espécie possua aparentemente um processo adaptativo frente a estas pressões, um aspecto fisiológico pode ainda sofrer rápida alteração quando submetido a elas: o estado sanitário. Desta maneira, este estudo objetivou determinar o estado sanitário do maior predador aquático, utilizando duas áreas distintas no Estado de São Paulo, através da determinação dos perfis hematológicos e bioquímicos do sangue, além da caracterização da microbiota oral, servindo de modelo à conservação da espécie em ambientes alterados. No primeiro capítulo foram determinados o perfil hematológico e bioquímico do sangue utilizando-se 29 indivíduos (19 machos e 10 fêmeas) capturados em Angatuba e 11 indivíduos (2 machos, 4 fêmeas e 5 filhotes) capturados em Cubatão. Diferenças estatísticas significativas foram encontradas nos valores de creatinina na comparação entre fêmeas de ambas as áreas de estudo ($p = 0,033$) e nos valores de alanina aminotransferase ($p = 0,003$), hemácias ($p = 0,034$), hemoglobina ($p = 0,049$) e volume corpuscular médio ($p = 0,027$) quando da comparação entre sexos. No segundo capítulo determinou-se a microbiota oral destes animais através do isolamento, identificação e caracterização bacteriana, em conjunto com o teste de perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos. Foram determinados 14 diferentes tipos de bactérias na área de Angatuba, sendo uma classificada como baciliforme aeróbio Gram-positivo, uma como bacilo Gram-negativo e 12 classificadas como Enterobactérias Gram-negativas. Na área de Cubatão foram isolados cinco tipos de bactérias, sendo quatro classificadas como Enterobactérias Gram-negativas e uma como baciliforme aeróbio Gram-positivo. Considerando que o uso de antimicrobianos é um processo primário no tratamento de animais e pessoas, principalmente nos casos que envolvam infecções provocadas pela interação homem x animais, para ambas as áreas de estudo, as quinolonas Enrofloxacina e Norfloxacina, além do aminoglicosídeo Gentamicina, foram os antimicrobianos que apresentaram os menores índices de resistência frente aos isolados testados.

Palavras-chave: Crocodilianos; Hematologia; Bioquímica do sangue; Microbiologia; Antimicrobianos

ABSTRACT

Health status of broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) in disturbed landscapes in São Paulo State

The broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) is considered a medium-sized crocodilian, which has a wide latitudinal distribution in South America. The species may possibly have a more complex situation among Brazilian crocodilians on the aspect of conservation, basically, because their populations are fragmented in much of their original range, forcing these animals to disperse through areas with strong human activities. Although the species apparently went through an adaptive process against these pressures, a physiological aspect may undergo rapid change when subjected to them: the health status. Thus, this study aimed to determine the health status of the largest aquatic predator, using two distinct areas in São Paulo State, through the determination of hematological and biochemical profiles of blood, in addition to the characterization of oral microbiota, serving as a model for conservation of the species in anthropic habitats. In the first chapter were determined the hematological and biochemical blood profiles of 29 individuals (19 males and 10 females) captured in Angatuba and 11 individuals (2 males, 4 females and 5 hatchlings) captured in Cubatão. Statistically significant differences were found in creatinine values when comparing females of both areas of the study ($p = 0.033$) and in alanine aminotransferase values ($p = 0.003$), erythrocytes ($p = 0.034$), hemoglobin ($p = 0.049$) and mean corpuscular volume ($p = 0.027$) when comparing genders. In the second chapter the oral microbiota of these animals was determined by isolation, identification and characterization of the bacteria, besides the antimicrobial susceptibility profile compared to the isolates tested. The results showed growth of 14 different species of bacteria in the Angatuba area, one classified as Aerobic Gram-positive Bacilliform, one as Gram-negative Bacilli and 12 classified as Gram-negative Enterobacteria. In the Cubatão area five species of bacteria were isolated, four classified as Gram-negative Enterobacteria and one as Aerobic Gram-positive Bacilliform. Considering that the use of antimicrobials is a primary process in the treatment of animals and people, especially in cases involving infections caused by human x animal interaction for both study areas, quinolones Enrofloxacin and Norfloxacin, and the aminoglycosides Gentamicin were the antimicrobials that had the lowest resistance rates against the tested isolates.

Keywords: Crocodilians; Hematology; Blood biochemistry; Microbiology; Antimicrobial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição geográfica do jacaré-de-papo-amarelo (<i>Caiman latirostris</i>).....	17
Figura 2 -	Bacia Hidrográfica do Alto Paranapanema.....	28
Figura 3 -	Área de estudo localizada no município de Angatuba evidenciando os corpos d'água amostrados: Açude Vermelho; Lagoão; Lagoa Suja; Açude do Casemiro; Três Lagoas).....	29
Figura 4 -	Bacia Hidrográfica da Baixada Santista.....	31
Figura 5 -	Métodos de captura e marcação, onde A é o método de captura com laço de aço e utilização de barco; B é o método de captura com utilização de armadilha tipo funil (<i>Funnel Trap</i>); e C é o método de marcação através de aplicação subcutânea de <i>transponders</i> (microchips).....	32
Figura 6 -	Biometria e sexagem, onde A é a realização da tomada de peso (Massa Corpórea = MC); e B é o procedimento de sexagem através da exposição do pênis com auxílio de espelho nasal de tamanho apropriado.....	33
Figura 7 -	Colheita de sangue no seio occipital venoso.....	34
Figura 8 -	Em vermelho os quadrantes utilizados para a contagem de eritrócitos na câmara de Neubauer.....	35
Figura 9 -	Quadrantes utilizados para a contagem de leucócitos na câmara de Neubauer.....	36
Figura 10 -	A) Hemácias; B) Seta vermelha: Linfócito; C) Seta vermelha: Hemácias; Seta verde: Basófilo; D) Seta verde: Linfócitos; Seta Vermelha: Heterófilos; E) Seta verde: Eosinófilo; E) Seta amarela: Monócito. Coloração de Rosenfeld. Foto: Prioste, Fabíola - Doutoranda em Ciências pelo Programa de Patologia Experimental e Comparada FMVZ-USP.....	37
Figura 11 -	Variação entre valores dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue na comparação entre fêmeas nas áreas de Angatuba/SP (FA) e Cubatão/SP (FC).....	41
Figura 12 -	Variação entre valores dos parâmetros hematológicos e	

	bioquímicos do sangue na comparação entre sexos na área de Angatuba/SP, onde: FA = Fêmeas e MA = Machos.....	42
Figura 13 -	Relação entre creatinina e massa corpórea em fêmeas na área de Angatuba/SP.....	45
Figura 14 -	Relação entre número absoluto de linfócitos e massa corpórea em fêmeas da área de Angatuba/SP.....	45
Figura 15 -	Relação entre ácido úrico e massa corpórea em fêmeas da área de Cubatão/SP.....	56
Figura 16 -	Área de estudo localizada no município de Angatuba evidenciando os corpos d'água amostrados: 1 - Açude Vermelho; 2 - Lagoão; 3 - Lagoa Suja; 4 - Açude do Casemiro; 5 - Três Lagoas.....	64
Figura 17 -	Bacia Hidrográfica de Cubatão/SP.....	65
Figura 18 -	Métodos de captura e marcação, onde A é o método de captura com laço de aço e utilização de barco; B é o método de captura com utilização de armadilha tipo funil (<i>Funnel Trap</i>); e C é o método de marcação através de aplicação subcutânea de <i>transponders</i> (microchips).....	66
Figura 19 -	Biometria e sexagem, onde A é a realização da tomada de peso (Massa Corpórea = MC); e B é o procedimento de sexagem através da exposição manual do pênis.....	67
Figura 20 -	Abertura manual da boca e esfregaço de <i>swab</i> para colheita da microbiota oral em jovem capturado em armadilha tipo <i>Funnel Trap</i> durante o período diurno.....	68
Figura 21 -	Incubação em ágar Sangue e ágar MacConkey.....	69
Figura 22 -	Microscopia: lâmina apresentando Bacilos Gram-negativos (Lac -).....	69
Figura 23 -	Utilização da técnica de disco de difusão pelo método de Kirby-Bauer, em ágar Mueller Hinton, para o teste de perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	71
Figura 24 -	Casas de Ribeirinhos com lançamento de efluentes domésticos diretamente em corpo de água na Bacia Hidrográfica da Baixada Santista.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados descritivos dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do jacaré-de-papo-amarelo (<i>Caiman latirostris</i>) na comparação das fêmeas entre as áreas de estudo.....	40
Tabela 2 -	Dados descritivos dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do jacaré-de-papo-amarelo (<i>Caiman latirostris</i>) na comparação entre sexos em Angatuba, sudeste do Brasil.....	41
Tabela 3 -	Relações entre os parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue e a massa corpórea do jacaré-de-papo-amarelo (<i>Caiman latirostris</i>) em Angatuba e Cubatão.....	43
Tabela 4 -	Dados descritivos dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue dos filhotes de jacaré-de-papo-amarelo (<i>Caiman latirostris</i>) da área Cubatão.....	46
Tabela 5 -	Frequências de isolamento das bactérias encontradas na cavidade oral de jacarés-de-papo-amarelo (<i>Caiman latirostris</i>) de vida livre na área de Angatuba.....	72
Tabela 6 -	Frequências de isolamento das bactérias encontradas na cavidade oral de jacarés-de-papo-amarelo (<i>Caiman latirostris</i>) de vida livre na área de Cubatão.....	72
Tabela 7 -	Índice de resistência antimicrobiana das bactérias isoladas na área Angatuba (%).....	75
Tabela 8 -	Índice de resistência antimicrobiana das bactérias isoladas na área Cubatão (%).....	75

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABRAF	Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas
ALT	Alanina Aminotransferase
APP	Área de Preservação Permanente
AST	Aspartato Aminotransferase
AU	Ácido Úrico
BAS	Basófilos
CBH-BS	Comitê de Bacias Hidrográficas - Baixada Santista
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CIZBAS	Centro Interdepartamental de Zootecnia e Biologia de Animais Silvestres
CITES	Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora
CR	Creatinina
EDTA	Etilenodiaminotetracético
EOS	Eosinófilos
FA	Fosfatase alcalina
GGT	Glutamiltransferase
Hb	Hemoglobina
HEM	Hemácias
HET	Heterófilos
Ht	Hematócrito
IPT	Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
LDH	Lactato desidrogenase
LEUC	Leucócitos
LIN	Linfócitos
LrLc	<i>Low Risk/Least Concern</i>
MC	Massa Corpórea
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MON	Monócitos
O ₂	Oxigênio
pH	Potencial Hidrogeniônico

PP	Proteína Plasmática Total
SIGRH	Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo
SVL	Snout Vent Length
TL	Total Length
UR	Uréia
VCM	Volume Corpuscular Médio
VG	Volume Globular

1 INTRODUÇÃO

O jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) é considerado um crocodiliano de médio porte, com ampla distribuição latitudinal (5°S a 34°S), compreendendo Argentina, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Brasil (VERDADE; PIÑA, 2006) (Figura 1), sendo dificilmente visualizados animais maiores que dois metros na natureza (VERDADE, 1998).

Figura 1 - Distribuição geográfica do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*)
Fonte: Coutinho et al. (2013)

Como todos os crocodilianos, a espécie tem hábitos semiaquáticos, sendo primariamente encontrada em águas lentas, que incluem pântanos, várzeas e mangues ao longo da costa atlântica brasileira (MEDEM, 1983), porém a espécie parece ter se adaptado bem a outros tipos de habitats, como lagos, rios, riachos e açudes (BORTEIRO et al., 2006),

incluindo aqueles considerados artificiais, construídos como reservatórios de água para agricultura ou para a criação de gado, o que de certa forma, está favorecendo a dispersão deste crocodiliano (SCOTT et al., 1990; VERDADE; LAVORENTI, 1990; BORTEIRO et al., 2001, 2008; PIÑA, LARRIERA, 2003; BORTEIRO, 2005). Por outro lado, a inclusão destes novos habitats também tem causado aumento da pressão antrópica sobre estes animais (e.g. drenagem de várzeas para a agricultura e poluição de rios) e, junto com a caça predatória para o comércio ilegal, principalmente para o consumo de carne, visto que o comércio de pele tem se mostrado cada vez mais rígido em suas aquisições, tem resultado no declínio de algumas de suas populações.

Possivelmente a espécie possui a situação mais complexa entre os crocodilianos brasileiros quanto ao aspecto da conservação, basicamente porque suas populações encontram-se fragmentadas em grande parte de sua área de distribuição original (VILLELA, 2004), sendo que por muitos anos a espécie foi considerada ameaçada de extinção (GROOMBRIDGE, 1987; BERNARDES; MACHADO; RYLANDS, 1990). A espécie não se encontra mais na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (MACHADO; DRUMMOND; PAGLIA, 2008), e passou a ser enquadrada na categoria de baixo risco/menor preocupação (*Low Risk/Least Concern* - LrLc) da Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (*International Union for Conservation of Nature* - IUCN (CROCODILE SPECIALIST GROUP - CSG, 1996). Nos dias atuais, a Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas da Fauna e Flora Selvagens (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* - CITES) classifica este crocodiliano no apêndice I, exceto na Argentina (apêndice II).

No Brasil, a sua saída da lista de espécies ameaçadas de extinção tornou-se possível, em grande parte, à manutenção do Programa de Conservação do Jacaré-de-Papo-Amarelo da Universidade de São Paulo (*campus* Piracicaba), que iniciou suas atividades em 1988, com o antigo nome Centro Interdepartamental de Zootecnia e Biologia de Animais Silvestres - CIZBAS, focando suas pesquisas principalmente na manutenção e reprodução da espécie em cativeiro (VERDADE; LAVORENTI, 1990; VERDADE, 2001a), inserindo no contexto nacional a elaboração e instalação de criadouros comerciais legalizados da espécie *Caiman latirostris*. Esse processo acabou por fomentar nas pessoas ideais conservacionistas, através das visitas monitoradas aos criadouros, que puderam agregar este procedimento como nova fonte de renda, além do fornecimento de pele e carne de forma legalizada no comércio. Mais tarde, com a necessidade de se monitorar populações selvagens, o programa aumentou amplamente seus experimentos, passando a tratar os problemas de forma multidisciplinar. Isso

promoveu, nos últimos 25 anos, um avanço considerável nas pesquisas relacionadas à biologia reprodutiva da espécie (VAC et al., 1992; LARSEN et al., 1992; VERDADE et al., 1992a, 1992b, 2003; VERDADE; LAVORENTI; PACKER, 1993; VERDADE; SARKIS, 1998; VERDADE, 1995, 2001b), à nutrição (SARKIS-GONÇALVES; CASTRO; VERDADE, 2002; SARKIS-GONÇALVES et al., 2002), ao comportamento social (VERDADE, 1992, 1999; PIFFER; VERDADE, 2002), ao comportamento de termorregulação (VERDADE et al., 1994; FINCATTI; VERDADE, 2002; BASSETTI, et al., 2005, 2014), à morfometria (VERDADE, 2000, 2003; PIÑA et al., 2007), à biologia molecular (ZUCOLOTO; VERDADE; COUTINHO, 2002; VERDADE; ZUCOLOTO; COUTINHO, 2002; VILLELA et al., 2008; ZUCOLOTO et al., 2009), ao uso do espaço (VERDADE; PIÑA; ARAÚJO, 2006; MARQUES et al., 2014), à ecologia isotópica (MARQUES et al., 2013) e, por fim, aos aspectos sanitários (RAMOS et al., 1992; GARCIA et al., 1993; BASSETTI, 2007; BASSETTI; VERDADE, 2014).

Apesar dos avanços proporcionados por todos estes experimentos, e pela espécie possuir aparentemente um processo adaptativo frente às pressões antrópicas, um aspecto fisiológico pode ainda sofrer rápida alteração quando submetido a elas: o estado sanitário. Desta maneira, a inserção de estudos relacionados aos componentes sanguíneos e a microbiota oral deve ser considerada, principalmente por sua importância para a detecção de doenças (estado sanitário) se correlacionada com o “status” de uma população. Segundo Almosny e Monteiro (2007), os perfis hematológicos e bioquímicos do sangue refletem com alta concordância o estado de saúde de um determinado animal ou de uma população, sendo que se pode diagnosticar animais saudáveis e doentes, diferenciando processos fisiológicos e patológicos. Embora o exame destes componentes permita importante monitoramento das variações que venham a ocorrer a nível sistêmico, este avanço do conhecimento frente aos aspectos sanitários, para a espécie em questão, ainda é muito pequeno ou inexistente.

Neste segmento, o estudo da microbiota oral dos jacarés-de-papo-amarelo se torna relevante na medida em que também se procura compreender o micro bioma oral, e se ele pode ser um fator relevante para o declínio de uma população, principalmente na presença de agentes estressores (e.g. degradação do habitat e poluição) que venham reduzir a imunidade destes animais. Como consequência, algumas destas bactérias poderão se multiplicar e passar do estado comensal à oportunista, podendo causar a morte de indivíduos, levando ao declínio de uma população. Além disso, muitas destas bactérias têm potencial zoonótico, podendo afetar diretamente o homem e os animais domésticos, quer seja por consumo de carne

contaminada, por uso de águas compartilhadas por estas espécies (e.g. consumo de água para beber e lazer), ou por acidentes envolvendo estes animais (e.g. mordidas).

Por estes motivos, este estudo teve o intuito de conhecer o estado sanitário do maior predador aquático em duas áreas distintas no Estado de São Paulo, servindo de modelo à conservação da espécie em ambientes alterados. Para tanto, foram determinados o perfil hematológico, o perfil bioquímico do sangue e a microbiota oral através do isolamento, identificação e caracterização bacteriana, além do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos testados em relação aos isolados.

Referências

ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, A.O. Patologia clínica. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. cap. 59, p. 939-966.

BASSETTI, L.A.B. Crocodylia (Jacaré, Crocodilo). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. (Ed.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Editora Roca, 2007. cap. 10, p. 120-135.

BASSETTI, L.A.B.; VERDADE, L.M. Crocodylia. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. (Org.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Editora Roca, 2014. cap. 13, p. 154-169.

BASSETTI, L.A.B.; CHIANN, C.; TOLOI, C.M.C.; VERDADE, L.M. Comportamento de termorregulação em jacarés-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) adultos em cativeiro. In: REUNIÓN REGIONAL DE AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE DEL GRUPO DE ESPECIALISTAS EN COCODRILOS, 2005, Santa Fé. **Memorias...** Santa Fe: Ministério de la Producción de la Provincia de Santa Fe, 2005. p. 330-340.

BASSETTI, L.A.B.; MARQUES, T.S.; MALVÁSIO, A.; PIÑA, C.I.; VERDADE, L.M. Thermoregulation in captive broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). **Zoological Studies**, Taipei, v. 53, n. 9. p. 1-10, Feb. 2014.

BERNARDES, A.T.; MACHADO, A.B.M.; RYLANDS, A.B. **Fauna brasileira ameaçada de extinção**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1990. 62 p.

BORTEIRO, C. **Abundancia, estructura poblacional y dieta de yacarés (*Caiman latirostris*: Crocodylia, Alligatoridae) en ambientes antrópicos del Departamento de Artigas, Uruguay**. 2001. 79 p. Dissertación (Maestria em Biología) - Universidad de la República, Montevideo. 2005.

BORTEIRO, C.; GUTIÉRREZ, F.; TEDROS, M.; KOLENC, F. Conservation status of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae) in disturbed landscapes of northwestern Uruguay. **South American Journal of Herpetology**, São Paulo, v. 3, n. 3, p. 244-250, Dec. 2008.

BORTEIRO, C.; PRIGIONI, C.; GARCIA, J.E.; TEDROS, M.; GUTIÉRREZ, F.; KOLENC, F. Geographic distribution and conservation status of *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae) in Uruguay. **Phyllomedusa: Journal of Herpetology**, Piracicaba, v. 5, n. 2, p. 97-108, Dec. 2006.

BORTEIRO, C.; TEDROS, F.; GUTIÉRREZ, F.; KOLENC, F.; SPERANZA, G.; DRAGONETTI, J.P. First survey of *Caiman latirostris* in northern Uruguay. **Crocodile Specialist Group. Crocodile Specialist Group**, Sanderson, v. 20, p. 28-30. 2001.

COUTINHO, M.E.; MARIONI, B.; FARIAS, I.; VERDADE, L.M.; BASSETTI, L.; MENDONÇA, S.H.S.T.; VIEIRA, T.Q.; MAGUNUSSON, W.E.; CAMPOS, Z. Avaliação do risco de extinção do jacaré-de-papo-amarelo *Caiman latirostris* (Daudin, 1802) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, Goiânia, v. 3, n. 1, p. 13-20, 2013.

CROCODILE SPECIALIST GROUP. **IUCN red list of threatened species**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 12 out. 2014.

FINCATTI, C.R.; VERDADE, L.M. Variação térmica microclimática em estufa plástica e sua aplicação para a manutenção de filhotes de jacarés. In: VERDADE, L.M.; LARRIERA, A. (Ed.). **La conservación y el manejo de los caimanes y cocodrilos de América Latina**. Piracicaba: C.N. Editoria, 2002. p. 75-81.

GARCIA, P.B.; MATUSHIMA, E.R.; RAMOS, M.C.C.; DIAS, J.L.C.; VERDADE, L.M. Variações sazonais do padrão hematológico e proteico de jacarés de papo amarelo (*Caiman latirostris*) em cativeiro: resultados preliminares. In: WORKSHOP SOBRE CONSERVAÇÃO E MANEJO DO JACARÉ-DO-PAPO-AMARELO, 1992, São Paulo. **Anais...** Piracicaba: [s.n.], 1993. p. 51-60.

GROOMBRIDGE, B. The distribution and status of world crocodilians. In: WEBB G.J.; MANOLIS, S.C.; WHITEHEAD P.J. (Ed.). **Wildlife management: crocodiles and alligators**. Chipping Norton: Surrey Beatty, 1987. p. 9-21.

LARSEN, R.E.; VERDADE, L.M.; MEIRELLES, C.F.; LAVORENTI, A. Broad-nosed caiman (*Caiman latirostris*) semen collection, evaluation, and maintenance in diluents. In: WORKING MEETING OF THE IUCN-SSC CROCODILE SPECIALIST GROUP, 1992, Gland. **Proceedings...** Gland: IUCN, 1992. p. 270-276.

MACHADO A.B.M.; DRUMMOND G.M.; PAGLIA A.P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília: MMA; Fundação Biodiversitas, 2008. 1420 p.

MARQUES, T.S.; BASSETTI, L.A.B.; LARA, N.R.F.; ARAÚJO, M.S.; PIÑA, C.I.; CAMARGO, P.B.; VERDADE, L.M. Isotopic discrimination factors ($\Delta^{13}\text{C}$ and $\Delta^{15}\text{N}$) between tissues and diet of the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). **Journal of Herpetology**, Athens, v. 48, n. 3, p. 332-337, 2014

MEDEM, F. **Los crocodylia de Sur America**. Bogotá: Editora Carrera, 1983. 270 p.

PIFFER, T.R.O.; VERDADE, L.M. *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) courtship behavior. **Herpetological Review**, Lawrence, v. 33, n. 2, p. 132-133, 2002.

PIÑA, C.I.; LARRIERA, A. Natural history notes: *Caiman latirostris* (Broad-snouted Caiman) feeding. **Herpetological Review**, Lawrence, p. 34-56, 2003.

PIÑA, C.I.; LARRIERA, A.; SIROSKI, P.; VERDADE, L.M. Cranial sexual discrimination in hatchling broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). **Iheringia**, Porto Alegre, v. 97, p. 17-20, 2007.

RAMOS, M.C.C.; MATUSHIMA, E.R.; VERDADE, L.M.; CARVALHO, V.M.; SANCHES, F.F. Microbiota bacteriana aeróbica oral de jacarés-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*): implicações no manejo em cativeiro. In: WORKSHOP SOBRE CONSERVAÇÃO E MANEJO DO JACARÉ-DE-PAPO-AMARELO (*Caiman latirostris*), 2., 1992, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: [s.n.], 1992. p. 33-42.

SARKIS-GONÇALVES, F.; CASTRO, A.M.V.; VERDADE, L.M. Uso de descartes de origem animal e ganho de peso de jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em cativeiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 59, n. 2, p. 243-250, 2002.

SARKIS-GONÇALVES, F.; BÓSCOLO, F.N.; CASTRO, A.M.V.; VERDADE, L.M. Influência da dieta na formação de osteodermos em jacarés-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em cativeiro. In: VERDADE, L.M.; LARRIERA, A. (Ed.). **La conservación y manejo de los crocodylia de America Latina**. Piracicaba: CN Editoria, 2002. p. 157-165.

SCOTT, N.J., AQUINO, A.; FITZGERALD, L.A. Distribution, habitats and conservation of the caiman (Alligatoridae) of Paraguay. **Vida Silvestre Neotropical**, Washington, v. 2, p. 43-51, 1990.

VAC, M.H.; VERDADE, L.M.; MEIRELLES, C.F.; LARSEN, R.E.; MICHELOTTI, F.; RANGEL, M.C.; SALEM, C.Z.; LAVORENTI, A. Ultrasound evaluation of the follicle development in adult female broad-nosed caiman (*Caiman latirostris*). In: CROCODILES. WORKING MEETING OF THE CROCODILE SPECIALIST GROUP, IUCN, 1992, Gland. **Proceedings...** Gland: IUCN, 1992. p. 176-183.

VERDADE, L.M. Agonistic social behavior of broad-nosed caiman (*Caiman latirostris*) in captivity: implications to reproductive management. In: WORKING MEETING OF THE CROCODILE SPECIALIST GROUP, 1992, Gland. **Proceedings...** Gland: IUCN, 1992. p. 200-217.

_____. Biologia reprodutiva do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em São Paulo, Brasil. In: LARRIERA, A.; VERDADE, L.M. (Ed.). **Conservación y manejo de los crocodylia de America Latina**. Santo Tomé: Fundación Banco Bica, 1995. p. 57-79.

_____. **Morphometric analysis of the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*): an assessment of individuals' clutch, body size, sex, age, and area of origin.** 1997. 174 p. Thesis (PhD in Wildlife Ecology and Conservation) - University of Florida, Gainesville, 1997.

_____. *Caiman latirostris*. In: ROSS, J.P. (Ed.). **Crocodiles status survey and conservation action plan**. Gland: IUCN; Cambridge: SSC, 1998. p. 18-20.

_____. *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) behavior. **Herpetological Review**, Lawrence, v. 30, n. 1, p. 38-39, 1999.

_____. Regression equations between body and head measurements in the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 60, p. 469-482, 2000.

_____. Allometry of reproduction in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 61, n. 3, p. 171-175, 2001a.

_____. Programa Experimental de Criação em Cativeiro do Jacaré-de-Papo-Amarelo (*Caiman latirostris*) da ESALQ / USP: histórico e perspectivas. In: MATTOS, W.R.S. (Ed.). **A produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001b. p. 559-564.

_____. Cranial sexual dimorphism in captive adult broad-snouted-caiman (*Caiman latirostris*). **Amphibia-Reptilia**, Wiesbaden, v. 24, p. 92-99, 2003.

VERDADE, L.M.; LAVORENTI, A. Preliminary notes on the status and conservation of *Caiman latirostris* in São Paulo, Brazil. In WORKING MEETING OF THE CROCODILE SPECIALIST GROUP, IUCN, 10., 1990, Gland. **Proceedings...** Gland: IUCN, 1990. p. 231-237.

VERDADE, L.M.; PIÑA, C.I. *Caiman latirostris*. **Catalogue of the American Society of Amphibians and Reptiles**, Bethesda, v. 833, p. 1-21, 2006.

VERDADE, L.M.; SARKIS, F. Age at first reproduction in captive *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman). **Herpetological Review**, Lawrence, v. 29, n. 4, p. 227-228, 1998.

VERDADE, L.M.; LAVORENTI, A.; PACKER, I.U. Manejo reprodutivo do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em cativeiro. In: WORKSHOP SOBRE CONSERVAÇÃO E MANEJO DO JACARÉ-DE-PAPO-AMARELO (*CAIMAN LATIROSTRIS*), 1993, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, 1993. p. 143-152.

VERDADE, L.M.; PIÑA, C.I.; ARAÚJO, J.L.O. Diurnal use of space by captive adult broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*): implications for pen design. **Aquaculture**, New York, v. 251, p. 333-339, 2006.

VERDADE, L.M.; ZUCOLOTO, R.B.; COUTINHO, L.L. Microgeographic variation in *Caiman latirostris*. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 294, p. 387-396, 2002.

VERDADE, L.M.; PACKER, I.U.; MICHELOTTI, F.; RANGEL, M.C. Thermoregulatory behavior of broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) under different thermal regimes. In: WORKSHOP SOBRE CONSERVACIÓN Y MANEJO DEL YACARE OVERO (*Caiman latirostris*), 1994, Santo Tomé. **Memorias...** Santo Tomé: Fundación Banco Bica, 1994. p. 84-94.

VERDADE, L.M.; SARKIS-GONÇALVES, F.; MIRANDA-VILELLA, M.P.; BASSETTI, L.A.B. New record of age at sexual maturity in captivity for *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman). **Herpetological Review**, Lawrence, v. 34, n. 3, p. 225-226, 2003.

VERDADE, L.M.; LAVORENTI, A.; MICHELOTTI, F.; RANGEL, M.C.; CULLEN JUNIOR, L.; ERNANDES, M.M. Preliminary notes on nesting Biology of the broad-nosed caiman (*Caiman latirostris*) in São Paulo, Brazil. In: WORKING MEETING OF THE CROCODILE SPECIALIST GROUP, 1992, Gland. **Proceedings...** Gland: IUCN. 1992a. p. 226-232.

VERDADE, L.M.; MICHELOTTI, F.; RANGEL, M.C.; CULLEN JÚNIOR, L.; ERNANDES, M.M.; LAVORENTI, A. Manejo dos ovos de jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) no CIZBAS / ESALQ / USP. In: WORKSHOP SOBRE CONSERVAÇÃO E MANEJO DO JACARÉ-DE-PAPO-AMARELO (*CAIMAN LATIROSTRIS*), 1992, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, 1992b. p. 92-99.

VILLELA, P.M.S. **Caracterização genética de populações de jacarés-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*), utilizando marcadores microssatélites**. 2004. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

VILLELA, P.M.S.; COUTINHO, L.L.; PIÑA, C.I.; VERDADE, L.M. Macrogeographic genetic variation in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 309A, p. 1-9, Dec. 2008.

ZUCOLOTO, R.B.; VERDADE, L.M.; COUTINHO, L.L. DNA microsatellite library for the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 294, p. 346-351, 2002.

ZUCOLOTO, R.B.; VERDADE, L.M.; VILLELA, P.M.S.; REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. Parentage test in broad-snouted caimans (*Caiman latirostris*, Alligatoridae) using microsatellite DNA. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 32, p. 874-881, 2009.

2 VALORES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DO SANGUE DE JACARÉS-DE-PAPO-AMARELO (*Caiman latirostris*) EM ÁREAS ANTROPIZADAS: INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Resumo

Os métodos e técnicas que promovem a compreensão dos parâmetros fisiológicos em relação ao meio ambiente estão tendo um lugar privilegiado nos estudos ecológicos dos animais selvagens, principalmente porque podem ser utilizados como ferramentas de diagnóstico. Desta forma, estudos envolvendo a hematologia e a bioquímica do sangue permitem obter informações sobre a saúde de um animal ou de uma população. Porém, poucos estudos prévios têm sido realizados no estabelecimento das taxas normais dos valores hematológicos e bioquímicos do sangue em relação ao jacaré-papo-amarelo (*Caiman latirostris*), e muitas discrepâncias têm sido observadas nestes experimentos. Para a solução deste problema, objetivou-se descrever um padrão de referência espécie-específico para as áreas de estudo utilizadas neste experimento, evitando-se assim as constantes diferenças encontradas, oferecendo respostas mais precisas para o diagnóstico de doenças. Além disso, em conjunto com outros fatores, essas informações podem auxiliar na gestão de planos de manejo, devido principalmente à possibilidade de epidemias levarem estas populações a um declínio, ou em casos extremos, a extinção local. Para tanto foram capturados 29 indivíduos de jacaré-de-papo-amarelo (19 machos e 10 fêmeas) em Angatuba e 11 indivíduos (2 machos, 4 fêmeas e 5 filhotes) em Cubatão. A média do comprimento rostro-cloacal foi $50,79 \pm 19,75$ cm e $30,23 \pm 16,51$ cm para Angatuba e Cubatão, respectivamente. A média da massa corpórea foi 5599 ± 7492 g e 1308 ± 1624 g para Angatuba e Cubatão, respectivamente. Diferenças estatísticas entre as fêmeas de ambas as áreas de estudo foram encontradas em 1 dos 17 parâmetros analisados, sendo que as fêmeas de Cubatão apresentaram maiores valores creatinina que as fêmeas de Angatuba, e quando da comparação entre sexos na área de Angatuba, foram encontradas diferenças significativas para alanina aminotransferase ($p = 0,003$), hemácias ($p = 0,034$), hemoglobina ($p = 0,049$) e volume corpuscular médio ($p = 0,027$). Além disso, valores mínimos, médios e máximos dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue foram descritos para fêmeas, machos e filhotes.

Palavras-chave: Crocodilianos; Hematologia; Bioquímica do sangue

Abstract

The methods and techniques that promote understanding of physiological parameters in relation to the environment have a privileged place in ecological studies of wild animals, mainly because they can be used as diagnostic tools. In this way, studies involving hematology and blood biochemistry allow obtaining information about the health of an animal or population. However, few previous studies have been conducted to establish the normal rates of hematological and biochemical values of blood against the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*), and many discrepancies have been observed in these experiments. To solve this problem, the objective was to describe a species-specific pattern reference for the areas of study used in this experiment, thus avoiding constant differences and offering more precise answers for sickness diagnosis. In addition, and in conjunction with other factors, such information may assist with management plans, mainly because of the possibility of epidemics provoking populations to decline, or in extreme cases, local extinction. Therefore we captured 29 individuals from broad-snouted caiman (19 males and 10 females) in the

Angatuba area and 11 individuals (2 males, 4 females and 5 hatchlings) in the Cubatão area, respectively. The mean snout-vent length was 50.79 ± 19.75 and 30.23 ± 16.51 cm for Angatuba and Cubatão, respectively. The mean body mass was 5599 ± 7492 g and 1308 ± 1624 g for Angatuba and Cubatão, respectively. Statistical differences between the females of both study areas were found in one of the 17 parameters analyzed, whereas the Cubatão females showed higher creatinine values than females of Angatuba, and the comparison between sexes of the Angatuba area showed significant differences in alanine aminotransferase ($p = 0.003$), erythrocytes ($p = 0.034$), hemoglobin ($p = 0.049$) and mean corpuscular volume ($p = 0.027$). Moreover, minimum, mean and maximum values of hematological and biochemical parameters of blood were described for females, males and hatchlings.

Keywords: Crocodilians; Hematology; Blood biochemistry

2.1 Introdução

Confinados a prática veterinária, os métodos e técnicas que promovem a compreensão das respostas fisiológicas em relação ao meio ambiente estão tendo um lugar privilegiado nos estudos ecológicos dos animais selvagens. Análises dos parâmetros fisiológicos têm sido importantes para a obtenção de detalhes sobre a natureza da espécie em questão, principalmente porque podem ser utilizados como uma ferramenta de diagnóstico.

Dentro destes parâmetros, o sangue é um dos primeiros sistemas a serem estudados, tendo a capacidade de transportar gases (i.e., oxigênio) e nutrientes, e também de eliminar resíduos metabólicos. Um hemograma completo é composto pela avaliação de uma variedade de parâmetros que permitem obter informações sobre a saúde de um animal ou de uma população, e que ajudam na identificação de doenças, especialmente àquelas relacionadas à volemia e as infecções (GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994).

Quando comparado a outros vertebrados, há pouca informação disponível na literatura sobre a hematologia de répteis, e menor volume ainda sobre a hematologia dos crocodilianos, principalmente quanto a espécie objetivo deste estudo. Assim, dos trabalhos publicados sobre o tema, alguns se referem a populações em cativeiro, ou a umas poucas espécies de crocodilianos, como *Crocodilus porosus*, *Crocodylus palustris*, *Alligator mississippiensis*, *Caiman yacare* e *Caiman latirostris* (FOGGIN, 1987; MILLAN et al., 1997; GUILLETTE et al., 1997; STACY; WHITAKER, 2000; MOURA et al., 1999; ZAYAS et al., 2011). Isto faz a interpretação dos resultados mais desafiadora, principalmente no caso do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*), porque poucos estudos prévios têm sido realizados no estabelecimento das taxas normais dos valores hematológicos e bioquímicos do

sangue dessa espécie, e mesmo assim, consideráveis discrepâncias têm sido observadas nestes experimentos.

Desta forma, tem sido sugerido que um padrão de referência espécie-específico seja desenvolvido como forma de ferramenta diagnóstica, evitando-se assim as constantes diferenças encontradas (LOVELY; PITTMAN; LESLIE, 2007). Neste aspecto, avaliações prévias e padronizadas dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue podem oferecer respostas mais precisas para o diagnóstico das mais variadas doenças e servir como indicador de prognóstico pós-tratamento em répteis (WORK; BALAZS, 1999; JOYNER et al., 2006; KNOTKOVA et al., 2005), além de fornecer, em conjunto com outros fatores, informações detalhadas sobre gestão de planos de manejo dos animais, devido principalmente à possibilidade de epidemias levarem estas populações a um declínio, ou em casos extremos, a extinção local, demonstrando a importância do rápido reconhecimento dos agentes infecciosos em crocodilianos, tais como hemoparasitas, bactérias, fungos e vírus.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Área de estudo

Este estudo foi conduzido em duas bacias hidrográficas distintas, sendo elas a bacia do Alto Paranapanema (Figura 2), tendo como centro o município de Angatuba/SP, e a bacia da Baixada Santista, com o município de Cubatão/SP como área central, ambas no Estado de São Paulo.

A primeira bacia ocupa uma área de 2.273.000 ha e apresenta apenas 14,9% de sua superfície coberta de vegetação natural (KRONKA et al., 2005), e o restante, recoberta por áreas de silvicultura, que se encontram em crescimento no Estado de São Paulo, apresentando grande importância econômica e ambiental para as regiões em que se estabelecem (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF, 2010). Os rios Paranapanema, Apiaí-Guaçu, Taquari, Itapetininga, Verde, Capivari, Itararé e ribeirão das Almas são considerados os principais cursos d'água. O clima da região é sub-tropical (Cwa), de acordo com o sistema de Köppen, possuindo inverno seco com temperaturas inferiores a 18°C e verão quente com temperaturas superiores a 22°C. Duas áreas de captura foram selecionadas, sendo a primeira denominada Fazenda Três Lagoas, em Angatuba/SP, com área total de 3.242 ha, composta anteriormente por 541,6 ha de Floresta Estacional Semidecidual e cerca de 2.590 ha de pastagem exótica (*Brachiaria* sp), que foram

substituídos por plantações de eucalipto entre agosto de 2006 e outubro de 2007. Nesta fazenda existem cerca de 40 açudes remanescentes da criação de gado e três lagoas naturais. A segunda área, a Fazenda Arca, também está localizada no município de Angatuba/SP, com área total de 1.122,77 ha, sendo 721,9 ha de plantio de eucalipto, 66,6 ha de Área de Preservação Permanente (APP) e 293,98 ha de Reserva Legal. A área em questão é ocupada predominantemente por silvicultura de eucalipto, sendo que esta atividade, em geral, mantém reservatórios de água artificiais (e. g., açudes, lagoas e pequenas represas) a fim de garantir o abastecimento para casos de eventuais incêndios florestais (Figura 3).

Figura 2 - Bacia Hidrográfica do Alto Paranapanema
 Fonte: UHLIG, V. M. – NGeo/RAN/ICMBio

Figura 3 - Área de estudo localizada no município de Angatuba evidenciando os corpos d'água amostrados: Açude Vermelho; Lagoão; Lagoa Suja; Açude do Casemiro; Três Lagoas)
 Fonte: UHLIG, V. M. – NGeo/RAN/ICMBio

A segunda bacia hidrográfica utilizada neste experimento foi a da Baixada Santista (Figura 4), tendo como centro o município de Cubatão/SP, que possui uma área de drenagem de 2.887 km². Dessa área, aproximadamente 78,5% apresenta vegetação remanescente, sendo as fitofisionomias mais representativas a Floresta Ombrófila Densa e a Formação Arbórea/Arbustiva-Herbácea de Terrenos Marinheiros Lodosos (SISTEMA INTEGRADO DE GERENCIAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS DO ESTADO DE SÃO PAULO - SigRH/CBH-BS, 2015). O relevo se divide entre a planície costeira e a Serra do Mar, com

escarpas que ultrapassam 1.100 m e declividade superior a 30 graus (IPT, 1986). O clima é tropical úmido, tipo “Af” segundo Köppen, com temperatura média anual de 23°C e umidade relativa do ar superior a 80%. A precipitação média anual varia de 2.500 a 3.000 mm, com chuvas mais pronunciadas nos meses de novembro, dezembro e janeiro, que decaem consideravelmente nos meses de junho a agosto (DOMINGUES, 1983; BORGES et al., 2002).

Inserida na Bacia hidrográfica da Baixada Santista, a bacia de Cubatão estende-se longitudinalmente de sudoeste para nordeste e tem uma área de aproximadamente 185 km². Devido à proximidade da Serra do Mar seus rios são curtos e torrenciais e podem ser definidos em dois tipos, os que nascem torrenciais na Serra do Mar e se tornam rios de planície após as regiões de escarpa, e os rios de pequeno curso, praticamente de planície. O rio Cubatão é o mais importante da região, estando situado na vertente atlântica da Serra do Mar, circundando o estuário de Santos e desaguardo dentro do mangue através de canais do tipo déltico. O rio Perequê nasce na Serra do Mar e é um dos principais afluentes da margem esquerda do Rio Cubatão (CERUCCI; MANCUSO, 2007; FERREIRA, 2008).

Grande parte da bacia do Rio Cubatão é coberta por mata atlântica, tanto no trecho de serra como no trecho de planície. Aproximadamente 90% da área desta bacia é composta exclusivamente por florestas, sendo que nos 10% restantes, encontram-se áreas urbanas e industriais. Apesar desses valores, a Floresta Atlântica nessa região é secundária e apresenta redução de sua diversidade e simplificação de sua estrutura (LEITÃO-FILHO et al., 1993; CERUCCI; MANCUSO, 2007).

Figura 4 - Bacia Hidrográfica da Baixada Santista

Fonte: UHLIG, V. M. – NGeo/RAN/ICMBio

2.2.2 Captura e marcação

Diferentes métodos de captura foram utilizados neste experimento, sendo que os animais maiores de um metro de comprimento foram capturados durante o período noturno, com auxílio de laços de aço ou cambões, e os animais menores de forma manual. A técnica consiste basicamente na visualização dos olhos dos animais feita com o auxílio de lanternas de cabeça de alta potência e na aproximação com o barco realizada de forma lenta, conforme descrito por Hutton, Loveridge e Blake (1987) e Walsh (1987), com posterior fechamento dos laços ou da mão na região cervical (Figura 5A). Além disso, foram realizadas caminhadas pelas margens dos corpos d'água (quando de pequeno tamanho) imitando-se o som dos filhotes, fazendo com que os animais adultos se aproximassem, facilitando a captura por laços de aço. Também foram utilizadas armadilhas tipo funil (*Funnel Traps*) para a captura dos animais (Figura 5B), sendo que tais armadilhas possuem a vantagem de poderem ser utilizadas também durante o dia, aparentemente sem estressar os animais, demonstrando grande eficácia na captura de animais jovens, porém na área de Cubatão/SP, este método foi

ineficaz devido a ação da maré. Imediatamente após a colheita de material da cavidade oral, os animais tiveram bocas e olhos vendados por fita adesiva.

Dois métodos de identificação foram utilizados nos animais, sendo o primeiro a marcação externa, realizada através de cortes nas cristas caudais simples e duplas (BOLTON, 1994), com uma combinação numérica previamente estabelecida, e a marcação interna, com a colocação de *transponders* (microchips) junto ao tecido subcutâneo (DIXON; YANOSKY, 1999), na região cervical, tendo como padronização o lado direito (Figura 5C).

Figura 5 - Métodos de captura e marcação, onde A é o método de captura com laço de aço e utilização de barco; B é o método de captura com utilização de armadilha tipo funil (*Funnel Trap*); e C é o método de marcação através de aplicação subcutânea de *transponders* (microchips)

Fonte: o autor

2.2.3 Biometria e sexagem

Os indivíduos capturados tiveram os dados biométricos mensurados com o auxílio de uma fita métrica (tipo trena), de um paquímetro com precisão de 1 mm e de balanças de campo Pesola®, com precisão de 1,0g (Figura 6A), pós colheita de material biológico, evitando assim elevação no nível de estresse e possível contaminação no momento da manipulação. As medidas tomadas foram comprimento total do corpo (TL), comprimento rostro-cloacal (SVL), comprimento total da cabeça, comprimento total do crânio, distância entre os olhos e comprimento total do focinho, além da massa corpórea. Algumas dessas medidas foram tomadas para serem utilizadas em outros experimentos, e não foram incluídas em nossas análises. A determinação do sexo foi feita através do exame visual dos órgãos sexuais com o auxílio de um espelho de tamanho apropriado ou manualmente (Figura 6B), dependendo do porte do animal (CHABRECK, 1963; ALLSTEAD; LANG, 1995).

Figura 6 - Biometria e sexagem, onde A é a realização da tomada de peso (Massa Corpórea = MC); e B é o procedimento de sexagem através da exposição do pênis com auxílio de espéculo nasal de tamanho apropriado.

Fonte: o autor

2.2.4 Colheita de material

Após a captura e imobilização dos animais, amostras de sangue foram coletadas junto ao seio occipital venoso (Figura 7) com volumes que variaram entre 1 a 5 mL, dependendo do tamanho corpóreo de cada indivíduo, sendo, *a posteriori*, estes volumes divididos em frascos com e sem anticoagulante. Neste aspecto, heparina foi o anticoagulante de escolha, pois o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) tem sido reportado como causador de hemólise (SYKES; KLAPHAKE, 2015). Embora este procedimento possa parecer bastante simples, cuidados na colheita devem ser tomados para se evitar a contaminação das amostras por linfa ou fluido extracelular (STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011), pois a mesma pode determinar valores não condizentes com a realidade.

As amostras foram mantidas sobre refrigeração em temperaturas que variaram de 4 a 8°C e enviadas no prazo máximo de 24 horas pós coleta para as análises em laboratório.

Figura 7 - Colheita de sangue no seio occipital venoso
Fonte: o autor

2.2.5 Processamento do material

2.2.5.1 Perfil Hematológico

2.2.5.1.1 Metodologia analítica

a) Cálculo do Volume Globular (VG) ou Hematócrito (Ht): essa determinação foi realizada através do preenchimento de dois terços da extensão de um tubo capilar com sangue total. Após esse procedimento, uma das extremidades foi vedada com massa plástica a base de vinil para evitar extravasamento do conteúdo. Em seguida o tubo capilar foi alojado em centrífuga de microhematócrito para ser centrifugado a $13552 \times G$ por 5 minutos, com posterior leitura do resultado com auxílio de um cartão de hematócrito, sendo o resultado expresso em porcentagem (%).

b) Determinação dos valores de Hemoglobina (Hb): para o cálculo de valores de hemoglobina foram utilizados 10 mL de solução isotônica para contadores de células e 20 μL de sangue. Nesta solução foram adicionadas 2 gotas de cianeto de potássio 4 mg/mL (Celmlise II[®]), sendo homogeneizada e centrifugada para provocar a lise dos eritrócitos (FERRONATO, 2008). Após repouso de 10 minutos, a solução foi novamente

homogeneizada por 2 minutos e a leitura foi realizada no espectrofotômetro Celm CC 510®, sendo o resultado expresso em g/dL.

c) Determinação dos valores de Proteína Plasmática Total (PP): Para a dosagem da PP foram utilizados os mesmos tubos capilares usados na determinação dos valores de hematócrito, realizando a quebra dos mesmos para a separação de eritrócitos e do plasma. Após esse procedimento, com auxílio de um refratômetro, os resultados foram expressos em g/dL.

d) Contagem Total de Hemácias (Eritrócitos): Para essa contagem foram utilizados 1mL de diluente Natt e Herrick (NATT; HERRICK, 1952) e 10μL de sangue total com heparina, sendo essa solução homogeneizada. Foi realizada então o preenchimento de um dos lados da câmara de Neubauer para a realização da contagem com auxílio de um microscópio em aumento de 400 x. Para tanto foram utilizados 5 quadrantes pequenos localizados dentro do quadrante central (Figura 8). O número encontrado foi pluralizado pelo fator de multiplicação (FM), sendo os valores expressos em nº hemácias/μL. Esse fator é obtido através da form. (1):

$$FM = 5 \times 100 \times 10 = 5000 \quad \text{form. (1)}$$

Onde, 5 se refere ao cálculo da área utilizada da câmara em mm³ (5 de 25 quadrados); 100 se refere à diluição utilizada e 10 a constante da câmara.

Figura 8 - Em vermelho os quadrantes utilizados para a contagem de eritrócitos na câmara de Neubauer
Fonte: o autor

Como os répteis possuem hemácias nucleadas, a contagem do número de eritrócitos deve ser feita de forma manual (JENKINS-PEREZ, 2008). Logicamente este procedimento pode ser passível de erro humano, e métodos que garantam melhor acurácia devem ser aplicados. Para tanto, as leituras de cada amostra foram realizadas por três diferentes técnicos de laboratório, na tentativa de se evitar erros de contagem ou de interpretação dos resultados.

e) Contagem Total de Leucócitos: A leucometria foi realizada utilizando a mesma solução homogeneizada contendo 1mL de diluente e 10 μ L de sangue total com heparina. Novamente um dos lados da câmara de Neubauer foi preenchido para a realização da contagem com auxílio de um microscópio em aumento de 400 vezes. Para tanto foram utilizados os quadrantes das 4 extremidades da câmara (Figura 9). Novamente o fator de multiplicação (FM) foi aplicado para a contagem total de leucócitos e os valores encontrados expressos em nº de leucócitos/ μ L. Desta feita, foi utilizada a form. (2):

$$FM = 1 \times 100 \times 10 = 1000 \quad \text{form (2)}$$

Onde, 1 se refere ao cálculo da área utilizada da câmara em mm³; 100 se refere à diluição utilizada e 10 a constante da câmara.

Figura 9 - Quadrantes utilizados para a contagem de leucócitos na câmara de Neubauer
Fonte: o autor

Salienta-se que, como realizado na contagem de eritrócitos, três diferentes técnicos foram utilizados na realização de leitura para cada amostra.

e) Contagem Diferencial de Leucócitos: Extensões sanguíneas em lâminas de vidro foram realizadas logo após as colheitas de sangue. Para a fixação foram deixadas secar ao ar,

sendo coradas logo após com May-Grunwald-Giemsa modificado, assim como sugerido por Rosenfeld (1947). A técnica consiste em se colocar 1mL do corante sobre a lâmina seca, deixando o mesmo agir por 3 minutos. Passado este tempo, 2 mL de água MilliQ devem ser adicionados sobre a lâmina. Decorridos 13 minutos, a lâmina é então lavada com água deionizada e colocada para secar em ângulo de 45° na tentativa de se evitar manchas e escorridos. Lentes de imersão em aumento de 1000 vezes devem ser utilizadas na diferenciação dos leucócitos (Figura 10).

Figura 10 - A) Hemácias; B) Seta vermelha: Linfócito; C) Seta vermelha: Hemácias; Seta verde: Basófilo; D) Seta verde: Linfócitos; Seta Vermelha: Heterófilos; E) Seta verde: Eosinófilo; F) Seta amarela: Monócito. Coloração de Rosenfeld

Fonte: Fabíola Prioste - Doutoranda em Ciências pelo Programa de Patologia Experimental e Comparada FMVZ-USP

Neste aspecto, como importantes mediadores do sistema imune, apresentando a função de identificarem e eliminarem patógenos no organismo (FINGER; ISBERG, 2012), foram classificados em:

Heterófilos

Com função equivalente aos neutrófilos em mamíferos, heterófilos são células fagocíticas, associadas a processos inflamatórios, principalmente nas doenças infecciosas envolvendo tecidos danificados (SILVESTRE, 2013). Em algumas espécies de répteis, heterófilos podem representar mais de quarenta por cento da contagem diferencial de leucócitos (FRYE, 1991; WRIGHT, SKEBA, 1992; ALLEMAN et al., 1992; RASKIN, 2000), e em crocodilianos, essas células podem compor mais de cinquenta por cento do valor

absoluto dos leucócitos contados (MATEO et al., 1984). Esse número ainda pode ser maior nos casos em que os animais sejam expostos a situações de estresse, devido à elevação dos níveis dos glucocorticóides (DAVIS et al., 2008).

Linfócitos

Os crocodilianos não possuem linfonodos, apresentando respostas imuno-mediadas pelos linfócitos (ZIMMERMAN et al., 2010), sendo similares em morfologia quando comparados as aves e aos mamíferos, tendo como funções a produção de imunoglobulinas e de respostas imunes celularmente mediadas (SYPEK; BORYSENKO, 1988). Arikan e Çiçek (2014) citam que os linfócitos são as células predominantes entre os leucócitos nos répteis e nos anfíbios, tendendo a ser mais elevado em fêmeas do que em machos (SYPEK; BORYSENKO, 1988; MARTÍNEZ-SILVESTRE et al., 2011), diferindo de resultados obtidos em outros experimentos envolvendo crocodilianos, onde heterófilos foram as células mais comumente observadas (MATEO et al., 1984; SCHOEB et al., 2002; CASAL; ORÓS, 2007).

Monócitos

Estas células podem compor valores que variam de 0 a dez por cento do número absoluto dos leucócitos em répteis. São responsáveis por atividade fagocítica, podendo ainda indicar respostas a antígenos sistêmicos. Em muitos répteis, monócitos apresentam grânulos azurófilos. Estas células foram relatadas como azurófilos ou monócitos azurófilos, e consideradas como uma variação de monócitos normais, e não como uma célula diferente (ROSSKOPFF, 2000; HARR et al., 2001; CAMPBELL, 2006). Neste sentido, segundo Nardini, Leopardi e Bielli (2013), alguns investigadores destacam somente uma pequena vantagem clínica em separar monócitos e azurófilos na contagem diferencial, e outros, recomendam que estas células sejam contadas separadamente em serpentes, mas que a contagem seja agrupada para outras espécies de répteis (STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011). Desta maneira, para este trabalho, todas estas células foram agrupadas como monócitos.

Eosinófilos

Em répties saudáveis, os valores de eosinófilos podem variar de sete a vinte por cento do número de leucócitos totais (STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011). A função dos eosinófilos em répteis ainda é pouco estudada, mas o aumento de eosinófilos circulantes (eosinofilia) tem sido associado com infecções parasitárias e com alguns tipos de estimulações antigênicas.

Basófilos

Basófilos encontrados em répteis se assemelham aos das aves, quer em aparência ou função (CLAVER; QUAGLIA, 2009). O número de basófilos varia em relação às espécies, mas usualmente é baixo (CAMPBELL, 2004). Segundo Finger e Isberg (2012), os valores normais dessas células nos crocodilianos devem estar próximos de doze por cento do número total de leucócitos circulantes. Estas células inatas são comumente implicadas junto a reações alérgicas, liberando mediadores pró-inflamatórios, como a histamina (STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011; FINGER; ISBERG, 2012).

2.2.5.2 Perfil Bioquímico

Depois dos animais capturados e imobilizados foram coletadas amostras sanguíneas, em volume de 1 a 5 ml, dependendo do tamanho corpóreo de cada indivíduo, no seio occipital venoso (Figura 6). Tais amostras foram acondicionadas em tubos sem anticoagulante para facilitar a separação do soro. As amostras foram então mantidas sobre refrigeração e enviadas no prazo máximo de 24 horas pós coleta para as análises de ácido úrico, uréia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Para a obtenção dos resultados utilizou-se analisadores bioquímicos de sangue automatizados.

2.2.6 Análise dos dados

A análise de variância (ANOVA *one-way*) ou o teste de Mann-Whitney foram utilizados para verificar possíveis diferenças dos parâmetros hematológicos e bioquímicos entre as fêmeas de ambas as áreas de estudo e entre os sexos em Angatuba. Além disso, regressões lineares foram utilizadas para avaliar a relação entre as variáveis dependentes (valores hematológicos e bioquímicos do sangue) e a massa corpórea das fêmeas em cada área de estudo.

2.3 Resultados

No total foram capturados 29 indivíduos de jacaré-de-papo-amarelo (19 machos e 10 fêmeas) em Angatuba e 11 indivíduos (2 machos, 4 fêmeas e 5 filhotes) em Cubatão. A média do comprimento rostro-cloacal foi $50,79 \pm 19,75$ cm e $30,23 \pm 16,51$ cm para Angatuba e

Cubatão, respectivamente. A média da massa corpórea foi 5599 ± 7492 g e 1308 ± 1624 g para Angatuba e Cubatão, respectivamente.

Os valores descritivos e estatísticos dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do jacaré-de-papo-amarelo na comparação das fêmeas entre as áreas de estudo são apresentados na Tabela 1 e Figura 11. Diferenças estatísticas entre as áreas de estudo foram encontradas em 1 dos 19 parâmetros analisados (Tabela 1). As fêmeas de Cubatão apresentaram maiores valores de creatinina do que as fêmeas de Angatuba.

Tabela 1 - Dados descritivos dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) na comparação das fêmeas entre as áreas de estudo

	Angatuba (N=10)	Cubatão (N=4)	Valor de p
Ácido úrico (mg/dL)	$2,84 \pm 1,20$ (1,20 - 5,40)	$2,90 \pm 0,76$ (1,80 - 3,50)	p = 0,929
Creatinina (mg/dL)	$0,29 \pm 0,07$ (0,20 - 0,40)	$0,45 \pm 0,10$ (0,30 - 0,50)	p = 0,033
Alanina aminotransferase (U/l)	$24,00 \pm 10,59$ (8,00 - 47,00)	$21,75 \pm 11,15$ (8,00 - 35,00)	p = 0,729
Aspartato aminotransferase (U/l)	$98,00 \pm 50,00$ (47,00 - 209,00)	$86,00 \pm 25,50$ (62,00 - 122,00)	p = 0,832
Uréia (mg/dL)	$6,80 \pm 2,15$ (5,00 - 12,10)	$7,50 \pm 1,97$ (5,80 - 9,50)	p = 0,436
Hemácias (/μL)	565000 ± 140791 (345000 - 840000)	592500 ± 147676 (455000 - 730000)	p = 0,750
Hematócrito (%)	$25,90 \pm 4,33$ (18,00 - 33,00)	$21,00 \pm 5,47$ (14,00 - 27,00)	p = 0,100
Hemoglobina (g/dL)	$11,53 \pm 3,34$ (6,60 - 19,00)	$8,52 \pm 2,70$ (4,80 - 10,70)	p = 0,139
VCM* (fl)	$470,90 \pm 80,60$ (357,00 - 619,00)	$383,30 \pm 169,20$ (191,00 - 593,00)	p = 0,197
CHCM** (%)	$45,10 \pm 14,65$ (37,00 - 86,00)	$41,00 \pm 10,80$ (30,00 - 53,00)	p = 0,832
Proteína plasmática (g/dL)	$3,86 \pm 1,11$ (2,60 - 5,60)	$4,15 \pm 0,75$ (3,40 - 4,80)	p = 0,644
Leucócitos (/μL)	$9600,00 \pm 5168,00$ (5000,00 - 19000,00)	$9613,00 \pm 3839,00$ (5650,00 - 13100,00)	p = 0,997
Heterófilos (/μL)	$4656,00 \pm 2860,00$ (1550,00 - 11400,00)	$2671,00 \pm 1144,00$ (1190,00 - 3937,00)	p = 0,137
Linfócitos (/μL)	$3472,00 \pm 1968,00$ (850,00 - 6660,00)	$5331,00 \pm 2608,00$ (2543,00 - 8384,00)	p = 0,169
Monócitos (/μL)	$913,00 \pm 763,80$ (150,00 - 2160,00)	$650,00 \pm 262,50$ (420,00 - 1016,00)	p = 0,522
Eosinófilos (/μL)	$468,00 \pm 685,00$ (50,00 - 2160,00)	$944,00 \pm 609,00$ (57,00 - 1400,00)	p = 0,358
Basófilos (/μL)	$91,00 \pm 127,00$ (0,00 - 380,00)	$17,50 \pm 35,00$ (0,00 - 70,00)	p = 0,396

*VCM: volume corpuscular médio

** CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média

Fonte: o autor

Figura 11 - Variação entre valores dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue na comparação entre fêmeas nas áreas de Angatuba/SP (FA) e Cubatão/SP (FC)

Fonte: o autor

A comparação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos entre os sexos do jacaré-de-papo-amarelo de Angatuba evidenciou a ausência de diferenças estatísticas significativas para a maioria das análises. No entanto, foram detectadas diferenças significativas na comparação entre sexos para os valores de ALT, hemácias, hemoglobina e volume corpuscular médio (Tabela 2 e Figura 12).

Tabela 2 - Dados descritivos dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) na comparação das fêmeas entre as áreas de estudo (continua)

	Angatuba (N=10)	Cubatão (N=4)	Valor de p
Ácido úrico (mg/dL)	2,84 ± 1,20 (1,20 - 5,40)	2,90 ± 0,76 (1,80 - 3,50)	p = 0,929
Creatinina (mg/dL)	0,29 ± 0,07 (0,20 - 0,40)	0,45 ± 0,10 (0,30 - 0,50)	p = 0,033
Alanina aminotransferase (U/l)	24,00 ± 10,59 (8,00 - 47,00)	21,75 ± 11,15 (8,00 - 35,00)	p = 0,729
Aspartato aminotransferase (U/l)	98,00 ± 50,00 (47,00 - 209,00)	86,00 ± 25,50 (62,00 - 122,00)	p = 0,832
Uréia (mg/dL)	6,80 ± 2,15 (5,00 - 12,10)	7,50 ± 1,97 (5,80 - 9,50)	p = 0,436
Hemácias (μL)	565000 ± 140791 (345000 - 840000)	592500 ± 147676 (455000 - 730000)	p = 0,750

Tabela 2 - Dados descritivos dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) na comparação das fêmeas entre as áreas de estudo (conclusão)

	Angatuba (N=10)	Cubatão (N=4)	Valor de p
Hematócrito (%)	25,90 ± 4,33 (18,00 - 33,00)	21,00 ± 5,47 (14,00 - 27,00)	p = 0,100
Hemoglobina (g/dL)	11,53 ± 3,34 (6,60 - 19,00)	8,52 ± 2,70 (4,80 - 10,70)	p = 0,139
VCM* (fl)	470,90 ± 80,60 (357,00 - 619,00)	383,30 ± 169,20 (191,00 - 593,00)	p = 0,197
CHCM** (%)	45,10 ± 14,65 (37,00 - 86,00)	41,00 ± 10,80 (30,00 - 53,00)	p = 0,832
Proteína plasmática (g/dL)	3,86 ± 1,11 (2,60 - 5,60)	4,15 ± 0,75 (3,40 - 4,80)	p = 0,644
Leucócitos (/μL)	9600,00 ± 5168,00 (5000,00 - 19000,00)	9613,00 ± 3839,00 (5650,00 - 13100,00)	p = 0,997
Heterófilos (/μL)	4656,00 ± 2860,00 (1550,00 - 11400,00)	2671,00 ± 1144,00 (1190,00 - 3937,00)	p = 0,137
Linfócitos (/μL)	3472,00 ± 1968,00 (850,00 - 6660,00)	5331,00 ± 2608,00 (2543,00 - 8384,00)	p = 0,169
Monócitos (/μL)	913,00 ± 763,80 (150,00 - 2160,00)	650,00 ± 262,50 (420,00 - 1016,00)	p = 0,522
Eosinófilos (/μL)	468,00 ± 685,00 (50,00 - 2160,00)	944,00 ± 609,00 (57,00 - 1400,00)	p = 0,358
Basófilos (/μL)	91,00 ± 127,00 (0,00 - 380,00)	17,50 ± 35,00 (0,00 - 70,00)	p = 0,396

*VCM: volume corpuscular médio

** CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média

Fonte: o autor

Figura 12 - Variação entre valores dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue a comparação entre sexos na área de Angatuba/SP, onde: FA = Fêmeas e MA = Machos

Fonte: o autor

Não houve relação entre os parâmetros hematológicos/bioquímicos do sangue e a massa corpórea (MC) para a totalidade dos machos da área de Angatuba/SP e para as fêmeas de ambas as áreas, exceto para a creatinina (correlação positiva) e linfócitos (correlação negativa) em Angatuba/SP e ácido úrico em Cubatão/SP (forte correlação negativa) (Tabela 3) (Figuras 13, 14 e 15).

Tabela 3 - Relações entre os parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue e a massa corpórea do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em Angatuba e Cubatão (continua)

#	Condição	Y	X	a	b	Valor de P	r ²	N
1	FA	AU	MC	2,59	0,00004	0,564	0,04	10
2	FA	CR	MC	0,24	0,000009	0,034	0,45	10
3	FA	ALT	MC	17,53	0,00114	0,056	0,38	10
4	FA	AST	MC	98,58	-0,00010	0,974	0,00	10
5	FA	UR	MC	6,93	-0,00002	0,862	0,04	10
6	FA	HEM	MC	620891	-9,89	0,249	0,16	10
7	FA	HT	MC	28,29	-0,00042	0,092	0,31	10
8	FA	HB	MC	13,31	-0,00031	0,109	0,28	10
9	FA	VCM	MC	470,20	0,00012	0,981	0,00	10
10	FA	CHCM	MC	48,82	-0,00065	0,472	0,06	10
11	FA	PP	MC	3,66	0,00003	0,621	0,03	10
12	FA	LEUC	MC	11999	-0,4248	0,170	0,22	10
13	FA	HET	MC	5584	-0,1543	0,354	0,10	10
14	FA	LIN	MC	4932	-0,2585	0,012	0,56	10
15	FA	MON	MC	710,1	0,03593	0,452	0,07	10
16	FA	EOS	MC	672,2	-0,03617	0,396	0,09	10
17	FA	BAS	MC	101,0	-0,00177	0,827	0,00	10
18	FC	AU	MC	4,12	-0,00043	0,004	0,99	4
19	FC	CR	MC	0,38	0,00002	0,597	0,16	4
20	FC	ALT	MC	38,61	-0,00602	0,061	0,88	4
21	FC	AST	MC	54,22	0,01135	0,225	0,60	4
22	FC	UR	MC	5,70	0,00064	0,437	0,31	4
23	FC	HEM	MC	717905	-44,79	0,473	0,27	4
24	FC	HT	MC	13,11	0,00281	0,105	0,80	4
25	FC	HB	MC	7,87	0,00023	0,854	0,02	4
26	FC	VCM	MC	152,6	0,08201	0,157	0,71	4
27	FC	CHCM	MC	50,19	-0,00328	0,472	0,27	4
28	FC	PP	MC	3,69	0,00016	0,627	0,13	4
29	FC	LEUC	MC	11007	-0,498	0,774	0,05	4
30	FC	HET	MC	3847	-0,4201	0,362	0,40	4
31	FC	LIN	MC	6183	-0,304	0,797	0,04	4

Tabela 3 - Relações entre os parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue e a massa corpórea do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em Angatuba e Cubatão (conclusão)

32	FC	MON	MC	764,7	-0,0410	0,729	0,07	4
33	FC	EOS	MC	248,8	0,2482	0,291	0,50	4
34	FC	BAS	MC	-35,47	0,01892	0,060	0,88	4
35	MA	AU	MC	2,82	0,000015	0,510	0,02	19
36	MA	CR	MC	0,28	0,000001	0,490	0,02	19
37	MA	ALT	MC	34,09	0,000098	0,617	0,01	19
38	MA	AST	MC	139,1	-0,001144	0,460	0,03	19
39	MA	UR	MC	5,71	-0,000063	0,258	0,07	19
40	MA	HEM	MC	483548	-3,28	0,128	0,13	19
41	MA	HT	MC	25,29	0,000005	0,960	0,00	19
42	MA	HB	MC	9,56	0,000006	0,908	0,01	19
43	MA	VCM	MC	528,9	0,004381	0,100	0,15	19
44	MA	CHCM	MC	37,92	0,000005	0,974	0,00	19
45	MA	PP	MC	3,93	0,000034	0,297	0,06	19
46	MA	LEUC	MC	12356	-0,1725	0,354	0,05	19
47	MA	HET	MC	6940	-0,0623	0,567	0,02	19
48	MA	LIN	MC	4277	-0,1156	0,318	0,05	19
49	MA	MON	MC	640,3	-0,00166	0,919	0,01	19
50	MA	EOS	MC	411,5	0,00788	0,597	0,01	19
51	MA	BAS	MC	76,51	-0,000233	0,962	0,00	19

Legenda: $Y = a + bX$

Condição: FA – fêmeas Angatuba; FC – fêmeas Cubatão; MA – machos Angatuba

Y: AU – ácido úrico; CR – creatinina; ALT – alanina aminotransferase; AST – aspartato aminotransferase; UR – uréia; HEM – hemácias; HT – hematócrito; HB – hemoglobina; VCM – volume corpuscular médio; CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média; PP – proteína plasmática; LEUC – leucócitos; HET – heterofílos; LIN – linfócitos; MON – monócitos; EOS – eosinófilos; BAS – basófilos.

X: MC – massa corpórea

Fonte: o autor

Figura 13 - Relação entre creatinina e massa corpórea em fêmeas na área de Angatuba/SP
 Fonte: o autor

Figura 14 - Relação entre número absoluto de linfócitos e massa corpórea em fêmeas da área de Angatuba/SP
 Fonte: o autor

Figura 15 - Relação entre ácido úrico e massa corpórea em fêmeas da área de Cubatão/SP

Fonte: o autor

Em relação aos filhotes, somente os dados de média e desvio padrão, além de valores mínimos e máximos dos parâmetros do sangue e dos valores das análises bioquímicas do sangue foram realizados (Tabela 4). Tal procedimento se deveu frente a impossibilidade de inserção desses dados na comparação entre áreas, visto que essa categoria somente foi capturada na área de Cubatão/SP.

Tabela 4 - Dados descritivos dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue dos filhotes de jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) da área Cubatão (continua)

	Filhotes
Ácido úrico (mg/dL)	4,46 ± 0,76 (3,50 - 5,50)
Creatinina (mg/dL)	0,42 ± 0,17 (0,30 - 0,70)
Alanina aminotransferase (UI/L)	53,80 ± 10,35 (38,00 - 66,00)
Aspartato aminotransferase (UI/L)	188,00 ± 34,6 (155,00 - 240,00)
Uréia (mg/dL)	9,44 ± 5,36 (6,60 - 19,00)
Hemácias (/μL)	376000 ± 56833 (310000 - 430000)
Hematócrito (%)	19,40 ± 0,89 (18,00 - 20,00)
Hemoglobina (g/dL)	10,26 ± 3,44 (8,40 - 16,40)
VCM* (fl)	528,20 ± 101,30 (429,00 - 645,00)

Tabela 4 - Dados descritivos dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue dos filhotes de jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) da área Cubatão (conclusão)

	Filhotes
CHCM** (%)	52,80 ± 16,51 (42,00 - 82,00)
Proteína plasmática (g/dL)	3,30 ± 0,15 (3,10 - 3,50)
Leucócitos (/μL)	18200 ± 6419 (12000 - 28000)
Heterófilos (/μL)	9854 ± 3858 (5520 - 15400)
Linfócitos (/μL)	5114 ± 2712 (2730 - 9800)
Monócitos (/μL)	2412 ± 2263 (1120 - 6400)
Eosinófilos (/μL)	474 ± 311 (0 - 840)
Basófilos (/μL)	346,00 ± 322 (0 - 840)

Fonte: o autor

2.4 Discussão

Interpretações de resultados envolvendo análises hematológicas e bioquímicas do sangue em répteis têm sido desafiadoras (CAMPBELL, 1998), principalmente em relação aos crocodilianos, simplesmente porque um pequeno número de experimentos foi realizado até o momento, ou porque os valores encontrados diferem em relação às espécies estudadas. Além disso, fatores intrínsecos e extrínsecos podem afetar os resultados obtidos no hemograma, principalmente no que se diz respeito à morfologia e à concentração celular (STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011), e também nos parâmetros bioquímicos do sangue nos répteis. Embora estes fatores sejam importantes, controlá-los em experimentos envolvendo animais de vida livre torna-se uma tarefa quase que impossível de ser realizada, a não ser que os mesmos sejam levados a laboratórios, ou sejam alocados em ambientes controlados, mas este nunca foi o objetivo deste estudo. Todavia, qualquer resultado obtido por experimentos envolvendo parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue sempre deve ser considerado como ferramenta diagnóstica do estado sanitário de um animal ou mesmo de uma população (FUENTES; SEIJAS; ROSSINI, 2011).

Em função disto, buscou-se descrever um padrão espécie-específico para o jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em duas regiões antropizadas no Estado de São Paulo, visto que estudos relacionados com os parâmetros fisiológicos e valores bioquímicos do sangue destes animais, em vida livre, são praticamente desconhecidos. Assim, seguindo o proposto por Lovely, Pittman e Leslie (2007), estabeleceu-se intervalos de referência para a

espécie, com a função de facilitar a interpretação dos resultados destes componentes, fazendo com que a patologia clínica se torne uma ferramenta viável para o diagnóstico de doenças, gerando informações essenciais para que a espécie possa ser utilizada como um indicador ecológico.

Para as análises estatísticas buscou-se aplicar a premissa da similaridade, primeiramente agrupando as fêmeas de ambas as áreas de estudo e, depois, agrupando machos e fêmeas da área de Angatuba/SP. Tal procedimento se fez necessário porque a área de Cubatão/SP apresentava somente dois animais do sexo masculino, o que poderia afetar os resultados das análises deste experimento. A partir disso, a análise de variância (ANOVA *one-way*) ou o teste de Mann-Whitney foram utilizados para verificar possíveis diferenças estatísticas significativas em relação aos parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue. Além disso, regressões lineares foram utilizadas para avaliar as correlações entre as variáveis dependentes (valores hematológicos e bioquímicos do sangue) e a massa corpórea das fêmeas em cada área de estudo.

Na comparação entre fêmeas das duas áreas de estudo, não foram observadas diferenças estatísticas significativas em relação aos componentes do hemograma, um resultado esperado, visto que os mesmos apresentam uma tendência a serem normalmente distribuídos entre espécies, dentro de uma mesma classe, embora uma variação possa ocorrer em répteis e em aves menores (HAWKEY et al., 1991), e somente creatinina apresentou diferença estatística significativa em relação aos componentes bioquímicos sanguíneos analisados, tendo os animais da área de Cubatão/SP apresentado valor médio maior que os animais de Angatuba/SP.

Embora esse valor de creatinina esteja dentro de parâmetros sugeridos anteriormente para os répteis ($< 1\text{mg/dL}$) (BOLTEN; JACOBSON; BJORN DAL, 1992; WALLACH; BOEVER, 1983; CAMPBELL, 2006; ROUSSELET et al., 2013), essa diferença pode ser explicada pelo uso de uma área estuarina em Cubatão/SP, pois não há dúvida que espécies de crocodilianos de água doce tem uma limitada capacidade de utilizar esses habitats, tendo que retornarem para a água fresca periodicamente para ingerirem (MAZZOTTI; DUNSON, 1989), provocando um maior gasto de energia estocada frente a necessidade de locomoção. Uma pequena parte dessa energia estocada se encontra sob a forma de fosfocreatina, porém ela é rapidamente esgotada durante os primeiros segundos de atividade, deixando de ser uma fonte de energia (SEYMOUR, 2013), sendo seu metabólito final a creatinina. Desta maneira, quanto maior o gasto da fosfocreatina estocada, maior o índice de creatinina circulante no organismo.

Ainda se tratando de creatinina, quando da análise da regressão linear, esta variável dependente apresentou uma fraca correlação positiva para massa corpórea (MC), com um valor de r^2 inferior a cinquenta por cento dos acontecimentos. Desta maneira, outros fatores como alimentação, movimentação, temperatura, desidratação, possam também estar afetando os níveis de creatinina no sangue destes animais.

Na comparação entre sexos para a área de Angatuba/SP, diferenças estatísticas significativas foram encontradas para ALT, hemácias, Hb e VCM.

Em relação a ALT, em répteis, uma lesão hepática aguda provoca seu aumento junto às atividades séricas, no entanto, estes valores aumentados podem estar mais relacionados a um dano hepatocelular do que a uma mudança na própria função hepática desses animais (CAMPBELL, 2004). Além disso, variações nas taxas de ALT e AST podem estar assinalando alterações em diversos órgãos, como fígado e músculos (BARBOZA et al., 2008). Em adição, segundo Knotek e colaboradores (2002), uma doença renal aguda também pode causar a elevação dos níveis de várias enzimas, incluindo ALT, AST, gama-glutamyltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA) e lactato desidrogenase (LDH). Porém, para este experimento, ambos os valores médios identificados de ALT em relação ao sexo se encontram em faixas estabelecidas para algumas espécies de crocodilianos, tais como o jacaré americano (*Alligator mississippiensis*) = 46,05 UI/L (BARNETT et al., 1998), o crocodilo de água salgada (*Crocodylus porosus*) = 11 – 51 UI/L (MILLAN et al., 1997), o crocodilo do pântano (*Crocodylus palustris*) = 28 – 60 (STACY; WHITAKER, 2000), e o jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) = 55 – 83,90 UI/L (ZAYAS et al., 2011) e 43 – 81 UI/L (SANTOS, 1999), possivelmente indicando que os valores estabelecidos neste experimento estejam dentro dos padrões fisiológicos para a espécie.

Em relação às diferenças estatísticas observadas para hemácias, VCM e hemoglobina quanto a variável sexo, salienta-se que alguns fatores podem inferir diferenciações sobre estes parâmetros, sendo o primeiro deles a maturação celular. A vida média dos eritrócitos em répteis é muito mais ampla quando comparada a outros vertebrados, situando-se em uma faixa que varia de 600 a 880 dias (ALTLAND; BRACE, 1962; CAMPBELL, 1996), sendo que o sexo, a idade, a nutrição, a dinâmica populacional e, logicamente, a temperatura ambiental podem provocar alterações nos valores do hemograma nestes animais (STACY; WHITAKER, 2000). Assim, novos eritrócitos produzidos na medula óssea e em sítios extra medulares (i.e., fígado e baço), quando comparados com eritrócitos maduros existentes na corrente sanguínea dos répteis, apresentam menor tamanho, além de um formato mais arredondado (SYKES; KLAPHAKE, 2008). Isso pode ser explicado por uma relação inversa entre o número e o

tamanho dos eritrócitos frente ao valor do VCM, como citado por Stacy, Alleman e Sayler (2011), ou seja, quanto menor o número e maior o tamanho dos eritrócitos, maior será o valor do VCM. Essa relação pode explicar, os resultados encontrados neste experimento, onde machos apresentaram valores menores no número de hemácias, porém, com um valor superior para o VCM. Resultado semelhante foi apresentado por Stacy e Whitaker (2000), com valores mínimos e máximos encontrados em juvenis de *Crocodylus palustris* variando entre 318-520 para machos e 239-439 para fêmeas.

Essa razão número/tamanho dos eritrócitos também pode ser uma das explicações para a diferença estatística encontrada em relação a hemoglobina, visto que o conteúdo da mesma aumenta em proporção direta em relação ao tamanho das hemácias, sendo que vertebrados com eritrócitos de menor tamanho exigem uma maior concentração no sangue a fim de atender a demanda padrão de oxigênio (O_2) nos tecidos (HAWKEY et al., 1991). Porém, outros fatores também podem participar deste quadro, tais como os longos períodos de submersão e a alimentação.

Assim, uma vez que esta proteína apresenta, dentre outras, a função de transportar O_2 para os tecidos, esta atividade tem que ser regulada por fatores que incluem uma afinidade intrínseca frente ao oxigênio, sensibilidade aos estímulos que modulam a afinidade Hb- O_2 , níveis dos estímulos recebidos pelas células vermelhas e tensões de O_2 recebidas para o carregamento e descarregamento do oxigênio nas superfícies respiratórias e tecidos respectivamente (WEBER et al., 2013). Segundo Jensen et al. (1998), esse modelo é único quando comparado aos outros vertebrados por apresentar uma oxigenação ligada a íons de bicarbonato.

Esse processo auxilia os crocodilianos a usufruírem de longos períodos de apnéia, favorecendo sua capacidade de caça e de fuga, gerando um efeito alostérico único, permitindo que a Hb reduza drasticamente sua afinidade ao O_2 através de uma ligação com bicarbonato, o produto final da respiração, resultante da hidratação do gás carbônico (BRUNORI et al., 1995). Esse mecanismo faz com que ocorra a liberação de uma grande fração do O_2 anteriormente ligado à Hb para os tecidos (MARENGO-ROWE, 2006). Segundo Bauer et al. (1981), é surpreendente que um mecanismo tão sensível pareça ter evoluído exclusivamente nos crocodilianos.

Além disso, quanto ao fator alimentação, nenhum outro animal na natureza está sujeito às enormes mudanças nos níveis de pH do sangue e bicarbonato no plasma (DESSAUER, 1970; WEBER; WHITE, 1986). Esse processo ocorre por efeito pós-prandial, através do aumento da quantidade de ácido clorídrico no lúmen do estômago (WEBER;

WHITE, 1994), que está associado a uma grande diminuição nos níveis de cloreto e a um aumento pronunciado dos níveis de bicarbonato no sangue (WEBER; WHITE, 1986).

Por fim, em relação a outras possíveis correlações existentes entre os parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue e a massa corpórea nas fêmeas de ambas as áreas de estudo, testadas pela regressão linear, verificou-se uma correlação negativa para linfócitos e massa corpórea para as fêmeas da área de Angatuba/SP, e uma forte correlação negativa para ácido úrico e massa corpórea para as fêmeas da área de Cubatão/SP.

Com relação aos linfócitos, estes podem ser observados em maior número durante um estímulo imune, sendo similares em sua morfologia àqueles encontrados em aves e mamíferos, e categorizados em células B e T, com funções de produção de imunoglobulinas e de respostas imunes celularmente mediadas, sendo contados em maior número em fêmeas do que em machos (SYPEK; BORYSENKO, 1988). A correlação encontrada neste experimento apresenta muitos pontos de dispersão, com um coeficiente de determinação relativamente baixo, sendo que essa relação só pode ser explicada em cinquenta e seis por cento das vezes pela variável independente. Além disso, o número de fêmeas capturadas na área de Angatuba/SP (N=10), foi maior do que da área de Cubatão/SP, o que pode influenciar diretamente nos achados.

Quanto ao ácido úrico, crocodilianos são carnívoros uricotélicos e amoniotélicos, ou seja, são animais capazes de excretarem ácido úrico e amônia como produtos finais do metabolismo do nitrogênio pela urina, respectivamente, em uma proporção aproximada de 75% e 20% do nitrogênio urinário total (DANTZLER, 1995). Em relação a amônia, este processo é extremamente vantajoso, porque ocorre um menor consumo de energia na excreção deste componente, visto que um menor número de processos bioquímicos são necessários na formação de sua excreta, além desse componente ser extremamente tóxico ao organismo (MARQUES et al., 2014). Por outro lado, a grande vantagem na excreção do ácido úrico é a sua baixa solubilidade, o que significa que ele pode ser excretado com uma baixa perda de água (BALINSKY, 1972), fato que gera outra vantagem, visto que os crocodilianos não podem produzir urina concentrada, devendo ser tão isotônica como o plasma (MOORE et al., 2009). Neste aspecto, quando em estresse osmótico, crocodilianos podem excretar o ácido úrico (LESLIE; SPOTILA, 2000), reabsorvendo uma maior quantidade de água.

Não obstante, o ácido úrico tem um grande valor clínico, entretanto elevação a níveis plasmáticos são observados somente quando mais de 70% dos rins estão comprometidos (WELLEHAN; GUNKEL, 2004). Porém, como verificado anteriormente, os níveis de

plasmáticos de ácido úrico, em relação as fêmeas de ambas as áreas de estudo, se encontram dentro dos parâmetros normais para os crocodilianos (BASSETTI; VERDADE, 2014).

Frente ao exposto, a forte correlação negativa obtida neste experimento pode, hipoteticamente, ser explicada primeiro por um efeito pós-prandial, visto que altos valores de ácido úrico tendem a ocorrer um dia após o indivíduo se alimentar (CAMPBELL, 1996), segundo por um aumento da excreção de amônia e uma diminuição na excreção de ácido úrico em animais menores, fato que poderia aumentar os níveis plasmáticos, e por fim, pelo baixo N amostral na área de Cubatão/SP, que poderia causar uma falsa correlação entre os valores de ácido úrico e massa corpórea.

2.5 Conclusões

Os resultados deste experimento apresentaram os primeiros valores de referência espécie-específicos para os parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue de jacarés-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) de vida livre, nas áreas de Angatuba/SP e Cubatão/SP, sendo relevantes para a conservação da espécie, através da manutenção do estado sanitário dos indivíduos ou das populações estudadas.

Com base nas informações obtidas neste estudo, sugere-se que os parâmetros analisados se encontram dentro de valores observados em outras populações de crocodilianos saudáveis. Porém, estudos futuros devem observar outras dinâmicas referentes a aspectos intrínsecos e extrínsecos que podem afetar estes animais.

Referências

ALLEMAN, A.R.; JACOBSON, E.R.; RASKIN, R.E. Morphologic and cytochemical characterization of blood cells from the desert tortoise (*Gopherus agassizii*). **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 53, p. 1645-1651, 1992.

ALTLAND, P.D.; BRACE, K.C. Red cell life span in the turtle and toad. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 203, p. 1188-1190, 1962.

AMIN, S.; SHRIVASTAV, A.B. Hematology and serum biochemistry of captive gharial (*Gavialis gangeticus*) in India. **Veterinary Word**, Gujarat, v. 7, n. 10, p. 794-798, 2014.

ARIKAN, H.; ÇIÇEK, K. Haematology of amphibians and reptiles: a review. **North-Western Journal of Zoology**, Oradea, v. 10, n. 1, p. 190-209, 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS.

Anuário estatístico da ABRAF: ano base 2009, 2010. Disponível em:

<<http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF10-BR/controlle.html>>. Acesso em: 13 nov. 2011.

BALINSKY, J.B. Phylogenetic aspects of purine metabolism. **South African Medical Journal. Amino Acids**, Cape Town, v. 50. p. 993-997, 1972.

BARBOZA, N.N.; COPPO, N.B.; FIORANELLI, S.A.; KOZA, G.A. El médio interno de *Caiman latirostris* em cautiverio. Influencia del sexo, crecimiento y estación del año. **Revista Veterinaria**, Río Cuarto, v. 19, n. 1, p. 33-41, 2008.

BARNETT, J.D.; CARDEILHAC, P.T.; BARR, B.; WOLFF, W.; BASS, O.L.; FLEMING, D.M. Utilization of thyroid hormone levels to determined starvation in alligators from the Everglades National Park. In: INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR AQUATIC ANIMAL MEDICINE, 1998, Berkeley. **Proceedings...** Berkeley: [s.n.], 1998. p. 52-56.

BASSETTI, L.A.B.; VERDADE, L.M. Crocodylia. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. (Org.). **Tratado de animais selvagens:** medicina veterinária. São Paulo: Roca, 2014. cap. 13, p. 154-169.

BAUER, C.; FORSTER, M.; GROS, G.; MOSCA, A.; PERELLA, M.; ROLLEMA, H.S.; VOGEL, D. Analysis of bicarbonate binding to crocodilian hemoglobina. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 256, n. 16, p. 8429-8435, 1981.

BOLTEN, A.B.; JACOBSON, E.R.; BJORNDALE, K.A. Effects of anticoagulant and auto analyzer on blood biochemistry values of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 52, n. 12, p. 2224-2227, 1992.

BOLTON, M. **La explotación del cocodrilo en cautividad**. Roma: FAO, 1994. 89 p.

BORGES, W.R.; BRAGA JÚNIOR, J.C.; TORRES, F.R. **O que você precisa saber sobre Cubatão**. Cubatão: Design & Print; Arquivo Histórico Municipal de Cubatão, 2002. 30 p.

BRUNORI, M.; CUTRUZOLLÀ, F. VALLONE, B. For fun and money: haemoglobin engineering. **Current Biology**, London, v. 5, n. 5, p. 462-465; 1995.

CAMPBELL, T.W. Clinical pathology. In: MADER, D.R. **Reptile medicine and surgery**. (Ed.). Philadelphia: Saunders Elsevier, 1996. chap. 22, p. 248-257.

_____. Interpretation of the reptilian blood profile. **Exotic Pet Practice**, Saint Louis, v. 3, n. 5, p. 33-36, 1998.

_____. Clinical chemistry of reptiles. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**, Fort Collins, v. 28, n. 1, p. 493-498, 2004.

CERUCCI, M.; MANCUSO, A.M. Análise de uma metodologia flexível e dos aspectos de interesse para a modelagem hidrológica da bacia hidrográfica do Rio Cubatão. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS HÍDRICOS, 17., 2007, São Paulo. **Anais...** São Paulo: [s.n.], 2007. p. 1-12.

CHABRECK, R. Methods of capturing, marking and sexing alligators. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE SOUTHEASTERN ASSOCIATION OF GAME AND FISH COMMISSIONERS, 1963, Hot Springs. **Proceedings...** Hot Springs: [s.n.], 1963. p. 45-50.

CLAVER, J.A.; QUAGLIA, A.I.E. Comparative morphology, development and function of blood cells in no mammalian vertebrates. **Journal of Exotic Pet Medicine**, New York, v. 18, n. 2, p. 87-97, 2009.

DANTZLER, W.H. Nitrogen excretion in reptiles. In: WALSH, P.J.; WRIGHT, P. (Ed.). **Nitrogen metabolism and excretion**. Boca Raton: CRC Press, 1995. p. 179-192.

DAVIS, A.K.; MANEY, D.L.; MAERZ, J.C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Functional Ecology**, Oxford, v. 22, p. 760-772, 2008.

DESSAUER, H.C. Blood chemistry of reptiles: physiological and evolutionary aspects. In: GANS, C.; PARSONS, T.S. (Ed.). **Biology of reptilia**. New York: Academic Press, 1970. p. 1-72.

DIXON, J.R.; YANOSKY, A. A microchip marking system for identification of caiman hatchlings. **Bulletin of the Maryland Herpetological Society**, Baltimore, v. 29, n. 8, p. 156-159, 1999.

DOMINGUES, E.N. **Estudo dos processos geomorfológicos do escoamento fluvial e evolução de vertentes na Serra do Cubatão, Serra do Mar – SP**. 1983. 153 p. Dissertação (Mestrado em Geografia Física) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1983.

FERREIRA, C.C.; TORRES, F.R.; BORGES, W.R. **Cubatão: caminhos da história**. Cubatão: Design & Print. 2008. 98 p.

FERRONATO, B.O. ***Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae) em ambiente antrópico: perfil hematológico e microbiota oral**. 2008. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicadas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”; Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, 2008.

FINGER, J.W.; ISBERG, S.R. A review of innate immune functions in crocodilians. **CAB Reviews**, Wallingford, v. 7, n. 67, p. 1-11, 2012.

FOGGIN, C.M. Diseases and disease control on crocodile farms in Zimbabwe. In: MANOLIS, S.C; WEBB, G.J.W.; WHITEHEAD, P.J.P. **Wildlife management: crocodiles and alligators**. Chipping Norton: University of Minnesota Press, 1987. p. 351-362.

FRYE, F.L. Hematology as applied to clinical reptile medicine. In: _____. (Ed.). **Biomedical and surgical aspects of captive reptile husbandry**. Melbourne: Krieger Publ., 1991. p. 209-277.

FUENTES, A.G.M.; SEIJAS, A.E.; ROSSINI, M. Valores hematológicos en ejemplares jóvenes de caimán del Orinoco (*Crocodylus intermedius*) en Venezuela. **Revista Científica**, Maracaibo, v. 21, n. 4, p. 360-364, 2011.

GARCIA-NAVARRO, C.E.K.; PACHALY, J.R. **Manual de hematologia veterinária**. São Paulo: Varela, 1994. 169 p.

GUILLETTE, L.J. JUNIOR; WOODWARD, A.R.; CRAIN, D.A.; MASSON, G.R.; PALMER, B.D; COX, M.C.; YOU-XIANG, Q.; ORLANDO, E.F. The reproductive cycle of the female American Alligator (*Alligator mississippiensis*). **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 108, p. 87-101, 1997

HARR, K.E.; ALLEMAN, A.R.; DENNIS, P.M.; MAXWELL, L.K.; LOCK, B.A.; BENNET, R.A.; JACOBSON, E.R. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells and hematologic and plasma biochemical reference ranges in green iguanas. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 218, p. 915-921, 2001

HAWKEY, C.M.; BENNETT, P.M.; GASCOYNE, S.C.; HART, M.G.; KIRKWOOD, J.K. Erythrocyte size, number and haemoglobin content in vertebrates. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 77, p. 392-397, 1991.

HUTTON, J.M.; LOVERIDGE, J.P.; BLAKE, D.K. Capture methods for the Nile crocodile in Zimbabwe. In: MANOLIS, S.C.; WEBB, G.J.W.; WHITEHEAD, P.J.P. **Wildlife management: crocodiles and alligators**. Chipping Norton: University of Minnesota Press, 1987. p. 211-216.

INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Programa Serra do Mar**: levantamentos básicos nas folhas de Santos e Riacho Grande, Estado de São Paulo; anexo A: estudos geológicos e geomorfológicos. São Paulo, 1986. 120 p.

JENKINS-PEREZ, J. Hematologic evaluations of reptiles: a diagnostic mainstay. **Veterinary Technician**, Princeton, v. 29, p. 616-628, 2008.

JENSEN, F.B.; WANG, T.; JONES, D.R.; BRAHM, J. Carbon dioxide transport in alligator blood and its erythrocyte permeability to anions and water. **American Physiological Society**, Baltimore, v. 274, n. 3, p. R661-R671, 1998.

JOYNER, P.H.; SHREVE, A.A.; SPAHR, J.; FOUNTAIN, A.L.; SLEEMAN J.M. Phaeohyphomycosis in a free-living eastern box turtle (*Terrapene carolina carolina*). **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.42, n. 4, p. 883–888, 2006.

KNOTEK, Z.; HAUPTMAN, K.; KNOTKOVA, Z.; HAJKOVA, P; TICHY, F. Haemogram and plasma biochemistry in green iguanas with renal disease. **Acta Veterinaria**, Brno, v. 71, p. 333-340, 2002.

KNOTKOVÁ, Z.; MAZANEK, S.; HOVORKA, M.; SLOBODA, M.; KNOTEK, Z. Haematology and plasma chemistry of Bornean River turtles suffer in from shell necrosis and haemogregarine parasites. **Veterinary Medicine Czech**, Praga, v. 50, n. 9, p. 421-426, 2005.

KRONKA, F.J.N.; NALON, M.A.; MATSUKUMA, C.K.; KANASHIRO, M.M.; YWANE, M.S.S.; PAVÃO, M.; DURIGAN, G.; LIMA, L.M.P.R.; GUILLAUMON, J.R.; BAITELLO, J.B.; BORGO, S.C.; MANETTI, L.A.; BARRADAS, A.M.F.; FUKUDA, J.C.; SHIDA, C.N.; MONTEIRO, C.H.B.; PONTINHA, A.A.S.; ANDRADE, G.G.; BARBOSA, O.; SOARES, A.P. **Inventário florestal da vegetação natural do Estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, Instituto Florestal, São Paulo. 2005. 199 p.

LEITÃO FILHO, H.F. (Org.). **Ecologia da Mata Atlântica em Cubatão (SP)**. São Paulo: Ed. UNESP; Ed. UNICAMP, 1993. 184 p.

LESLIE, A.J.; SPOTILA, J.R. Osmoregulation of the Nile crocodile, *Crocodylus niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part A, Natal, v. 126, n. 3, p. 351-365, 2000.

LOVELY, C.J.; PITTMAN, J.M.; LESLIE, A.J. Normal haematology and blood biochemistry of wild Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*) in the Okovango Delta. Botswana. **Journal of the South African Veterinary Association**, Pretoria, v. 78, n. 3, p. 137-144, 2007.

MACHADO, A.B.M.; DRUMMOND, G.M.; PAGLIA, A.P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília: MMA; Fundação Biodiversitas, 2008. 1420 p.

MARENGO-ROWE, A.J. Structure-function relations of human hemoglobins. In: BAYLOR UNIVERSITY MEDICAL CENTER, 2006, Waco. **Proceedings...** Waco: Baylor University Medical Center, 2006. p. 239-245.

MARQUES, T.S.; BASSETTI, L.A.B.; LARA, N.R.F.; ARAÚJO, M.S.; PIÑA, C.I.; CAMARGO, P.B.; VERDADE, L.M. Isotopic discrimination factors ($\Delta^{13}\text{C}$ and $\Delta^{15}\text{N}$) between tissues and diet of the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). **Journal of Herpetology**, Athens, v. 48, n. 3, p. 332-337, 2014.

MARTÍNEZ-SILVESTRE, A.; LAVÍN, S.; CUENCA, R. Hematologia y citologia sanguínea em reptiles. **Clínica Veterinaria de Pequeños Animales**, Madrid, v. 31, p. 131-141, 2011.

MATEO, M.R.; ROBERTS, E.D.; ENRIGHT, F.M. Morphologic, cytochemical and functional studies of peripheral blood cells of young healthy American alligators (*Alligator Mississippiensis*). **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.45, p. 1046-1053, 1984.

MAZZOTTI, F.J.; DUNSON, W.A. Osmoregulation in crocodilians. **American Zoologist**, Thousand Oaks, v. 29, p. 903-920, 1989.

MILLAN, J.M.; ANMMAT, A.; RICHARDSON, K.C.; CHAMBERS, L.K.; FOMIATTI, K.R. Reference ranges of biochemical and haematological in farner saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) yearlings. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 75, n. 11, p. 814-817, Nov. 1997.

MOORE, B.C.; HYNDMAN, K.A.; COX, A.; LAWLER, A.; MATHAVAN, K.; GUILLETTE JUNIOR, L.J. Morphology and histochemistry of juvenile American alligator (*Alligator mississippiensis*) nephrons. **The Anatomical Record**, New York, n. 292, p. 1670-1676, 2009.

- MOURA, W.L.; MATUSHIMA, E.R.; OLIVEIRA, L.W.; EGAMI, M.I. Aspectos morfológicos e citoquímicos dos glóbulos sanguíneos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (*Reptilia, Crocodilia*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 45-50, 1999.
- MYBURGH, J.G.; KIRGERG, R.M.; STEYL, J.C.A.; SOLEY, J.T.; BOOYSE, D.G.; HUCHZERMAYER, F.W.; LOWERS, R.H.; GUILLETE JUNIOR L.J. The post-occipital spinal venous sinus of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*): Its anatomy and use for blood sample collection and intravenous infusions. **Journal of the South African Veterinary Association**, Pretoria, v. 85, n. 1, p. 1-10, 2014
- NARDINI, G.; LEOPARDI, S.; BIELLI, M. Clinical hematology in reptilian species. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, Philadelphia, v. 16, p. 1-30, 2013
- NATT, M.P.; HERRICK, G.A. A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chicken. **Poultry Science**, Ithaca, v. 31, p. 735-738, 1952.
- RASKIN, R.E. Reptile complete blood count. In: FUDGE, A.M. (Ed.). **Laboratory medicine avian and exotic pets**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. p. 193-197.
- ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancromáticos e estudos de diversos fatores. **Memórias**, São Paulo, v. 20, p. 315-328, 1947.
- ROSSKOPFF, W.R. JUNIOR. Disorders of reptilian leukocytes and erythrocytes. In: FUDGE, A.M. (Ed.). **Laboratory medicine avian and exotic pets**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. p. 19-27.
- ROUSSELET, E.; STACY, N.I.; La VICTORIE, K.; HIGGINS, B.M.; TOCIDLOWSKI, M.E.; FLANAGAN, J.P.; GODARD-CODDING, C.A. Hematology and plasma biochemistry analyses in five age groups of immature, captive reared loggerhead sea turtles. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 44, p. 859-874, 2013
- SANTOS, L.C. **Laboratório ambiental**. Cascavel: Unidoeste, 1999. 323 p.
- SEYMOUR, R.S. Maximal aerobic and anaerobic power generation in large crocodiles versus mammals: implications for dinosaur gigantothermy. **Plos One**, San Francisco, v. 8, p. 1-10, 2013.
- SILVESTRE, A.M. Cytological assessment of leukocytes in reptiles. In: SOUTHERN EUROPEAN VETERINARY CONFERENCE, 2013, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona: [s.n], 2013. p. 1-6.
- SISTEMA INTEGRADO DE GERENCIAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Comitê de Bacias Hidrográficas**: Baixada Santista. Disponível em: <<http://www.sigrh.sp.gov.br/cbhbs/apresentacao>>. Acesso em: 03 ago. 2015.

STACY, B.A.; WHITAKER, N. Hematology and blood biochemistry of Mugger crocodiles (*Crocodylus palustris*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 31, n. 3, p. 339-347, 2000.

STACY, N.I.; ALLEMAN, A.R.; SAYLER, K.A. Diagnostic hematology of reptiles. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia, v. 31, p. 87-108, 2011.

SYKES, J.M.; KLAPHAKE, E. Reptile hematology. **Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice**, Bethesda, v. 11, p. 481-500, Sept. 2008.

_____. Reptile hematology. **Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice**, Bethesda, v. 18, p. 63-82, 2015.

SYPEK, J.; BORYSENKO, M. Reptiles. In: ROWLEY, A.F.; RATCLIFFE, N.A (Ed.). **Vertebrate blood cells**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p. 211-256.

WALLACH, J.D.; BOEVER, W.J. Diseases of exotic animals. In: _____. **Medical and surgical management**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1983. p. 983-987.

WALSH, B.P. Crocodile capture techniques in the Northern territory of Australia. In: WEBB, G.J.; MANOLIS, S.C.; WHITEHEAD, P.J. (Ed.). **Wildlife management: crocodiles and alligators**. Chipping Norton: Surrey Beatty, 1987. p. 249-252.

WEBER, R.E.; WHITE, F.N. Oxygen binding in alligator blood related to temperature, diving and "alkaline tide". **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 251, n. 5, p. R910-R908, 1986.

_____. Chloride-dependent organic phosphate sensitivity of the oxygenation reaction in crocodilian hemoglobins. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 192, p. 1-11, 1994.

WEBER, R.E.; FAGO, A.; MALTE, H.; STORZ, J.F.; GORR, T.A. Lack of conventional oxygen-linked proton and anion binding sites does not impair allosteric regulation of oxygen binding in dwarf caiman hemoglobin. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 305, p. R300-R312, 2013.

WELLEHAN, J.F.X.; GUNKEL, C.I. Emergent diseases in reptiles. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, Philadelphia, v. 13, n. 3, p. 160-174, 2004.

WORK, T.M., BALAZS, G.H. Relating tumor score to hematology in green turtles with fibro papillomatosis in Hawaii. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 35, n. 4, p. 804-807, 1999.

WRIGHT, K.M.; SKEBA, S. Hematology and plasma chemistry of captive prehensile-tailed skins (*Corusia zebrata*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 23, p. 429-432, 1992.

ZAYAS, M.A.; RODRÍGUEZ, H.A.; GALOPPO, G.H.; STOKER, C.; DURANDO, M.; LUQUE, E.H.; MUÑOZ-de-TORO, M. Hematology and blood biochemistry of young healthy broad-snouted caimans. **Journal of Herpetology**, v. 45, n. 4, p. 516-524, 2011.

ZIMMERMAN, L.M.; VOGEL, L.A.; BOWDEN, R.M. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 213, p. 661-671, 2010.

3 CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA ORAL EM ASSOCIAÇÃO COM O TESTE DE PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS EM JACARÉS-PAPO-AMARELO (*Caiman latirostris*) DE VIDA LIVRE

Resumo

Por se tratar de uma espécie que está cada vez mais em interação com o homem e os animais domésticos, a caracterização da microbiota oral do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*), além do reconhecimento dos antimicrobianos mais eficazes em relação às bactérias encontradas na cavidade oral destes animais, tornam-se importantes frente às possíveis infecções causadas por acidentes intra ou interespecíficos, e ou pela utilização dos mesmos recursos hídricos. Os resultados deste experimento sugerem que as bactérias encontradas na cavidade oral dos animais capturados, em sua maioria, enterobactérias Gram-negativas, façam parte da flora autóctone destes indivíduos. Todavia, na presença de ações que promovam um aumento do nível de estresse, tais como degradação de habitat, poluição, imunossupressão e traumas, estas mesmas bactérias isoladas poderão se tornar patogênicas, podendo causar danos ao indivíduo, a uma população, ou até mesmo à outras espécies, incluindo o homem e os animais domésticos. Além do isolamento, identificação e caracterização das bactérias, os testes de perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos realizados indicam que Enrofloxacin, Norfloxacin e Gentamicin apresentaram os menores índices de resistência frente aos isolados testados.

Palavras-chave: Crocodilianos; Bactérias; Microrganismos; Antimicrobianos

Abstract

Since the species interacts more frequently with humans and domestic animals, the characterization of oral microbiota of broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*), in addition to awareness of more effective antimicrobials in relation to bacteria found in the oral cavity of such animals, has become important against the possible infections caused by intra or interspecific accidents, and/or by using the same water resources. The results of this experiment suggest that bacteria found in the oral cavity of captured animals, being mostly Gram-negative Enterobacteria, are part of the native flora of these individuals. However, in the presence of actions that promote an increase in the stress level, such as: habitat degradation, pollution, immunosuppression and traumas, these same isolated bacteria may become pathogenic, causing damage to an individual, a population, or even other species including humans and domestic animals. In addition to the isolation, identification and characterization of bacteria, the antimicrobial susceptibility testing indicates that Enrofloxacin, Norfloxacin and Gentamicin show the lowest resistance rates against the isolates tested.

Keywords: Crocodilians; Bacteria; Microorganisms; Antimicrobials

3.1 Introdução

O estado sanitário dos crocodilianos de vida livre tem sido pouco estudado durante as últimas décadas, e o jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) não foge a esta realidade. Embora vários experimentos tenham sido realizados em relação à microbiota do trato gastrointestinal em crocodilianos, quase nada é sabido sobre a diversidade e ecologia deste micro bioma. A maioria destes estudos foram direcionados para a avaliação de coliformes fecais, que não refletem a atual diversidade microbiana, e para experimentos envolvendo *Salmonella* ssp (KEENAN et al., 2013). Mais infrequentes ainda foram os experimentos relacionados ao isolamento, identificação e caracterização de bactérias encontradas na cavidade oral destes animais associados a testes de perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Por se tratar de uma espécie que está cada vez mais em interação com o homem e os animais domésticos, a caracterização de sua microbiota oral, além do reconhecimento dos antimicrobianos mais eficazes em relação às bactérias encontradas na cavidade oral destes animais, tornam-se importantes frente às possíveis infecções causadas por acidentes intra ou interespecíficos, e ou pela utilização dos mesmos recursos hídricos (e.g. pesca, lazer, uso da água para ingesta, descarga de efluentes, etc.) (CHARRUAU et al., 2012). Embora não existam relatos oficiais nos últimos anos de acidentes envolvendo a espécie e os seres humanos, essa proximidade pode causar interações agonísticas (interações heterotípicas negativas), provocando lesões que vão desde simples arranhões até lesões mais graves geradas por mordidas. Estas feridas, por sua vez, acabam sendo infectadas através da inoculação de bactérias que estão em contínua interação com o ambiente em que ocupam (TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ et al., 2004; ABRAHAMIAN; GOLDSTEIN, 2011), neste caso, a cavidade oral dos jacarés.

Este processo se inicia no momento em que estas bactérias criam uma primeira interface quando em contato com um conjunto de superfícies recobertas por células epiteliais, sendo esta a maior e mais importante ligação entre o organismo (e.g. bactérias, fungos, vírus, etc.) e seu novo habitat, gerando uma rápida colonização destas superfícies. Neste contexto, a pele e a superfície mucosa dos tratos intestinal e respiratório são as principais portas de entrada destes microrganismos. Estas interações, em alguns casos, podem acabar sendo benéficas ao hospedeiro (comensalismo), ou simplesmente causar um impacto neutro na saúde do mesmo (KEENAN et al., 2015). Todavia, sobre algumas circunstâncias, a interação com bactérias exógenas pode ser danosa (parasitismo), e infecções oportunistas podem

ocorrer. Assim, de acordo com Bailey et al. (2005), a mucosa deve gerar respostas imunes ativas aos patógenos, como também tolerância aos antígenos da microflora comensal. Por outro lado, na impossibilidade do organismo em responder a estas agressões, poderão ocorrer septicemias, causando danos irreversíveis ao indivíduo, ou até mesmo a uma população.

Por este motivo, o reconhecimento que bactérias encontradas na cavidade oral dos animais podem ser potencialmente patogênicas a outros indivíduos da mesma espécie, para peixes, aves e mamíferos, incluindo o homem, e que algumas delas são sensíveis e outras extremamente resistentes aos antimicrobianos é relevante, porém, de menor importância para o aspecto sanitário se não forem realizados testes de perfil de susceptibilidade a esses fármacos, frente a necessidade de instalação de tratamento.

Neste contexto, este estudo objetivou realizar o isolamento e a identificação da microbiota oral de duas populações selvagens de jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*), em associação com o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos para os isolados encontrados.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Área de estudo

As áreas de estudo foram escolhidas neste experimento por estarem inseridas em duas importantes bacias hidrográficas pertencentes ao Estado de São Paulo, além de estarem localizadas em regiões que apresentam diferentes tipos de exploração econômica.

Na região de Angatuba/SP, pertencente à bacia do Alto Paranapanema, foram utilizadas duas fazendas voltadas à silvicultura de eucalipto, e que ocupam, em conjunto, uma área de 4.364 ha. Segundo Lisboa (2008), essa área é uma zona de transição entre floresta estacional semidecidual e cerrado, que sofreu ciclos de desmatamento e revegetação ao longo do tempo. Quanto a paisagem atual, ambas as fazendas apresentam um mosaico formado por fragmentos de vegetação nativa, pastos abandonados, corpos d'água e a matriz de silvicultura de eucalipto, sendo que esta atividade, em geral, mantém reservatórios de água artificiais (e.g., açudes, lagoas e pequenas represas) a fim de garantir o abastecimento para casos de eventuais incêndios florestais. Dentre os diversos reservatórios existentes, cinco deles foram escolhidos para a realização das capturas, denominados de Açude Vermelho, Lagoão, Lagoa Suja, Açude do Casemiro e Três Lagoas (Figura 16).

Figura 16 - Área de estudo localizada no município de Angatuba evidenciando os corpos d'água amostrados: 1– Açude Vermelho; 2 – Lagoão; 3 - Lagoa Suja; 4 - Açude do Casemiro; 5 - Três Lagoas

A segunda área utilizada neste estudo se localiza na bacia hidrográfica da Baixada Santista (Figura 17), tendo como centro o município de Cubatão/SP, com uma faixa de terra que se segue desde os cumes da Serra do Mar até os meandros estuarinos, com destaque para a floresta atlântica nas escarpas, as florestas de terras baixas nas planícies e os mangues nas áreas alagadas (MESQUITA, 2011). Segundo Luiz-Silva, Matos e Kristoch (2002), este município abriga um dos mais importantes polos industriais do Brasil, incluindo mais de uma centena de fábricas, que são as principais fontes de contaminação do sistema. Porém, outras fontes de poluição de corpos d'água e do solo também participam desse processo, sendo eles o esgoto doméstico (65% sem tratamento); as águas da represa Billings, com deposição do esgoto da região da Grande São Paulo, que chega ao rio Cubatão através da Usina Henry Borden; o derramamento de cargas perigosas no Sistema Anchieta-Imigrantes causado por acidentes com caminhões de cargas perigosas, que desce pelo curso das nascentes do rio Cubatão; e pela disposição de lixo realizada de maneira incorreta no antigo “lixão” de Cubatão, junto com a disposição de resíduos hospitalares (FERREIRA et al., 2008). Somado a isso, a precipitação média anual varia de 2.500 a 3.000 mm, com chuvas mais pronunciadas nos meses de novembro, dezembro e janeiro, que decaem consideravelmente nos meses de

junho a agosto (DOMINGUES, 1983; BORGES et al., 2002), facilita a propagação da poluição ao estuário.

Figura 17 - Bacia Hidrográfica de Cubatão/SP
Fonte: UHLIG, V. M. – NGeo/RAN/ICMBio

3.2.2 Captura e marcação

Três diferentes modelos de captura foram utilizados durante este experimento, sendo diferenciados pelo uso de laços de aço e cambões para ambas as áreas de estudo e de armadilhas tipo funil (*Funnel traps*) para a área de Angatuba. A técnica de captura com laços e cambões, junto com a apreensão manual, consiste basicamente na visualização dos olhos dos animais feita com o auxílio de lanternas de cabeça de alta potência e na aproximação com o barco realizada de forma lenta, conforme descrito por Hutton et al. (1987) e Walsh (1987) (Figura 18A) durante o período noturno. Quanto à funcionalidade das armadilhas tipo funil (*Funnel Traps*) (Figura 18B), estas demonstraram ser um excelente método de captura,

podendo serem utilizadas inclusive durante o dia, porém, na área de Cubatão/SP, este método foi ineficaz devido a ação da maré. Tal variação nos níveis d'água poderiam dificultar a chegada às armadilhas, deixando os animais expostos ao calor, causando desidratação e morte. Imediatamente após a captura dos animais, as colheitas de material foram realizadas na cavidade oral dos animais.

Dois métodos de identificação foram utilizados nos animais, sendo o primeiro a marcação externa, realizada através de cortes nas cristas caudais simples e duplas (BOLTON, 1994), com uma combinação numérica previamente estabelecida, e a marcação interna, com a colocação de *transponders* (microchips) junto ao tecido subcutâneo (DIXON; YANOSKY, 1999), na região cervical, tendo como padronização o lado direito (Figura 18C).

Figura 18 - Métodos de captura e marcação, onde A é o método de captura com laço de aço e utilização de barco; B é o método de captura com utilização de armadilha tipo funil (*Funnel Trap*); e C é o método de marcação através de aplicação subcutânea de *transponders* (microchips)

Fonte: o autor

3.2.3 Biometria e sexagem

Os indivíduos capturados tiveram os dados biométricos mensurados com o auxílio de uma fita métrica (tipo trena), de um paquímetro com precisão de 1 mm e de balanças de campo Pesola®, com precisão de 1,0g (Figura 19A), pós colheita de material biológico, evitando assim elevação no nível de estresse e possível contaminação no momento da manipulação. As medidas tomadas foram comprimento total do corpo (TL), comprimento rostro-cloacal (SVL), comprimento total da cabeça, comprimento total do crânio, distância entre os olhos e comprimento total do focinho, além da massa corpórea. Algumas dessas medidas foram tomadas para serem utilizadas em outros experimentos, e não foram incluídas em nossas análises. A determinação do sexo foi feita através do exame visual dos órgãos

sexuais com o auxílio de um espéculo de tamanho apropriado ou manualmente (Figura 4B), dependendo do porte do animal (CHABRECK, 1963; ALLSTEAD; LANG, 1995).

Figura 19 - Biometria e sexagem, onde A é a realização da tomada de peso (Massa Corpórea = MC); e B é o procedimento de sexagem através da exposição manual do pênis

Fonte: o autor

3.2.4 Colheita de material

Para a colheita do material foram utilizados *swabs* com meio de cultivo de AMIES (utilizado para transporte). A abertura da cavidade oral dos animais foi realizada de forma manual, imediatamente após a contenção dos mesmos, evitando-se contaminação por fômites, principalmente cordas (Figura 20). Os *swabs* foram rotacionados quinze vezes na região compreendida entre a base da língua e a prega gular, de forma lenta, totalizando 1 rotação completa por segundo (Figura 20). Tão logo terminado o processo, os recipientes utilizados foram identificados com a mesma numeração da marcação da crista caudal e do *transponder* pertencente ao animal e mantidos refrigerados à temperatura de 2 a 8°C.

Figura 20 - Abertura manual da boca e esfregaço de *swab* para colheita da microbiota oral em jovem capturado em armadilha tipo *Funnel Trap* durante o período diurno

Fonte: o autor

3.2.4.1 Processamento do material

3.2.4.1.1 Isolamento, identificação e caracterização microbiana

As amostras coletas foram encaminhadas ao laboratório (Zoológica Assistência em Diagnóstico Veterinário Ltda.®) para o isolamento, identificação e caracterização microbiana em um prazo não superior a 24 horas pós-colheita. A partir disso, o material em crescimento foi repicado com alça de platina em placas de Petri de oito cm, descartáveis, contendo ágar Sangue e ágar MacConkey e colocado para incubação a 37°C, por até 72 horas (Figura 21).

Figura 21 – Incubação em ágar Sangue e ágar MacConkey
Fonte: Zoológica Assistência em Diagnóstico Veterinário Ltda

A triagem dos microrganismos gram-positivos foi realizada de acordo com as características bacteriológicas apresentadas em coloração de Gram, em microscópio (Figura 22). Os microrganismos gram-negativos foram identificados por passagem das colônias pelo método TSI (Triple Sugar Iron) e pelo perfil bioquímico (BRITES, 2002).

Figura 22 – Microscopia: lâmina apresentando Bacilos Gram-negativos (Lac -) coloração de Gram em aumento de 1000 x
Fonte: Zoológica Assistência em Diagnóstico Veterinário Ltda

3.2.4.1.2 Testes de perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

Foram realizados os testes de perfil de susceptibilidade a antimicrobianos utilizando-se a técnica de disco de difusão pelo método de Kirby-Bauer, sendo um dos mais comumente usados para este tipo de estudo. O método consiste em se colocar pequenos discos de papel filtro (6 mm), impregnados com uma quantidade padrão de antimicrobiano sobre uma superfície de ágar gel na Placa de Petri, previamente preparada com bactérias, na forma de esfregaço em ágar Mueller Hinton (Figura 23). As placas são incubadas durante a noite, e a zona de inibição do crescimento bacteriano é usada como uma medida da susceptibilidade. Grandes zonas de inibição indicam que o organismo é sensível, enquanto que pouca ou nenhuma zona de inibição indica resistência ao antimicrobiano. Uma interpretação do intermediário é dada para as zonas que se situam entre os valores de corte aceitos para as outras interpretações.

Para explorar todo o potencial destes testes, as leituras interpretativas requerem que os isolados sejam especiados com precisão e testados com grandes baterias de diferentes antimicrobianos (LIVERMORE et al., 2001), sendo que neste experimento foram testados dezoito antimicrobianos, distribuídos entre as classes dos aminoglicosídeos, dos β – lactâmicos, do cloranfenicol, das lincosamidas, dos macrolídeos, das quinolonas, das rifamicinas, das sulfonamidas e das tetraciclinas, sendo eles: Amicacina (30 μ g), Amoxicilina + Ácido Clavulânico (30 μ g), Ampicilina (10 μ g), Azitromicina (15 μ g), Cefalexina (30 μ g), Cefalotina (30 μ g), Ceftiofur (30 μ g), Clindamicina (2 μ g), Cloranfenicol (30 μ g), Enrofloxacina (5 μ g), Gentamicina (10 μ g), Neomicina (30 μ g), Norfloxacina (10 μ g), Oxacilina (1 μ g), Penicilina G (10 μ g), Rifampicina (05 μ g), Sulfametaxazol+Trimetropin (25 μ g) e Tetraciclina (30 μ g).

Figura 23 - Utilização da técnica de disco de difusão pelo método de Kirby-Bauer, em ágar Mueller Hinton, para o teste de perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Fonte: o autor

3.3 Resultados

Foram coletadas 49 amostras das cavidades orais dos animais na área de Angatuba, nas quais foram isolados 14 diferentes tipos de bactérias, sendo duas determinadas em nível de gênero e 12 em nível de espécie. Destas, uma (7,14%) foi classificada como baciliforme aeróbio Gram-positivo, uma (7,14%) como bacilo Gram-negativo e 12 (85,72%) foram classificadas como Enterobactérias Gram-negativas, estando as frequências de isolamento de cada espécie representadas na Tabela 5. Na área de Cubatão foram coletadas 11 amostras das cavidades orais e isoladas cinco espécies de bactérias, onde quatro (80%) foram classificadas como Enterobactérias Gram-negativas e uma (20%), como baciliforme aeróbio Gram-positivo, estando as frequências de isolamento de cada espécie representadas na Tabela 6.

Tabela 5 - Frequências de isolamento das bactérias encontradas na cavidade oral de jacarés-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) de vida livre na área de Angatuba

	Frequência em N=49			Frequência em N=49			Frequência em N=49	
	N	%		N	%		N	%
Baciliforme aeróbio Gram-positivo			Bacilo Gram-negativo			Enterobactéria Gram-negativa		
						<i>Citrobacter diversus</i>	7	14,29
						<i>Citrobacter freundii</i>	5	10,2
<i>Corynebacterium</i> sp	1	2,04				<i>Edwardsiella tarda</i>	6	12,25
						<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	6,12
						<i>Enterobacter cloacae</i>	3	6,12
						<i>Escherichia coli</i>	7	14,29
						<i>Hafniae alvei</i>	1	2,04
						<i>Proteus mirabilis</i>	1	2,04
						<i>Proteus stuartii</i>	2	4,08
						<i>Proteus vulgaris</i>	8	16,33
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	2,04	<i>Salmonella paratyphi</i>	2	4,08
						<i>Serratia</i> sp	2	4,08

Fonte: o autor

Tabela 6 - Frequências de isolamento das bactérias encontradas na cavidade oral de jacarés-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) de vida livre na área de Cubatão

	Frequência em N=11			Frequência em N=11	
	N	%		N	%
Bacilo Gram-negativo			Enterobactéria Gram-negativa		
			<i>Citrobacter diversus</i>	3	27,27
			<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	18,18
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	18,18
			<i>Proteus vulgaris</i>	3	27,27
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	9,1			

Fonte: o autor

Além do isolamento, identificação e caracterização das bactérias, foram realizados testes de perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos nas áreas de Angatuba/SP (Tabela 7) e Cubatão/SP (Tabela 8), provendo informações importantes quanto a eficácia dos medicamentos em possíveis tratamentos de feridas infectadas por bactérias advindas das cavidades orais dos animais.

Neste aspecto, o antimicrobiano Clindamicina, da classe das Lincosamidas, foi o que demonstrou o pior resultado, sendo que a totalidade das amostras, de ambas as áreas de

estudo, apresentaram índice de resistência de 100% ao mesmo. Duas outras classes também apresentaram elevado índice de resistência, sendo a primeira a Rifamicina, representada pela Rifampicina, com índices de resistência de 50% para *Proteus stuartii* e *Serratia* sp, de 80% para *Citrobacter freundii* e de 100% para os demais patógenos. Já a classe dos β -lactâmicos, representados pelos antimicrobianos Amoxicilina (associada ao Ácido Clavulânico), Ampilicina, Cefalexina, Cefalotina, Oxacilina e Penicilina G, apresentaram graus de resistência superiores a 50% para todos os isolados, excetuando o Ceftiofur, um β -lactâmico exclusivo da linha veterinária, que apresentou índice de resistência superior a 50% somente para *Corynebacterium* sp, *Proteus mirabilis*, *Salmonella paratyphi*, *Serratia* sp e *Klebsiella pneumoniae*.

A tetraciclina, um antimicrobiano bacteriostático quando administrado em doses terapêuticas, apresentou índices de sensibilidade de 100% para *Proteus stuartii* somente na área de Angatuba (Tabela 7), enquanto para *Enterobacter aerogenes*, os índices foram de 100% e 50% nas áreas de Angatuba e Cubatão respectivamente (Tabelas 7 e 8). Para os outros isolados, os graus de resistência foram superiores a 33,3%, em ambas as áreas de estudo.

Citrobacter diversus, em relação ao Sulfametoxazol associado ao Trimetropin, demonstrou diferenças em relação ao índice de sensibilidade na comparação entre as áreas de estudo, apresentando um grau de sensibilidade de 100% para Angatuba e de 33,3% para Cubatão. Ainda sobre este antimicrobiano da classe das sulfonamidas, graus de sensibilidade de 100% foram observados para *Citrobacter freundii*, *Corynebacterium* sp, *Proteus mirabilis*, *Proteus stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia* sp na área de Angatuba. Índices de resistência superiores a 25% foram observados para os isolados restantes.

Corynebacterium sp demonstrou índices de resistência de 100% a todos os antimicrobianos testados, excetuando a classe das quinolonas, representada neste experimento por Enrofloxacin e Norfloxacin e a classe das sulfonamidas, representada pelo Sulfametoxazol associado ao Trimetropin.

Em relação aos aminoglicosídeos, Amicacina demonstrou índice de sensibilidade de 100% somente para *Proteus mirabilis*, *Proteus stuartii* e *Salmonella paratyphi* na área de Angatuba, *Enterobacter aerogenes* na área de Cubatão e para *Pseudomonas aeruginosa* em ambas as áreas. Nesta mesma classe, dois outros antimicrobianos apresentaram resultados com maior eficácia, sendo que Gentamicina demonstrou índices de resistência somente para *Corynebacterium* sp (100%), *Edwardsiella tarda* (66,7%), *Enterobacter aerogenes* (33,3%) e *Escherichia coli* (28,6%) na área de Angatuba e para *Citrobacter diversus* (33,3%) na área de Cubatão, seguida pela Neomicina, com índices de resistência de 100% para *Corynebacterium*

sp e *Hafniae alvei*, de 50% para *Edwardsiella tarda*, 33,3% para *Enterobacter cloacae*, 57,1% para *Escherichia coli* e de 12,5% para *Proteus vulgaris*. *Enterobacter aerogenes* e *Citrobacter diversus* apresentaram índices de resistência diferentes quando comparados por áreas em relação a Neomicina, sendo de 33,3% e 0%, e de 28,6% e 33,3% respectivamente para as áreas de Angatuba e Cubatão.

O macrolídeo Azitromicina apresentou índices de sensibilidade de 100% para *Proteus stuartii* em Angatuba, *Klebsiella pneumoniae* em Cubatão, e para *Enterobacter aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* em ambas as áreas de estudo.

Em relação ao Cloranfenicol, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Hafniae alvei*, *Proteus stuartii*, *Salmonella paratyphi* e *Serratia* sp foram os isolados que apresentaram graus de sensibilidade de 100%, seguidos por *Proteus vulgaris* com 87,5%, e por *Citrobacter diversus* e *Escherichia coli* com 85,7%.

Por fim, os antimicrobianos da classe das Quinolonas, representados por Enrofloxacin e Norfloxacin, foram os que apresentaram melhores resultados, sendo que somente *Edwardsiella tarda* (50%), *Escherichia coli* (28,6%) e *Pseudomonas aeruginosa* (100%) apresentaram índice de resistência a Norfloxacin, enquanto *Edwardsiella tarda* (50%), *Escherichia coli* (28,6%) e *Hafniae alvei* (100%) demonstraram resistência a Enrofloxacin. Todos os outros isolados apresentaram índices de sensibilidade de 100% para ambas as quinolonas testadas.

Tabela 7 - Índice de resistência antimicrobiana das bactérias isoladas na área Angatuba (%)

ANG/ISOLAMENTO	N	AMI	AMC	AMP	AZM	CFX	CFT	CFF	CLI	CLO	ENR	GEN	NEO	NOR	OXA	PNG	RIF	SMT	TET
<i>Citrobacter diversus</i>	7	14,3	85,7	85,7	71,4	85,7	85,7	0	100	14,3	0	0	28,6	0	85,7	85,7	100	0	28,6
<i>Citrobacter freundii</i>	5	20	80	100	80	80	80	0	100	0	0	0	0	0	80	80	80	0	60
<i>Corynebacterium sp</i>	1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	0	100	100	100	0	100
<i>Edwardsiella tarda</i>	6	66,7	83,3	100	66,7	83,3	100	0	100	33,3	50	66,7	50	50	100	100	100	50	83,3
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	33,3	66,7	100	0	100	66,7	0	100	33,3	0	33,3	33,3	0	100	100	100	33,3	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	33,3	100	100	33,3	100	100	0	100	0	0	0	33,3	0	100	100	100	66,7	33,3
<i>Escherichia coli</i>	7	42,9	100	100	57,1	100	100	0	100	14,3	28,6	28,6	57,1	28,6	100	100	100	42,9	71,4
<i>Hafniae alvei</i>	1	100	100	100	100	100	100	0	100	0	100	0	100	0	100	100	100	100	100
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0	0	100	100	100	0	100
<i>Proteus stuartii</i>	2	0	50	100	0	100	100	0	100	0	0	0	0	0	50	100	50	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	8	12,5	87,5	100	62,5	100	100	0	100	12,5	0	0	12,5	0	100	100	100	25	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	0	0	100	100	100	100	0	100
<i>Salmonella paratyphi</i>	2	0	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0	100	100	100	50	100
<i>Serratia sp</i>	2	50	100	100	100	100	100	50	100	0	0	0	0	0	100	100	50	0	50

AMI: Amicacina; AMC: Amoxicilina + Ácido Clavulânico; AMP: Ampicilina; AZM: Azitromicina; CFX: Cefalexina; CFT: Cefalotina; CFF: Ceftiofur; CLI: Clindamicina; CLO: Cloranfenicol; ENR: Enrofloxacin; GEN: Gentamicina; NEO: Neomicina; NOR: Norfloxacin; OXA: Oxacilina; PNG: Penicilina G; RIF: Rifampicina; SMT: Sulfametoxazol + Trimetropin; TET: Tetraciclina

Tabela 8 - Índice de resistência antimicrobiana das bactérias isoladas na área Cubatão (%)

CUB/ISOLAMENTO	N	AMI	AMC	AMP	AZM	CFX	CFT	CFF	CLI	CLO	ENR	GEN	NEO	NOR	OXA	PNG	RIF	SMT	TET
<i>Citrobacter diversus</i>	3	33,3	100	100	66,7	66,7	100	0	100	66,7	0	33,3	33,3	0	100	100	100	66,7	66,7
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	0	0	0	100	100	100	100	50
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	50	50	100	0	100	100	50	100	50	0	0	0	0	100	100	100	100	50
<i>Proteus vulgaris</i>	3	33,3	66,7	66,7	66,7	100	100	0	100	33,3	0	0	0	0	100	100	100	66,7	66,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	0	0	100	100	100	100	0	100

AMI: Amicacina; AMC: Amoxicilina + Ácido Clavulânico; AMP: Ampicilina; AZM: Azitromicina; CFX: Cefalexina; CFT: Cefalotina; CFF: Ceftiofur; CLI: Clindamicina; CLO: Cloranfenicol; ENR: Enrofloxacin; GEN: Gentamicina; NEO: Neomicina; NOR: Norfloxacin; OXA: Oxacilina; PNG: Penicilina G; RIF: Rifampicina; SMT: Sulfametoxazol + Trimetropin; TET: Tetraciclina

3.4 Discussão

Embora sejam poucas as bactérias consideradas específicas nos crocodilianos, e que um pequeno número de bactérias seja causador de doenças mais sérias, muitos desses agentes podem ser a causa de septicemias (HUCHZERMEYER, 2003). Mesmo os crocodilianos apresentando um sistema imune robusto (KEENAN et al., 2015), estas infecções podem ocorrer principalmente em animais que apresentem baixa imunidade. Dos indivíduos capturados, aparentemente todos apresentavam bom estado sanitário, tendo sido verificados para tanto, parâmetros como massa corpórea, vigor e mobilidade, grau de desidratação na região do pescoço, além do perfil hematológico e bioquímico do sangue dos animais. Desta forma, pressupõe-se que as bactérias encontradas neste experimento façam parte da flora oral autóctone destes indivíduos. Todavia, na presença de ações que promovam um aumento do nível de estresse, tais como degradação de habitat ou poluição (GIBBONS et. al., 2005), imunossupressão e traumas, estas mesmas bactérias isoladas poderão se tornar patogênicas (HUCHZERMEYER, 2003; SANTORO et al., 2006; DICKINSON et al., 2001; ORÓS et al. 2005; FERRONATO, 2009), causando sérios danos ao indivíduo ou até mesmo a uma população, podendo ser consideradas como uma das maiores causas de declínio em populações selvagens de répteis (SCHUMACHER, 2006).

Em adição, segundo Charruau et al. (2012), o carreamento destas bactérias aos humanos e aos animais domésticos também pode causar riscos de septicemia, ocorrendo geralmente por três vias: consumo de carne obtida através da caça ilegal (MAGNINO et al., 2009); por mordidas (WAMISHO et al., 2009; HADDAD JUNIOR, CAMPOS NETO, MENDES, 2013), sendo que a vítima pode sofrer infecções causadas por vários microrganismos, particularmente bactérias Gram-negativas, refletindo a flora oral do animal (ZANCOLLI et al., 2015; KEENAN et al., 2015; ABRAHAMIAN; GOLDSTEIN, 2011; SARTAIN; STEELE, 2009); e durante a utilização das águas ocupadas por crocodilianos para atividades de lazer, tais como natação ou pesca (JOHNSTON et al., 2010; CONOVER, DUBOW, 1997), pois a microbiota oral destes animais também pode ser um reflexo direto do meio em que os mesmos vivem (SANTORO et al., 2006), e/ou um reflexo de uma série de interações entre o hospedeiro, o ambiente e a composição de sua dieta (presas) (KEENAN et al., 2015).

Estudos anteriores realizados por Blaylock (1999), Kunitomo et al. (2004), Schumacher (2006) e Brook (2009), descreveram algumas das bactérias que podem participar desses processos, tais como *Aeromonas* sp, *Pseudomonas* sp, *Serratia* sp, *Citrobacter*

diversus, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium* sp, *Proteus* ssp, *Salmonella* sp, *Edwardsiella tarda*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus* sp, *Streptococcus pyogenes*, *Fusobacterium* sp, *Hafniae alvei*, *Pasteurella* sp e *Klebsiella* sp. Da mesma forma, para ambas as áreas de estudo, este experimento observou uma maior quantidade de enterobactérias Gram-negativas (*Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*, *Edwardsiella tarda*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Hafniae alvei*, *Proteus mirabilis*, *Proteus stuartii*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella paratyphi*, *Serratia* sp e *Klebsiella pneumoniae*), além de um Bacilo Gram-negativo (*Pseudomonas aeruginosa*) para ambas as áreas e de um Baciliforme aeróbio Gram-positivo (*Corynebacterium* sp) para a área de Angatuba.

Esses achados podem ser considerados comuns, visto que microrganismos pertencentes a Família Enterobacteriaceae têm sido os mais observados e os mais estudados dentre todos os grupos das bactérias, e que, embora estejam mais associados ao sistema digestório, principalmente aos intestinos dos mamíferos, muitos deles também podem ser encontrados em ambientes aquáticos e terrestres, associados com plantas e outros hospedeiros animais (FRANCINO et al., 2006).

Não obstante, os ambientes aquáticos das áreas de estudo deste experimento claramente sofrem contaminação por dejetos animais, quer de natureza humana ou de animais domésticos e selvagens. Na área de Angatuba/SP, os reservatórios de água utilizados pelos jacarés-de-papo-amarelo, tais como açudes ou lagos, servem de fonte de bebida para o gado bovino, aves domésticas e animais de vida livre, que constantemente defecam em seus entornos, ou até mesmo dentro deles. Já na área de Cubatão/SP, pertencente a Bacia Hidrográfica da Baixada Santista, além dos animais selvagens, uma outra fonte de contaminação a ser considerada é o despejo de esgoto lançado diretamente nos rios, principalmente o efluente doméstico das casas das populações ribeirinhas (Figura 24), fato que também favorece a presença de enterobactérias em grande número.

Figura 24 - Casas de Ribeirinhos com lançamento de efluentes domésticos diretamente em corpo de água na Bacia Hidrográfica da Baixada Santista

Fonte: o autor

Neste contexto, o simples reconhecimento das bactérias que ocupam estes ambientes, na necessidade de instalação de tratamento frente a ocorrência de processos infecciosos torna-se de pouca valia, principalmente em relação a escolha de antimicrobianos para a solução destes casos, pois sabidamente, muitas bactérias podem ser sensíveis a alguns desses fármacos, porém, segundo Charrual et al. (2012), algumas cepas ou espécies de bactérias podem não ser afetadas, ou simplesmente demonstrarem resistência aos mesmos através de vários mecanismos primários, que podem atuar de forma individual ou múltipla. Desta forma, a realização de experimentos envolvendo testes de perfil de susceptibilidade provem melhores resultados e informações importantes em relação à escolha dos antimicrobianos, devendo ser realizados antes do início de qualquer tratamento (BASSETTI; VERDADE, 2014), sendo de grande relevância clínica (CUSHING et al., 2011).

Destes mecanismos primários, talvez o principal seja o resultado de um processo evolutivo de contra-ataque a um antimicrobiano ou a uma classe específica. Este processo é considerado um fenômeno natural, embora seja constantemente acelerado por algumas atividades humanas (PONTES et al., 2009), aumentando a habilidade da bactéria em

desenvolver resistência aos agentes antimicrobianos e também sua capacidade em proliferar (TENOVER, 2001), dando origem a um grande número de progênes resistentes com um baixo custo de fitness, gerando cepas com maior capacidade de sobrevivência ou virulência (LIVERMORE, 2003). Essas atividades humanas estão basicamente ligadas ao uso indiscriminado de antimicrobianos, incluindo os de amplo espectro, gerando uma enorme disseminação de patógenos antibiótico-resistentes (PALLECCHI et al., 2013), sendo que esta pressão seletiva tem promovido a evolução e propagação destes genes, independentemente de sua origem (ALLEN et al., 2010).

A prática constante de utilização de antimicrobianos na área de saúde humana ou animal não é um processo novo, sendo amplamente disseminado nas terapias para o tratamento de doenças microbianas, ou através da prescrição de sub doses terapêuticas para agirem como promotores de crescimento em animais de produção (TORANZO et al., 1994), sendo que a maioria destes antimicrobianos são excretados inalterados no meio ambiente (ZHANG et al., 2009), saturando o planeta com estes agentes (DAVIES; DAVIES, 2010). Esse processo deve ser encarado como um grave problema de saúde pública (SINGER; WARD; MALDONADO, 2006) principalmente em áreas que envolvam ecossistemas aquáticos, pois um grande número de microrganismos hospedeiros de genes resistentes (*r genes*) tem se disseminado entre as populações de bactérias do solo e da água (HACIOGLU; TOSUNOGLU, 2014).

Porém, vários outros mecanismos participam deste processo de aquisição de resistência, sendo que alguns são muito eficazes em relação aos antimicrobianos testados, como é o caso da alteração da permeabilidade da membrana celular externa das bactérias. Esse mecanismo é frequentemente mediado pelas porinas, proteínas responsáveis por estabelecimento de canais pelos quais algumas substâncias são transportadas para o espaço periplasmático, adentrando para o interior da célula (influxo), ou de forma inversa (bomba de efluxo), atuando na expulsão de produtos residuais (NIKAIDO, 1994) e de moléculas de antibióticos (MARÍN; GUDIOL, 2003), deixando a concentração desses fármacos em um limiar abaixo da concentração tóxica no interior da célula (WALSH; WRIGHT, 2005). Ainda em relação à permeabilidade da membrana celular externa, existe outro mecanismo responsável por uma resistência intrínseca, que é a limitação de permeabilidade através de uma alteração em uma porina específica, diminuindo o diâmetro do canal de passagem, impedindo o antimicrobiano de se difundir e atingir seu alvo. Este é um dos mecanismos utilizados pelos bacilos Gram-negativos contra os antimicrobianos β -lactâmicos,

aminoglicosídeos, cloranfenicol, tetraciclina, macrolídeos, sulfametaxazol/trimetropin e a clindamicina.

Outro mecanismo utilizado é a modificação ou alteração do alvo do antibiótico, impedindo que o mesmo exerça qualquer efeito bactericida. O processo ocorre através da mutação dos elementos de ligação, como é o caso das proteínas ligadoras de penicilina (PLP), ou PBP (*Penicillin Binding Proteins*), ou por reprogramação das vias biossintéticas (WRIGHT, 2005).

E por fim, a síntese de enzimas, que seletivamente modificam o alvo e destroem a atividade dos antimicrobianos. Esse mecanismo é especialmente importante nos casos envolvendo patógenos Gram-negativos, principalmente em relação à classe dos antimicrobianos β -lactâmicos, pois estes quimioterápicos constituem a família mais numerosa e são os mais utilizados na prática clínica (MARÍN; GUDIOL, 2003), além de serem os mais prescritos para animais devido a sua ampla margem de segurança, pelas propriedades farmacocinéticas favoráveis e pelo amplo espectro de atividade contra uma grande parte dos patógenos animais (TROTT, 2013). O mais importante mecanismo de resistência bacteriana frente a esta classe é a produção das β -lactamases, que são enzimas catalíticas de origem proteica, que atuam rompendo o anel betalactâmico dos antimicrobianos, fazendo com que percam sua capacidade em unir-se às proteínas ligadoras de penicilina. Sua produção pode ocorrer de forma contínua ou ser induzida pela presença de uma substância β -lactâmica, sendo controlada por ação de um gene, quer cromossômico ou transferidos por plasmídeos ou transposons (MARÍN; GUDIOL, 2003), o que pode explicar a grande resistência apresentada pelos isolados frente a esta classe farmacológica neste experimento. A exceção neste estudo foi uma cefalosporina de terceira geração (Ceftiofur), exclusiva da linha veterinária, que apresenta um menor intervalo de uso quando comparado aos antimicrobianos desta classe, o que, por hipótese, pode explicar o baixo número de cepas resistentes ao mesmo.

3.5 Conclusão

Este estudo apresentou as primeiras informações sobre a microbiota oral e a eficácia dos antimicrobianos testados nas amostras coletadas em jacarés-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) de vida livre, podendo ser relevantes para a conservação da espécie, através da manutenção do estado sanitário dos indivíduos ou das populações estudadas.

Ainda neste aspecto, considerando que o uso de antimicrobianos é um processo primário no tratamento de animais e pessoas, principalmente nos casos que envolvam infecções provocadas pela interação homem x jacarés-de-papo-amarelo x animais domésticos, para ambas as áreas de estudo, as quinolonas Enrofloxacina e Norfloxacina, além do aminoglicosídeo Gentamicina, são os antimicrobianos com menores índices de resistência frente aos isolados testados.

Referências

- ABRAHAMIAN, F.M.; GOLDSTEIN, E.J. Microbiology of animal bite wound infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 24, n. 2, p. 231-246, Apr. 2011.
- ALLEN, H.K.; DONATO, J.; WANG, H.H.; CLOUD-HANSEN, K.A.; DAVIES, J.; HANDELSMAN, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews**, London, v. 8, p. 251-259, 2010.
- ALLSTEAD, J.; LANG, J.W. Incubation temperature affects body size and energy reserves of hatchling American alligator (*Alligator mississippiensis*). **Physiological Zoology Journal**, Chicago, v. 68, p. 76-97. 1995.
- BAILEY, M.; HAVERSON, K.; INMAN, C.; HARRIS, C.; JONES, P.; CORFIELD, G.; MILLER, B.; STOKES, C. The influence of environment on development of the mucosal immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 108, p. 189-198, 2005.
- BASSETTI, L.A.B.; VERDADE, L.M. Crocodylia. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. (Ed.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2014. cap. 13, p. 154-169.
- BLAYLOCK, R.S. Antibiotic use and infection in snakebite victims. **South African Medical Journal**, Cape Town, v. 89, p. 874-876, 1999.
- BOLTON, M. La explotación del cocodrilo en cautividad. In: FAO. **Guía FAO conservación**. Roma: FAO, 1994.
- BORGES, W.R.; BRAGA JÚNIOR, J.C.; TORRES, F.R. **O que você precisa saber sobre Cubatão**. Cubatão: Design & Print; Arquivo Histórico Municipal de Cubatão, 2002. 30 p.
- BRITES, V.L.C. **Hematologia, bioquímica de sangue, parasitologia, microbiologia, algas epizoárias e histopatologia de *Phrynosoma geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudinata, Chelidae), expostos a diferentes influências antrópicas no rio Uberabinha, Minas Gerais**. 2002. 196 p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.
- BROOK, I. Management of human and animal bite wound infection: an overview. **Current Infectious Diseases Report**, Philadelphia, v. 11, p. 389-395, 2009.

CHABRECK, R. Methods of capturing, marking and sexing alligators. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE SOUTHEASTERN ASSOCIATION OF GAME AND FISH COMMISSIONERS, 1963, Hot Springs. **Proceedings...** Hot Springs: [s.n], 1963. p. 45-50.

CHARRUAU, P.; PÉREZ-FLORES, J.; PÉREZ-JUÁREZ, J.G.; CEDEÑO-VASQUEZ, J.R.; ROSAS-CARMONA, R. Oral and cloacal microflora of wild crocodiles *Crocodylus acutus* and *C. moreletii* in the Mexican Caribbean. **Diseases of Aquatic Organisms**, Amelinghausen, v. 98, p. 27-29, 2012.

CONOVER, M.R.; DUBOW, T.J. Alligator attacks on humans in the United States. **Herpetological Review**, Lawrence, v. 28, p. 120-124, 1997.

CUSHING, A.; PINBOROUGH, M.; STANFORD, M. Review of bacterial and fungal culture and sensitivity results from reptilian samples submitted to a UK laboratory. **Veterinary Record**, London, v. 169, p. 390, 2011.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 73, n. 3, p. 417-433, 2010.

DICKINSON, V.M.; DUCK, T.; SCHWALBE, C.R.; JARCHOW, J.L.; TRUEBLOOD, M.H. Nasal and cloacal bacteria in free-ranging desert tortoises from the Western United States. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 37, n. 2, p. 252-257, 2001.

DIXON, J.R.; YANOSKY, A. A microchip marking system for identification of caiman hatchlings. **Bulletin of the Maryland Herpetological Society**, Baltimore. v. 29, n. 8, p. 156-159, 1999.

DOMINGUES, E.N. **Estudo dos processos geomorfológicos do escoamento fluvial e evolução de vertentes na Serra do Cubatão, Serra do Mar – SP**. 1983. 153 p. Dissertação (Mestrado em Geografia Física) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1983.

FERREIRA, C.C.; TORRES, F.R.; BORGES, W.R. **Cubatão: caminhos da história**. Cubatão: Desing & Print, 2008. 98 p.

FERRONATO, B.O.; MARQUES, T.S.; SOUZA, F.L.; VERDADE, L.M.; MATUSHIMA, E.R. Oral bacterial microbiota and traumatic injuries of free-ranging *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae) in southeastern Brazil. **Phyllomedusa**, Piracicaba, v. 8, n. 1, p. 19-25, 2009.

FRANCINO, M.P.; SANTOS, S.R.; OCHMAN, H. Phylogenetic relationships of bacteria with special reference to endosymbionts and enteric species. **The Prokaryotes**, New York, v. 6, p. 41-59, 2006.

GIBBONS, J.W.; SCOTT, D.E.; RYAN, T.J.; BUHLMANN, K.A.; TUBERVILLE, T.D.; METTS, B.S.; GREENE, J.L.; MILLS, T.; LEIDEN, Y.; POPPY, S.; WINNE, C.T. The global decline of reptiles, déjà vu amphibians. **Bioscience**, Washington, v. 50, n. 8, p. 653-666, 2005.

HACIOGLU, N.; TOSUNOGLU, M. Determination of antimicrobial and heavy metal resistance profiles of some bacteria isolated from aquatic amphibian and reptile species. **Environmental and Monitoring Assessment**, Dordrecht, v. 186, p. 407-413, 2014.

HADDAD JUNIOR, V.; CAMPOS NETO, M. F.; MENDES, A.L. Mordeduras de animais (selvagens e domésticos) e humanas. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 1, p. 13-19, 2013.

HUCHZERMEYER, F.W. **Crocodiles: biology, husbandry and diseases**. Wallingford: CABI Publ., 2003. 352 p.

HUTTON, J.M.; LOVERIDGE, J.P.; BLAKE, D.K. Capture methods for the Nile crocodile in Zimbabwe. In: WEBB, G.J.; MANOLIS, S.C.; WHITEHEAD, P.J. (Ed.). **Wildlife management: crocodiles and alligators**. Chipping Norton: Surrey Beatty, 1987. p. 211-216.

JOHNSTON, M.A.; PORTER, D.E.; RHODES, G.I.; WEBSTER, L.F. Isolation of faecal coliform bacteria from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, p. 965-973, 2010.

KEENAN, S.W.; ELSEY, R.M. The good, the bad, and the unknown: microbial symbioses of the American alligator. **Integrative and Comparative Biology**, Mclean, v. 55, n. 6, p. 1-14, 2015.

KEENAN, S.W.; ENGEL, A.S.; ELSEY, R.M. The alligator gut microbiome and implications for archosaur symbioses. **Scientific Reports**, London, v. 3, n. 2877, p. 1-7, 2013.

KUNIMOTO, D.; RENNIE, R.; CITRON, D.M.; GOLDSTEIN, E.J.C. Bacteriology of a bear bite wound to a human: case report. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 3374-3376, 2004.

LISBOA, M.A.M. **A política dos coronéis e a difusão do ensino primário em Angatuba/SP (1870-1930)**. 2008. 204 p. Tese (Doutorado em Educação) – Faculdade de Educação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

LIVERMORE, D.M. Bacterial resistance: origins, epidemiology and impact. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 33, p. 11-23, 2003.

LIVERMORE, D.M.; WINSTANLEY, T.G.; SHANNON, K.P. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 48, p. 87-102, 2001.

LUIZ-SILVA, W.; MATOS, R.H.R.; KRISTOCH, G.C. Geoquímica e índice de geoacumulação de mercúrio em sedimentos de superfície do estuário de Santos-Cubatão (SP). **Revista Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 753-756. 2002.

MAGNINO, S.; COLIN, P.B.; DEI-CASC, E.; MADSEN, M.; McLAUHLIN, J.; NOCKLER, K.F.; MARADONA, M.P.G.; TSIGARIDA, E.; VANOPDENBOSCH, E.; PETEGHEM, C.V. Biological risks associated with consumption of reptile products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 134, p. 163-175, July 2009.

MARÍN, M., GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 21, n. 1, p. 42-55, 2003.

MESQUITA, L.C.A. **Avaliação ecotoxicológica e caracterização química em águas superficiais do Rio Cubatão, SP**. 2011. 103 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear-Aplicações) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

NIKAIDO, H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 269, n. 6., p. 3605-3908, 1994.

ORÓS, J.; TORRENT, A.; CALABUIG, P.; DÉNIZ, S. Diseases and causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands, Spain (1998-2001). **Diseases of Aquatic Organisms**, Amelinghausen, v. 63, n. 5, p. 1678-1680, 2005.

PALLECCHI, L.; BARTOLONI, A.; PARADISE, F.; ROSSOLINI, G.M. Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use. In: TOMASZ, A. **Microbial drug resistance**. Bratislava: Future Medicine, 2013. chap. 8, p. 123-134.

PONTES, D.S.; PINHEIRO, F.A.; LIMA-BITTENCOURT, C.I.; GUEDES, R.L.M.; CURSINO, L.; BARBOSA, F.; SANTOS, F.R.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A.M.A. Multiple antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria from natural oligotrophic lake under distinct anthropogenic influence in a tropical region. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, p. 762-772, 2009.

SANTORO, M.; HERNANDEZ, G.; CABALLERO, M. Aerobic bacterial flora of nesting green turtles (*Chelonia mydas*) from Tortuguero National Park, Costa Rica. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 37, p. 549-552, 2006.

SARTAIN, S.E.; STEELE, R.W. An alligator bite. **Clinical Pediatrics**, Thousand Oaks, v. 48, n. 5, p. 564-567, 2009. Disponível em: <<http://cpj.sagepub.com>>. Acesso em: 08 jul. 2014.

SCHUMACHER, J. Selected infectious diseases of wild reptiles and amphibians. **Journal of Exotic Pet Medicine**, New York, v. 15, n. 1, p. 18-24, 2006.

SINGER, R.S., WARD, M.P., MALDONADO, G. Can landscape ecology untangle the complexity of antibiotic resistance? **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, p. 943-952, 2006.

TENOVER, F.C. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 33, p. S108-115, 2001.

TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H.; STEPÁNKOVÁ, R.; HUDCOVIC, T.; TUCKOVÁ, L.; CUKROWSKA, B.; LODINOVÁ-ZÁDNÍKOVÁ, R.; KOZÁKOVÁ, H.; ROSSMANN, P.; BÁRTOVÁ, J.; SOKOL, D.; FUNDA, D.P.; BOROVSKÁ, D.; REHÁKOVÁ, Z.; SINKORA, J.; HOFMAN, J.; DRASTICH, P.; KOKESOVÁ, A. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 93, p. 97-108, 2004.

TORANZO, A.E., CUTRÍN, J.M., ROBERSON, B.S., NUÑEZ, S., ABELL, J.M. Comparison of the taxonomy, serology, drug resistance transfer and virulence of *Citrobacter freundii*, strains from mammals and poikilothermic hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 6, p. 1789-1797, 1994.

TROTT, D. β -lactam resistance in gram-negative pathogens isolated from animals. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, v. 19, p. 239-249, 2013.

WALSH, B.P. Crocodile capture techniques in the Northern territory of Australia. In: WEBB, G.J.; MANOLIS, S.C.; WHITEHEAD, P.J. (Ed.). **Wildlife management**: crocodiles and alligators. Chipping Norton: Surrey Beatty, 1987. p. 249-252.

WALSH, C.T.; WRIGHT, G. Introduction: antibiotic resistance. **Chemical Reviews**, Washington, v. 105, n. 2, p. 392-393, 2005.

WAMISHO, B.L.; BATES, J.; TOMPKINS, M.; ISLAM, R.; NYAMULANI, N.; NGULUBE, C.; MKANDAWIRE, N.C. Ward round: crocodile bites in Malawi: microbiology and surgical management. **Malawi Medical Journal**, Lilongwe, v. 21, p. 29-31, 2009.

WRIGHT, G.D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Review**, Amsterdam, v. 57, p. 1451-1470, 2005.

ZANCOLLI, G.; MAHSBERG, D.; SICKEL, W.; KELLER, A. Reptiles as reservoirs of bacterial infections: real threat or methodological bias? **Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 70, n. 3, p. 1-6, 2015.

ZHANG, X.; ZHANG, T.; FANG, H.H.P. Antibiotic resistance genes in water environment. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, v. 82, p. 397-414, 2009.