

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
CAMPUS PLANALTINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

Fábio José Viana Costa

Modelos multi-isotópicos para rastreamento geográfico de animais traficados

Brasília

2019

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
CAMPUS PLANALTINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

Fábio José Viana Costa

Modelos multi-isotópicos para rastreamento geográfico de animais traficados

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade de Brasília, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Ambientais.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Gabriela Bielefeld Nardoto
Co-orientador: Prof. Dr. Michael B. Wunder

Brasília

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C F119 Costa, Fabio Jose Viana
Modelos multi-isotópicos para rastreamento geográfico de
animais traficados / Fabio Jose Viana Costa; orientador
Gabriela Bielefeld Nardoto; co-orientador Michael Brent
Wunder. -- Brasília, 2019.
115 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Ambientais) --
Universidade de Brasília, 2019.

1. atribuição geográfica. 2. isótopos estáveis. 3.
modelos isotópicos espaciais. 4. tráfico de animais. I.
Nardoto, Gabriela Bielefeld, orient. II. Wunder, Michael
Brent, co-orient. III. Título.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
CAMPUS PLANALTINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

Fábio José Viana Costa

Modelos multi-isotópicos para rastreamento geográfico de animais traficados

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ludgero Cardoso Galli Vieira / PPG-CA - UnB (Presidente)

Prof. Dr. André de Camargo Guaraldo - UFJF

Prof. Dr. Ricardo Bomfim Machado - UnB

Prof. Dr. Rodrigo Diana Navarro - UnB

Dedico aos meus pais, irmãs, filhos e sobrinhos,

E a todos os meus professores e mestres

“Deixe o mundo um pouco melhor do que encontrou.”

Lord Robert Baden Powell

Agradecimentos

À minha orientadora, Gabriela Bielefeld Nardoto, pelo exemplo de vibração com a ciência e muitas frutíferas conversas!

Aos professores Michael B. Wunder e Keith Hobson.

Aos professores Antônio Felipe e Renato Caparroz.

Ao colega e amigo de pós-graduação João Paulo Sena-Souza.

Aos outros colegas e amigos que me apoiaram nos trabalhos de campo e em diversos outros momentos, Gislaine, Cássia, Nina, Jéssica, Giovanna, Kisaka, Flávia e Carlos.

À equipe do EIS, Vinícius Vasco, Glauber, Fabio Santos, Ray e Vinícius Pomper.

À Fernanda Aquino pelo auxílio no laboratório.

À Juliana Ribeiro, Fernando Rodrigues e demais voluntários que cederam amostras de mamíferos de suas coleções.

Aos Peritos Criminais Federais Carlos Benigno, Jorge Lambert, Guilherme de Miranda, Rodrigo Mayrink e colegas da APMA. Aos demais Peritos Criminais Federais e servidores da PF que apoiaram essa realização.

À Polícia Federal, pela liberação para a realização do doutorado e apoio logístico às saídas de campo.

À fazenda Tabapuã dos Pireneus, fazenda Barranco Alto e fazenda Piuval por ceder suas estruturas para os trabalhos de campo.

Aos Parques Nacionais Chapada das Mesas, Chapada dos Guimarães e Emas por liberar as entradas para os trabalhos de campo.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). A presente tese foi desenvolvida sob a autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) nº 8745-1 e do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) nº de cadastro A018ECD.

Ao Comitê de Ética de Uso Animal (aprovação nº 55712/2016).

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade de Brasília.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado-sanduíche no exterior (Código Financeiro 001).

À CAPES pelo apoio financeiro ao projeto dada pelo programa Pró-Forenses (processo nº 23038.006832/2014-11)

E a todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

O comércio ilegal de produtos da vida selvagem é um problema mundial e afeta diretamente a conservação da biodiversidade. O desconhecimento das rotas de tráfico e a necessidade de destinação de animais apreendidos, demandam avanços metodológicos para auxiliar de forma mais eficaz a detecção da sua origem. Tecnologias recentes analisam marcadores presentes em amostras de tecidos de animais capturados em uma única ocasião, ou apreendidos, e que são utilizados como indicativos da região de origem. Neste contexto, os isótopos estáveis de carbono, nitrogênio e oxigênio, mostram padrões de distribuição espacial de processos biogeoquímicos e ecológicos, que vêm sendo utilizados como rastreadores ambientais. Os padrões espaciais podem ser apresentados em mapas, chamados de isoscapes. Este trabalho teve como objetivo desenvolver novas abordagens metodológicas usando isótopos estáveis como ferramenta para a aplicação no rastreamento geográfico, no contexto do tráfico de animais. Foi feita uma revisão dos princípios biogeoquímicos relacionados ao uso de isótopos de oxigênio, carbono e nitrogênio como indicadores geográficos e as principais metodologias existentes para empregá-los em atribuição (testes de procedência). O canário-da-terra (*Sicalis flaveola*) foi utilizado como modelo de ave residente, para verificar a amplitude da variação temporal nas razões isotópicas de oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) usando tecidos com diferentes tempos de renovação, como sangue e pena. Os períodos de muda do canário-da-terra foram estimados. Utilizando amostras de pelos de mamíferos, foi desenvolvido um modelo regional de isocape de $\delta^{18}\text{O}$ para o Cerrado e Pantanal. Por fim, foi desenvolvido um método de atribuição multi-isotópica para avaliação da acurácia e da precisão de diferentes modelos de calibração de dados de amostras de origem conhecidas e da utilização de um, dois ou três isótopos para atribuição. A variação temporal de $\delta^{18}\text{O}$ do sangue do canário-da-terra mostrou-se ampla e relação com variáveis climáticas, sendo um bom indicador para rastreamento da marcada sazonalidade ambiental do Cerrado. A análise das penas mostrou que um curto período de muda, está relacionado a uma menor variação no $\delta^{18}\text{O}$. O $\delta^{18}\text{O}$ das penas foi cerca de 2,5‰ inferior à do sangue total, que é referente à taxa de conversão tecido-tecido. A isocape de $\delta^{18}\text{O}$ de pelos de mamíferos no Cerrado e Pantanal apresentou amplitude de 6‰ e apresentou padrão longitudinal bem marcado. O fato de mamíferos atropelados, bem como espécimes de museus, serem facilmente amostrados, possuir ampla distribuição na região e serem residentes, o uso de pelos de mamíferos mostrou-se uma boa alternativa como referência para a variação geográfica de $\delta^{18}\text{O}$ na região estudada. O conhecimento das variações temporais e variabilidade espacial de $\delta^{18}\text{O}$, em conjunto com o método de atribuição multi-isotópica, proporcionaram um aprimoramento regional na utilização de isótopos estáveis como ferramenta de atribuição geográfica no contexto do tráfico de animais no Brasil, podendo auxiliar na destinação de animais apreendidos e clarear aspectos da atividade ilegal, como locais preferenciais de captura de animais e rotas do tráfico.

Palavras-chave: atribuição geográfica, isótopos estáveis, modelos isotópicos espaciais, tráfico de animais

Abstract

The illegal wildlife trade (IWT) is a global issue and directly affects biodiversity. The lack of knowledge about traffic routes and the need to give a destination to confiscated animals require methodological advances to more effectively support the detection of IWT animals origin. New technologies use tissue markers as indicative of the seized items region of origin, which allow obtaining spatial and ecological distribution data of samples collected from individuals captured on a single occasion. In this context, the stable isotopes of carbon, nitrogen, and oxygen show patterns of the spatial distribution of biogeochemical and ecological processes and have been used as environmental trackers that can be presented on maps, called isoscapes. This work aimed to develop new methodological approaches using stable isotopes as a tool for geographic tracking, in the context of animal trafficking. A review of the biogeochemical principles related to the use of oxygen, carbon, and nitrogen isotopes as geographic indicators and the methodologies to use them in the assignment (provenance tests) was done. The Saffron Finch (*Sicalis flaveola*) was used as a resident bird model to verify the amplitude of temporal variation in oxygen isotope ratios ($\delta^{18}\text{O}$) using tissues with different turnover, as blood and feathers. Molt periods was also estimated for the Saffron Finch. A regional $\delta^{18}\text{O}$ isoscape model was developed for the Cerrado and Pantanal using mammal hair samples. Finally, a multi-isotopic method was developed to evaluate the accuracy and precision of known origin samples assignment, using different calibration models and one, two, or three isotopes. The temporal variation of $\delta^{18}\text{O}$ of the Saffron Finch blood was wide and showed association with climatic variables, being a good tracer of the marked environmental seasonality of the Cerrado. The feathers analysis showed that a short period of molting is related to smaller variations in $\delta^{18}\text{O}$. The $\delta^{18}\text{O}$ of the feathers was about 2.5 ‰ lower than that of the whole blood, which is referred to as the tissue-to-tissue conversion rate. The mammal hair $\delta^{18}\text{O}$ isoscape for the Cerrado and Pantanal showed a 6‰ amplitude and presented a well-marked longitudinal pattern. Road-killed mammals and museum specimens are easily sampled, have wide distribution, and are residents, which make the use of mammalian hair a good alternative for $\delta^{18}\text{O}$ geographic variation reference in the studied region. The association of the temporal and spatial variations of $\delta^{18}\text{O}$ associated with the multi-isotopic assignment method provided a regional improvement in the use of stable isotopes as a geographic assignment tool in the context of IWT in Brazil, which may help in the animal's destination and clarify IWT aspects, such as poaching preferred locations and trading routes.

Keywords: animal trafficking, geographical assignment, isoscapes, stable isotopes

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. ESTRUTURA DA TESE	16
3. PRINCIPAIS RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
5. REFERÊNCIAS.....	22
CAPÍTULO 1 - DETERMINAÇÃO DA ORIGEM GEOGRÁFICA DE VESTÍGIOS UTILIZANDO ISÓTOPOS ESTÁVEIS: BASE CIENTÍFICA E POTENCIAL DE USO NO BRASIL	27
CAPÍTULO 2 – LINKING ENVIRONMENTAL INDICATORS TO $\delta^{18}\text{O}$ IN THE SAFFRON FINCH (<i>SICALIS FLAVEOLA</i>) TISSUES IN THE CENTRAL BRAZILIAN SAVANNAS.....	56
CAPÍTULO 3 – A REGIONAL OXYGEN ISOSCAPE IN THE NEOTROPICS USING MAMMAL HAIR.....	81
CAPÍTULO 4 – ACCURACY AND PRECISION SENSITIVITY FOR MULTI-ISOTOPIC GEOGRAPHICAL ASSIGNMENT TEST	104
(SE VOCÊ CHEGOU ATÉ AQUI.....)	115

1. Introdução

Esqueletos de araras vermelhas provenientes de florestas tropicais foram encontradas em sítios arqueológicos no deserto do Novo México (estado do sudoeste dos Estados Unidos) a pelo menos 2.000 quilômetros ao norte de seus locais de origem. Indivíduos e suas penas eram provavelmente utilizadas em cerimônias religiosas na região há cerca de 1.000 anos. No entanto, como essas aves chegaram lá ainda é um mistério, mas provavelmente, existiam centros de reprodução na região, fora de seus ambientes naturais (George et al. 2018). Essas evidências demonstram o uso e comércio de animais por seres humanos há bastante tempo.

Atualmente, o comércio ilegal de produtos da vida selvagem gera bilhões de dólares em receita ilícita anualmente no mundo (Wyler e Sheikh 2008) e reconhecendo o seu impacto mundial, em 2015, a Assembleia Geral das Nações Unidas adotou uma resolução para combatê-lo. Dentre os objetivos de desenvolvimento sustentável dessa resolução, uma das metas específicas é tomar medidas urgentes para acabar com a caça e o tráfico de espécies protegidas da flora e da fauna e enfrentar tanto a demanda quanto o fornecimento de produtos selvagens ilegais (Osborn et al. 2015).

No Brasil, o impacto do tráfico de animais selvagens é uma das principais ameaças à biodiversidade. Cerca de 80% de todos os animais apreendidos são aves, principalmente pássaros canoros e papagaios (Destro et al. 2012). Há impactos diretos e indiretos decorrentes da retirada das espécies de seus habitats originais. As funções biológicas e ecológicas, como exemplo, de presas ou de predadores, de polinizadores ou dispersores de sementes, cumpridas por esses animais, tanto na população, como na comunidade, podem ser afetadas (Harrison 2011). Pode ocorrer deterioração da variabilidade genética em decorrência do reduzido número de indivíduos e consequente endogamia, aumentando os riscos de extinção (Frankham 1995). Outros efeitos negativos estão associados à propagação de doenças (Kock et al. 2016), maus-tratos aos animais (Ashley et al. 2014) e introdução de espécies exóticas (Carrete e Tella 2008).

Há elevado número de animais vivos e itens de origem animal apreendidos pelas autoridades todos os anos (Alves et al. 2012; Destro et al. 2012; Regueira e Bernard 2012). Animais,

plantas e partes apreendidos vêm de diferentes partes do mundo e são comercializados local ou globalmente (Regueira e Bernard 2012; Symes et al. 2018).

No tráfico de animais podem ser identificados três estágios principais: a extração da natureza, o beneficiamento em produtos e o uso dos produtos, como publicado no livro *Ciência Contra o Tráfico* – figura 1 (Costa 2017).

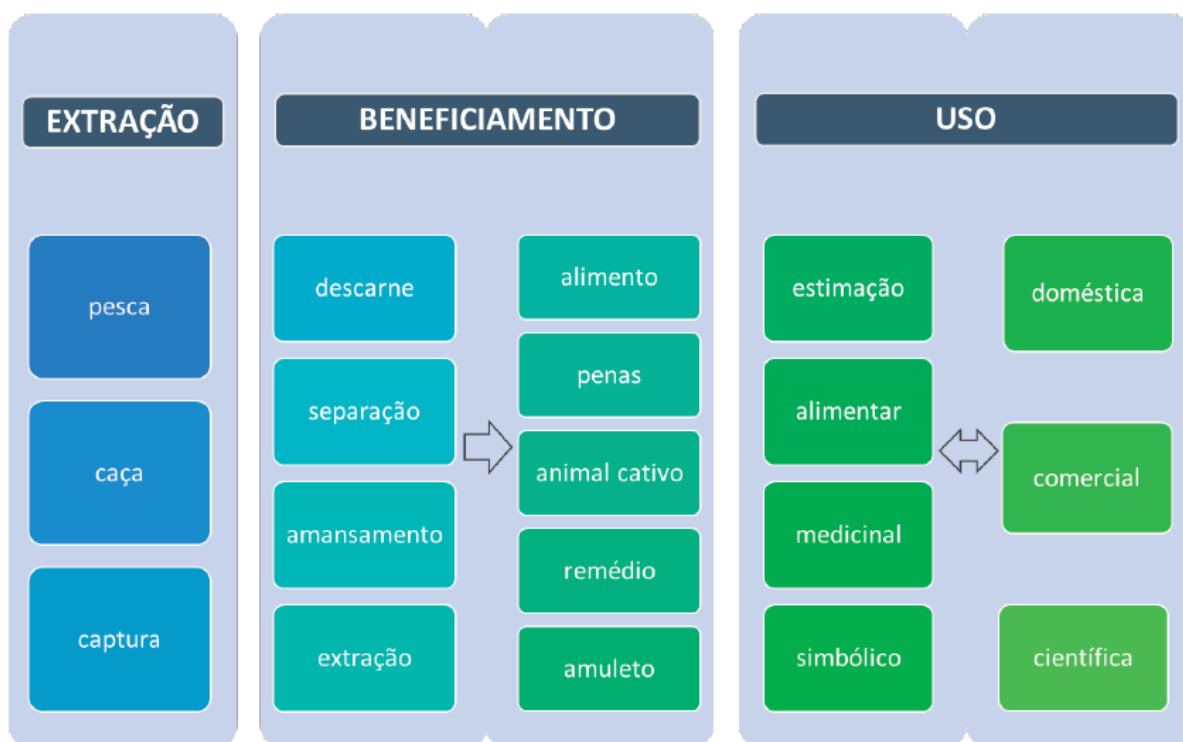


Figura 1 – Estágios envolvidos no tráfico de animais.

Especificamente, no caso da comercialização de aves vivas, o uso é para estimação. A finalidade desse uso é doméstica ou comercial, o tráfico propriamente dito, ou um misto dos dois e pode envolver diferentes escalas. Há intenso tráfico, tanto dentro do território Nacional, especialmente de aves de gaiola, quanto para fora do país, especialmente de psitacídeos. Dentro do país, tentativas de se estimar rotas de tráfico já foram feitas (Renctas 2001; Destro et al. 2012) no entanto, há indicativos de que os padrões de movimentações sejam ainda mais amplos. Em Costa et al. (2018) é apresentada uma síntese das publicações sobre o tráfico de animais no Brasil após a lei de crimes ambientais. Mesmo diante da maior atuação governamental após a promulgação da lei, observa-se que o problema ainda é evidente e cultural na população brasileira. A importância dos Psittaciformes e Passeriformes, citada na literatura, é corroborada. A importância numérica do canário-da-terra (*Sicalis flaveola*) como principal espécie alvo de tráfico é destaque. Evidencia-se ainda que as espécies ameaçadas, sobretudo

bicudo (*Sporophila maximiliani*), mutuns (*Crax blumenbachi* e *Crax fasciolata*), cardeal-amarelo (*Gubernatrix cristata*), pixoxó (*Sporophila frontalis*), pintassilgo-do-nordeste (*Spinus yarrellii*) e pintor-verdadeiro (*Tangara fastuosa*) são severamente impactadas pelo tráfico. Fica evidente a necessidade de uma compilação sistemática de dados de apreensão, em conjunto com dados gerados por novas metodologias genéticas e isotópicas, a fim de gerar informações sobre localidades de retirada de animais, entrepostos de comercialização e rotas de tráfico, para melhor direcionamento do trabalho da fiscalização.

Observa-se a ligação entre as espécies traficadas no Brasil e a criação amadorista de passeriformes (Destro et al. 2012). Nessa atividade ocorre “lavagem”, ou “esquentamento” de animais por meio de fraudes nas anilhas que os marcam individualmente. Essas anilhas são cadastradas em um sistema oficial – SISPASS, que controla a criação amadorista (Mayrink 2016). A utilização de intermediários, em que é possível dar uma aparência legal aos animais comercializados por meio de documentos de origem forjados é uma prática que ocorre em todo o mundo (Symes et al. 2018). Este cenário dificulta a obtenção de informações mais precisas sobre a origem geográfica, ou proveniência, de itens confiscados.

O grande número de indivíduos apreendidos resulta em outro problema: a destinação de animais vivos (Gray et al. 2017). Apesar da existência de diretrizes internacionais para a reintrodução (IUCN 2013) e para a devolução dos animais aos países exportadores (CITES 2016), estas recomendações técnicas nem sempre são facilmente cumpridas na prática. Há um vazio de regulamentos nacionais para a reintrodução de animais. Mesmo para aves ameaçadas, protocolos específicos ainda são necessários. Abrigos qualificados para receber e triar animais apreendidos não são suficientes para o seu grande número. A opinião pública é sempre em defesa ao bem-estar animal e a eutanásia de indivíduos justificados pela conservação é comumente criticada, mesmo para espécies exóticas (Bekoff e Ramp 2014). A soltura de animais em regiões inadequadas não é incomum (Gray et al. 2017).

O desconhecimento das reais rotas de tráfico de animais, a legalidade aparente aos animais dada por intermediários e a necessidade de correta destinação, demandam a necessidade de metodologias mais refinadas para auxiliar na detecção da origem dos animais ilegalmente comercializados. Algumas tecnologias recentes que analisam marcadores encontrados em amostras de tecidos já são utilizadas como indicativos da região de origem dos itens apreendidos (Manel et al. 2002; Bowen et al. 2005). Esses denominados marcadores endógenos permitem a obtenção de dados de distribuição espacial e ecológicos de amostras coletadas de indivíduos capturados em uma única ocasião (Rubenstein e Hobson 2004; Hobson 2008).

As razões isotópicas dos elementos como o carbono, nitrogênio, hidrogênio e oxigênio são incluídas nessa categoria de marcadores. Mapas que apresentam os padrões de distribuição espacial de isótopos estáveis têm sido denominados de *isoscapas*, e têm sido amplamente utilizados para rastrear processos biogeoquímicos em sistemas naturais e antrópicos. Sena-Souza et al. (2019) apresentam uma revisão sobre isoscapas, que têm o potencial de melhorar a disseminação e interpretação dos padrões espaciais de isótopos estáveis, aumentar a apropriação de resultados científicos por não-especialistas e melhorar a gestão de recursos naturais. No entanto, a abordagem de isoscapas não tem sido comumente usada em estudos realizados no Brasil. Isoscapas de oxigênio, hidrogênio, nitrogênio e carbono contribuem em áreas como migração animal, ciência forense, estudos hidrológicos e ecológicos em nível de população, comunidade e ecossistema, entre outros.

Como exemplo da utilização forense de isótopos como indicadores da origem geográfica de animais, plantas, humanos e outros itens, pode-se citar trabalhos evidenciando a origem geográfica da cocaína na América do Sul (Ehleringer et al. 2000a), a introdução de pragas com importância para a biossegurança (Holder et al. 2014), a origem do leite (Chesson et al. 2010), cerveja (Carter et al. 2015a) e café (Carter et al. 2015b) para controle de qualidade de alimentos (Camin et al. 2016). Especificamente, sua aplicação ao tráfico de animais já foi usada com sucesso. Como exemplos, foi possível discriminar entre duas regiões de origem de aves apreendidas no Reino Unido (Kelly et al. 2008) e determinar a origem de marfim de elefantes na África (Cerling et al. 2006, 2007).

A variação geográfica da razão isotópica de determinado elemento está relacionada a mecanismos biogeoquímicos específicos, de forma que representam diferentes aspectos ambientais. Assim, para isótopos de H e O, a variação está relacionada sobretudo aos ciclos de evaporação e condensação da água precipitada, o que resulta em gradações desde a umidade evaporada dos oceanos ao interior do continente (Fry 2006).

Os isótopos estáveis de eleição para estabelecer vínculos espaciais a partir de materiais orgânicos são os dos elementos da água, hidrogênio (H) e oxigênio (O). A razão entre o isótopo mais pesado e o mais leve do hidrogênio presente nas penas das aves e nas asas de borboletas estão altamente correlacionadas com a razão isotópica do hidrogênio da precipitação das localidades em que esses tecidos se formaram (Hobson e Wassenaar 1997; Wassenaar e Hobson 1998). Mais tarde, descobriu-se que a razão dos isótopos estáveis de hidrogênio da água da torneira e o cabelo humano formado na mesma localidade também apresentam forte correlação (Ehleringer et al. 2008). Esses estudos deram origem a uma série de outros utilizando a variação ambiental desses isótopos ao longo da geografia.

Os isótopos estáveis de carbono (C) e nitrogênio (N) têm sido mais frequentemente associados a estudos do nicho ecológico de animais (Newsome et al. 2007) do que a determinação de origem. No entanto, a utilização destes como marcadores geográficos tem sido feita para tecidos

vegetais, como exemplos de aplicações para a origem de drogas, como maconha (Shibuya et al. 2006) e cocaína (Ehleringer et al. 2000b) e madeira, mas também com animais, como aves (García-Pérez e Hobson 2014) e elefantes (Cerling et al. 2006).

Costa et al. (2019 - artigo aceito para publicação – capítulo 1 da tese) apresentam os princípios biogeoquímicos para utilização de isótopos estáveis como marcadores geográficos e apresenta a metodologias para referenciar indivíduos ou vestígios examinados às suas regiões de origem, que tem sido denominada na literatura internacional pelo termo, do inglês, “*assignment*”, no português, rastreamento ou atribuição (Wunder e Norris 2008). O artigo mostra que a metodologia utilizada para atribuição é ampla, utilizando modernas ferramentas de estatística multivariada (Rundel et al. 2013; Bowen et al. 2014). Adicionalmente, demonstra o emprego de múltiplos isótopos em modelos de atribuição, o que permite agregar informações ecológicas diferentes e resultados espaciais mais refinados (Chabot et al. 2012; Rundel et al. 2013; Font et al. 2015) e propõe a utilização de variáveis ambientais associadas aos dados isotópicos para construção de isoscapes regionais específicas.

O valor isotópico relacionado à localização geográfica é incorporada ao tecido animal por meio da alimentação ou da água ingerida (Nardoto et al. 2017). Quando um indivíduo se alimenta ou ingere água, parte dos elementos que constituem esse alimento, ou água, será absorvido pelo organismo, incorporando-se aos seus tecidos. É importante conhecer previamente a taxa de renovação (ou “turnover”) específica do tecido estudado, e com isso, o tempo que a razão isotópica dos diferentes elementos (C, N, O, H) levam desde a sua ingestão pelo organismo até a sua incorporação em cada tecido e subsequente excreção (Hobson e Clark 1992). No caso dos mamíferos, células hepáticas e sanguíneas são as que se renovam mais rapidamente, enquanto as células de tecidos musculares e pelo são as mais lentas (Tieszen et al. 1983). Além disso, estas taxas também podem variar ao longo da ontogenia e de acordo com as condições a que o indivíduo está sujeito (e.g.: estresse hídrico e nutricional).

Penas, pelos, garras e unhas animais são tecidos de queratina metabolicamente inertes. Refletem as razões isotópicas da dieta no momento em que foram formadas (Pearson et al. 2003). As penas se formam durante a muda, que em geral ocorre uma vez ao ano (Pyle et al. 2008), o cabelo humano se desenvolve cerca de 1 cm por mês (Ehleringer et al. 2008) e as unhas apresentam crescimento lento e contínuo (Bearhop et al. 2002).

Conhecendo-se a taxa de renovação do tecido, podem ser feitas interpretações isotópicas temporais do vestígio analisado. Quando se estuda aves migratórias, por exemplo, sabe-se que a pena analisada foi trocada nos locais de veraneio ou de invernada e as inferências sobre sua origem baseiam-se no conhecimento sobre a fenologia das mudas (Hobson et al. 2012).

Diante desse contexto, esta tese teve como objetivo desenvolver novas abordagens metodológicas para o uso de isótopos estáveis como marcadores geográficos regionais como ferramenta para a aplicação no rastreamento geográfico no contexto do tráfico de animais, podendo auxiliar na destinação de animais apreendidos, clareando aspectos da atividade ilegal, como locais preferenciais de captura de animais e rotas do tráfico.

2. Estrutura da tese

A tese foi dividida em quatro capítulos, conforme ilustrado na figura 2 e descrito a seguir.

No capítulo 1, foi feita uma revisão dos princípios biogeoquímicos relacionados ao uso de isótopos de oxigênio, carbono, nitrogênio e estrôncio como indicadores geográficos e as principais metodologias existentes para empregá-los em atribuição, ou em testes de procedência. Nele são apontadas as principais lacunas para aplicações nos diferentes contextos forenses em que seria necessária a informação da origem de vestígios, como de animais, de humanos, de madeira ilegal, de drogas ilícitas e de alimentos. Neste capítulo também há explicações básicas sobre a notação delta utilizada com isótopos estáveis, fracionamento isotópico e a escala utilizada para os resultados isotópicos (permil - ‰), importantes para o entendimento do restante do texto.

No capítulo 2, foi utilizado o canário-da-terra (*Sicalis flaveola*) como modelo de ave residente, para elucidar como se daria a variação temporal nas razões isotópicas de oxigênio em tecidos animais metabolicamente ativos, como o sangue, e inativos, como as penas, em uma localidade. Foi avaliado como essa variação temporal se correlaciona com variáveis ambientais e com a muda efetuada pelas aves.

No capítulo 3, foi desenvolvido um modelo regional de isoscape de $\delta^{18}\text{O}$ para o Cerrado e Pantanal brasileiros utilizando amostras de pelos de mamíferos.

No capítulo 4, foi desenvolvido um método para avaliação da acurácia e da precisão de diferentes métodos de calibração de dados de amostras de origem conhecidas e da utilização de um, dois ou três isótopos para testes de atribuição.

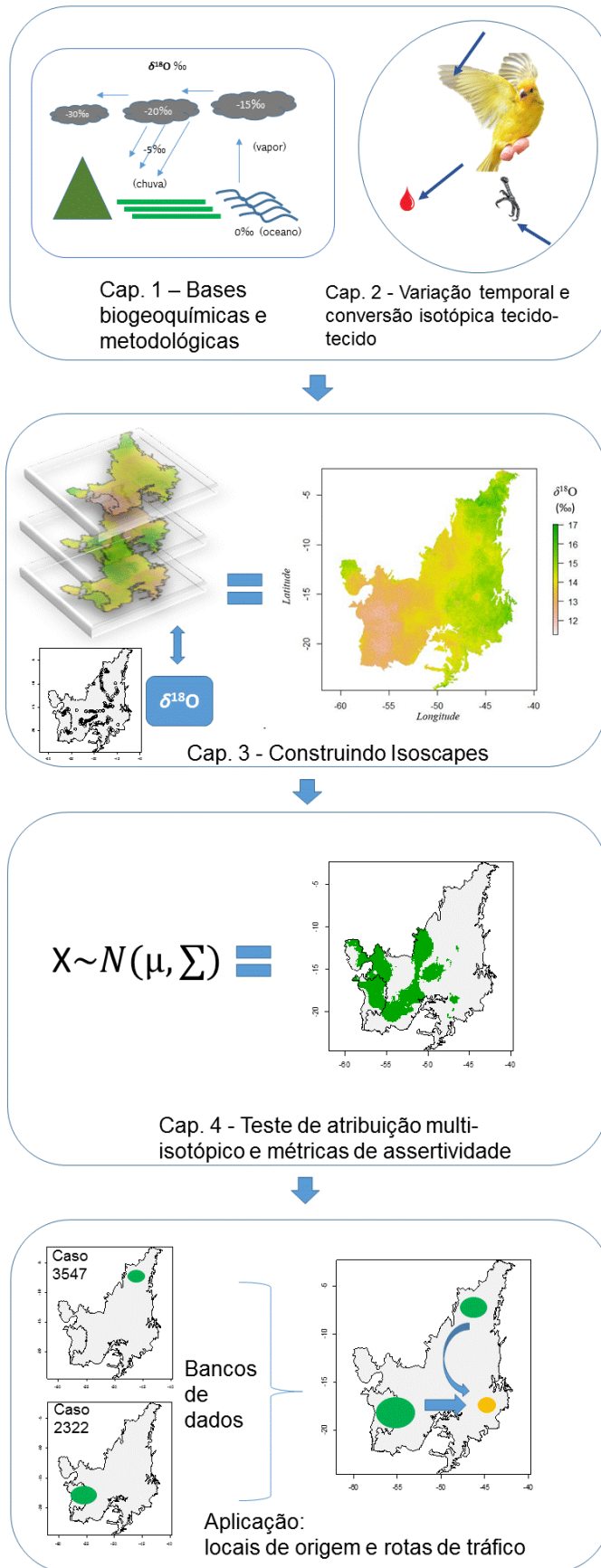


Figura 2 – Estrutura da tese.

3. Principais resultados e discussão

A variação temporal de $\delta^{18}\text{O}$ do sangue do canário apresenta ampla variação e os seus tecidos refletem variáveis climáticas, rastreando mudanças ambientais ao longo do tempo. Isso permite tecer considerações sobre aspectos ecológicos da espécie, relacionada às épocas de muda, já que um curto período de muda, reflete em menor variação isotópica e relacionada à característica não migratória ou residente do pássaro.

As variáveis climáticas preditoras apresentam-se como uma boa explicação para a variação nos valores de $\delta^{18}\text{O}$ do sangue do canário. Consideradas importantes no melhor modelo (umidade, insolação, velocidade do vento, precipitação e temperatura), elas são capazes de influenciar nas diversas etapas relacionadas ao fracionamento do oxigênio, como na evaporação da água ingerida, na evapotranspiração das plantas e na termorregulação e evaporação hídrica nos animais.

A análise da muda mostra que as penas da asa de indivíduos adultos do canário-da-terra possuem um período de muda melhor definido que penas de outras partes do corpo, trocando marcadamente após o período reprodutivo. A variação de $\delta^{18}\text{O}$ dessas penas apresenta também menor variação. A explicação para isso é de que as penas incorporam o sinal isotópico referente a um período curto, e, portanto, com menor variação temporal.

As penas do canário-da-terra apresentaram um $\delta^{18}\text{O}$ 2,5‰ inferior à do sangue total. Conforme sugere Vander Zanden et al. (2015), a análise isotópica de tecidos com tempo de formação diferente permite a compreensão da incorporação isotópica em múltiplas escalas temporais. Tecidos metabolicamente inertes, como penas, pelos e unhas, mantêm permanentes as assinaturas isotópicas do momento de sua síntese, enquanto tecidos metabolicamente ativos, como sangue e pele, mudam sua composição à medida que são renovados. O conhecimento da taxa de conversão permite a comparação entre tecidos e a obtenção de informações referentes a diferentes períodos ou diferentes localizações para um mesmo indivíduo.

Diversos processos são sugeridos para explicar essa variação nos diferentes sistemas biológicos. O $\delta^{18}\text{O}$ é incorporado a partir da água consumida (água líquida ou água pré-formada dos alimentos), dos alimentos (água metabólica) e da respiração. Como alimento na base da cadeia alimentar, o valor isotópico da água nas plantas vai depender da evapotranspiração de cada espécie, que por sua vez vai depender da umidade e outros fatores climáticos. A proporção de água ingerida pode variar de acordo com a fisiologia, já que alguns animais possuem menor necessidade de ingestão de água e uma parte da água pode ser originada dos alimentos. No organismo, o oxigênio reage com diferentes substâncias, como proteínas, carboidratos e gorduras, o que gera gás carbônico e água como

resíduos. Essa água liberada é a água metabólica, que possui composição isotópica diferente da água ingerida. A evaporação nos pulmões e através da pele também fraciona a água do organismo, alterando a sua composição. A composição isotópica de $\delta^{18}\text{O}$ dos tecidos vai ser relacionada à composição isotópica da água corpórea, que por sua vez vai variar em função desses fatores (Bryant e Froelich 1995).

Fatores climáticos, por sua vez, interferem nos mecanismos fisiológicos de homeostase da temperatura e da osmolaridade dos organismos, afetando as razões isotópicas de oxigênio dos tecidos (Abeni et al. 2015). Estudos relatam que animais maiores são mais propensos a ingerir mais água do que pequenos animais (Bryant e Froelich 1995), e o clima também pode afetar a ingestão de água (Abeni et al. 2015). Animais adaptados a habitats secos ingerem menos água do que animais em habitats úmidos (Bryant e Froelich 1995).

A variação espacial de $\delta^{18}\text{O}$ de pelos de mamíferos no Cerrado e Pantanal brasileiros, demonstrada no capítulo 3, também está correlacionada com variáveis ambientais, como temperatura, volume de precipitação, vapor de água, altitude e produtividade primária bruta. A isoscape de $\delta^{18}\text{O}$ de pelos proposta, refletiria então, tanto processos físicos, como biológicos, que por sua vez estão relacionados com a composição da água disponível e evaporação hídrica das plantas e animais consumidos, e água metabólica.

A amostragem de pelos de mamíferos do Cerrado e Pantanal é pioneira no Brasil, trazendo dados que refinam regionalmente informações sobre a distribuição isotópica. Estudos utilizando isoscapes regionais são uma tendência mundial (Vander Zanden et al. 2018, West et al 2014), já que os modelos globais são preditos a partir de uma escala maior que acabam por subdimensionar a variabilidade regional (Sena-Sousa et al. 2019, West et al. 2014). A amplitude isotópica na isoscape de $\delta^{18}\text{O}$ mostrou-se suficiente para sua utilização como marcador geográfico no Cerrado. Para aplicação em atribuição entre os diferentes grupos de espécies, funções de calibração entre a isoscape e valores teciduais precisam ser estimados para cada grupo. Alguns aperfeiçoamentos ainda podem ser feitos a partir da melhora da representatividade das amostras de origem conhecida, do melhor conhecimento do metabolismo do oxigênio nas espécies estudadas.

Para a aplicação de testes de atribuição na prática do contexto forense, é necessário que sejam apresentadas métricas com relação à confiabilidade do resultado que está sendo apresentado. Assim, de posse de uma determinada amostra questionada, o resultado laboratorial deve ser atribuído à suposta região de origem. No entanto, é necessário saber quantas amostras são atribuídas corretamente (acurácia) e quanto da área total testada pode ser excluída (precisão), ou simultaneamente, as duas perguntas. Como exemplo, quando se considera o limite de exclusão de 50%

da área total do Cerrado (precisão), qual seria a porcentagem de acertos esperado para o modelo utilizado (acurácia)?

Portanto, o arcabouço para utilização de isótopos estáveis como ferramenta de atribuição geográfica no contexto do tráfico de animais no Brasil é resultado desta tese. Diante da apreensão de um canário-da-terra, a análise isotópica do seu sangue representaria época recente (cerca de um mês) e da pena da asa, a época da última muda (que pode ser atual ou de até um ano atrás). Sangue e pena poderiam ser analisados tanto para $\delta^{18}\text{O}$ como para $\delta^{15}\text{N}$, e a atribuição feita com base nessas duas análises. Os testes retornariam superfícies probabilísticas. De modo comparativo, a comparação dos resultados tecidos produzidos em épocas distintas torna possível inferir se houve deslocamento da ave no tempo decorrente entre a muda e a apreensão.

Os resultados das áreas probabilísticas de origem, explicitados em forma de mapas, podem ser interpretados e refinados à luz de informações biológicas e investigativas complementares. As áreas de ocorrência ou de maior abundância natural do animal são mais prováveis de originar indivíduos. Os resultados de atribuição isotópica do grupo, em uma mesma apreensão, podem fortalecer os resultados encontrados individualmente. Outras informações geográficas, como presença de estradas e outros meios de transporte que facilitariam o deslocamento, mostram áreas mais acessíveis. Bancos de dados podem proporcionar a reunião e interpretação de casos independentes, de forma que um sistema de armazenamento de informações entre os diferentes casos possa ser integrado, de forma a resultar em informações processadas sobre a atividade ilegal sobre o tráfico de animais, como rotas de tráfico, locais de captura e de destino de animais traficados. A estruturação em banco de dados como esse segue a tendência mundial (Pauli et al. 2017) e aproveita a vantagem dos resultados isotópicos poderem ser comparados entre si, por seguir padrões internacionais.

4. Considerações finais

Se há fontes de variação local de valores isotópicos maiores do que a variação espacial na região estudada, provavelmente esse isótopo será menos útil como forma de rastreador espacial. Assim, a variação temporal isotópica local encontrada no canário-da-terra, a princípio um fator de confusão para os modelos espaciais, na realidade apresenta-se como uma oportunidade de refinamento dos modelos espaciais. A ampliação do conhecimento dos ciclos anuais dos animais e a disponibilidade de séries temporais de dados climáticos podem delimitar janelas temporais para a utilização de modelos espaciais específicos e mais compatíveis com o tecido analisado.

O Cerrado e o Pantanal foram os biomas utilizados como prova de conceito para a modelagem da distribuição geográfica de isótopos. Os resultados aqui exibidos mostram que estes biomas apresentam variabilidade suficiente em $\delta^{18}\text{O}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ para a serem utilizados em atribuição, o que ainda não havia sido testado para o Brasil. As métricas de acurácia e precisão aqui apresentadas revelam os limites para a utilização dessa informação. Os princípios metodológicos sugeridos aqui podem ser ainda expandidos para outras regiões, como a Amazônia, a Caatinga e a Mata Atlântica.

A utilização de atribuição multi-isotópica mostrou-se vantajosa, melhorando os resultados com dois, em relação ao uso de apenas um isótopo. Futuros estudos com a razão isotópica de estrôncio ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$) podem agregar mais informações espaciais para melhorar os resultados dos testes de atribuição. O Sr biodisponível é resultado da integração de variadas fontes (rocha mãe, água e fontes atmosféricas) que são resultantes de interações nas escalas de tempo ecológica e geológica.

Outros aperfeiçoamentos ainda podem ser feitos, ampliando a representatividade da amostragem territorial e conhecendo como as diferentes espécies incorporam isótopos de $\delta^{18}\text{O}$. O emprego de análises isotópicas específicas para compostos específicos, como aminoácidos ou ácidos graxos, podem desvendar inúmeros aspectos referentes à incorporação de diferentes aminoácidos nos tecidos clareando aspectos como conversão isotópica entre tecidos e diferentes fontes de contribuição de água para os organismos.

5. Referências

- Abeni F, Petrera F, Capelletti M, et al (2015) Hydrogen and oxygen stable isotope fractionation in body fluid compartments of dairy cattle according to season, farm, breed, and reproductive stage. *PLoS One* 10:e0127391. doi: 10.1371/journal.pone.0127391
- Alves RRN, De Farias Lima JR, Araujo HFP (2012) The live bird trade in Brazil and its conservation implications: an overview. *Bird Conserv Int* 1–13. doi: 10.1017/S095927091200010X
- Ashley S, Brown S, Ledford J, et al (2014) Morbidity and Mortality of Invertebrates, Amphibians, Reptiles, and Mammals at a Major Exotic Companion Animal Wholesaler. *J Appl Anim Welf Sci* 17:308–321. doi: 10.1080/10888705.2014.918511
- Bearhop S, Waldron S, Votier SC, Furness RW (2002) Factors that influence assimilation rates and fractionation of nitrogen and carbon stable isotopes in avian blood and feathers. *Physiol Biochem Zool* 75:451–458. doi: 10.1086/342800
- Bekoff M, Ramp D (2014) Cruel to be kind? *New Sci* 222:26–27. doi: 10.1016/S0262-4079(14)61210-0
- Bowen GJ, Liu Z, Vander Zanden HB, et al (2014) Geographic assignment with stable isotopes in IsoMAP. *Methods Ecol Evol* 5:201–206. doi: 10.1111/2041-210X.12147
- Bowen GJ, Wassenaar LI, Hobson KA (2005) Global application of stable hydrogen and oxygen isotopes to wildlife forensics. *Oecologia* 143:337–48. doi: 10.1007/s00442-004-1813-y
- Bryant JD, Froelich PN (1995) A model of oxygen isotope fractionation in body water of large mammals. *Geochim Cosmochim Acta* 59:4523–4537. doi: 10.1016/0016-7037(95)00250-4
- Camin F, Bontempo L, Perini M, Piasentier E (2016) Stable Isotope Ratio Analysis for Assessing the Authenticity of Food of Animal Origin. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15:868–877
- Carrete M, Tella JL (2008) Wild-bird trade and exotic invasions: A new link of conservation concern? *Front Ecol Environ* 6:207–211. doi: 10.1890/070075
- Carter JF, Yates HSA, Tinggi U (2015a) A global survey of the stable isotope and chemical compositions of bottled and canned beers as a guide to authenticity. *Sci Justice* 55:18–26. doi: 10.1016/j.scijus.2014.05.002
- Carter JF, Yates HSA, Tinggi U (2015b) Isotopic and Elemental Composition of Roasted Coffee as a Guide to Authenticity and Origin. *J Agric Food Chem* 63:5771–5779. doi: 10.1021/acs.jafc.5b01526
- Cerling TE, Omondi P, Macharia AN (2007) Diets of Kenyan elephants from stable isotopes and the origin of confiscated ivory in Kenya. *Afr J Ecol* 45:614–623. doi: 10.1111/j.1365-

2028.2007.00784.x

- Cerling TE, Wittemyer G, Rasmussen HB, et al (2006) Stable isotopes in elephant hair document migration patterns and diet changes. *PNAS* 103:371–373. doi: 10.1073/pnas.0509606102
- Chabot AA, Hobson KA, van Wilgenburg SL, et al (2012) Advances in linking wintering migrant birds to their breeding-ground origins using combined analyses of genetic and stable isotope markers. *PLoS One* 7:. doi: 10.1371/journal.pone.0043627
- Chesson LA, Valenzuela LO, O’Grady SP, et al (2010) Hydrogen and Oxygen Stable Isotope Ratios of Milk in the United States. *J Agric Food Chem* 58:2358–2363. doi: 10.1021/jf904151c
- CITES (2016) CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA - Committee II - Disposal of illegally traded and confiscated specimens of Appendix-I, -II and –III species. In: Seventeenth meeting of the Conference of the Parties. p 28
- Costa FJV (2017) Atualizações sobre o Tráfico de Animais no Brasil. In: *Ciencia Contra o Tráfico: Avanços no combate ao comércio ilegal de animais silvestres*. p 252
- Costa FJV, Ribeiro RE, De Souza CA, Navarro RD (2018) Espécies de Aves Traficadas no Brasil. *Front J Soc Technol Environ Sci* 7:324–346. doi: 10.21664/2238-8869.2018v7i2.p324-346
- Destro GFG, Lucena T, Monti R, et al (2012) Efforts to Combat Wild Animals Trafficking in Brazil. *Biodivers Enrich a Divers World* 1542:33–36. doi: 10.5772/48351
- Ehleringer JR, Bowen GJ, Chesson L a., et al (2008) Hydrogen and oxygen isotope ratios in human hair are related to geography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2788–2793. doi: DOI 10.1073/pnas.0712228105
- Ehleringer JR, Casale JF, Lott MJ, Ford VL (2000b) Tracing the geographical origin of cocaine: Cocaine carries a chemical fingerprint from the region where the coca was grown. *Nature* 408:311–312. doi: 10.1038/35042680
- Ehleringer JR, Casale JF, Lott MJ, Ford VL (2000a) Tracing the geographical origin of cocaine. *Nature* 408:311–312. doi: 10.1038/35042680
- Font L, Jonker G, Van Aalderen PA, et al (2015) Provenancing of unidentified World War II casualties: Application of strontium and oxygen isotope analysis in tooth enamel. *Sci Justice* 55:10–17. doi: 10.1016/j.scijus.2014.02.005
- Frankham R (1995) Conservation Genetics. *Annu Rev Genet* 29:305–327. doi: 10.1146/annurev.ge.29.120195.001513
- Fry B (2006) *Stable Isotope Ecology*. Springer Science+Business Media, New York
- García-Pérez B, Hobson KA (2014) A multi-isotope ($\delta^2\text{H}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) approach to establishing migratory connectivity of Barn Swallow (*Hirundo rustica*). *Ecosphere* 5:1–12. doi:

10.3161/000164514X682896

- George RJ, Plog S, Watson AS, et al (2018) Archaeogenomic evidence from the southwestern US points to a pre-Hispanic scarlet macaw breeding colony. *Proc Natl Acad Sci* 115:8740–8745. doi: 10.1073/pnas.1805856115
- Gray TNE, Marx N, Khem V, et al (2017) Holistic management of live animals confiscated from illegal wildlife trade. doi: 10.1111/1365-2664.12916
- Harrison RD (2011) Emptying the Forest: Hunting and the Extirpation of Wildlife from Tropical Nature Reserves. *Bioscience* 61:919–924. doi: 10.1525/bio.2011.61.11.11
- Hobson KA (2008) Using endogenous and exogenous markers in bird conservation. *Bird Conserv Int* 18:S174–S199. doi: 10.1017/S0959270908000361
- Hobson KA, Clark RG (1992) Assessing Avian Diets Using Stable Isotopes I: Turnover of ^{13}C in Tissues. *Condor* 94:181–188. doi: 10.2307/1368807
- Hobson KA, Van Wilgenburg SL, Wassenaar LI, Larson K (2012) Linking hydrogen ($\delta^2\text{H}$) isotopes in feathers and precipitation: Sources of variance and consequences for assignment to isoscapes. *PLoS One* 7:e35137. doi: 10.1371/journal.pone.0035137
- Hobson KA, Wassenaar LI (1997) Linking breeding and wintering grounds of neotropical migrant songbirds using stable hydrogen isotopic analysis of feathers. *Oecologia* 109:142–148. doi: 10.1007/s004420050068
- Holder PW, Armstrong K, Van Hale R, et al (2014) Isotopes and trace elements as natal origin markers of *Helicoverpa armigera* - An experimental model for biosecurity pests. *PLoS One* 9:1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0092384
- IUCN/SSC (2013) Guidelines for Reintroductions and Other Conservation Translocations. Version 1.0.
- Kelly A, Thompson R, Newton J (2008) Stable hydrogen isotope analysis as a method to identify illegally trapped songbirds. *Sci Justice* 48:67–70. doi: 10.1016/j.scijus.2007.09.012
- Kock RA, Woodford MH, Rossiter PB (2016) Disease risks associated with the translocation of wildlife. *Rev Sci Tech l'OIE* 29:329–350. doi: 10.20506/rst.29.2.1980
- Manel S, Berthier P, Luikart G (2002) Detecting wildlife poaching: Identifying the origin of individuals with Bayesian assignment tests and multilocus genotypes. *Conserv Biol* 16:650–659. doi: 10.1046/j.1523-1739.2002.00576.x
- Mayrink RR (2016) Exame pericial para detecção de fraudes em anilhas oficiais de passeriformes : uma ferramenta para o combate ao tráfico de animais silvestres. Universidade Federal de Santa Catarina
- Nardoto GB, Ribeiro JF, Sena-Souza JP, et al (2017) Rastreamento Forense: Uso dos Isótopos Estáveis

no Combate ao Crime. In: Costa FJVC, Ferreira JM, Monteiro KRG, Maytink RR (eds) *Ciência contra o tráfico: Avanços no combate ao comércio ilegal de animais silvestres*. Imprell, João Pessoa, pp 51–78

- Newsome SD, Rio, Martinez del C, Bearhop S, Phillips DL (2007) A Niche for Isotope Ecology. *Front Ecol Environ* 5:429–436. doi: 10.1890/060150.01
- Osborn D, Cutter A, Ullah F (2015) Universal Sustainable Development Goals: Understanding the transformational challenge for developed countries. *Univers Sustain Dev Goals* 1–24
- Pauli JN, Newsome SD, Cook JA, et al (2017) Opinion: Why we need a centralized repository for isotopic data. *Proc Natl Acad Sci* 114:2997–3001. doi: 10.1073/pnas.1701742114
- Pearson SF, Levey DJ, Greenberg CH, Del Rio CM (2003) Effects of elemental composition on the incorporation of dietary nitrogen and carbon isotopic signatures in an omnivorous songbird. *Oecologia* 135:516–523
- Pyle P, Jones SL, Ruth JM (2008) Molt and aging criteria for four North American grassland passerines. *Biol Tech Publ* 19
- Regueira RFS, Bernard E (2012) Wildlife sinks: Quantifying the impact of illegal bird trade in street markets in Brazil. *Biol Conserv* 149:16–22. doi: 10.1016/j.biocon.2012.02.009
- Renctas (2001) 1º Relatório sobre o tráfico Nacional de Animais Silvestres. *Rede Nac Combat ao Tráfico Animais Silvestres* 40
- Rubenstein DR, Hobson KA (2004) From birds to butterflies: Animal movement patterns and stable isotopes. *Trends Ecol Evol* 19:256–263. doi: 10.1016/j.tree.2004.03.017
- Rundel CW, Wunder MB, Alvarado AH, et al (2013) Novel statistical methods for integrating genetic and stable isotope data to infer individual-level migratory connectivity. *Mol Ecol* 22:4163–4176. doi: 10.1111/mec.12393
- Sena-Souza JP, Costa FJV, Nardoto GB (2019) Background and the use of isoscapes in the Brazilian context: essential tool for isotope data interpretation and natural resource management. *Rev Ambient e Agua* 14:e2282. doi: 10.4136/1980-993X
- Shibuya EK, Souza Sarkis JE, Neto ON, et al (2006) Sourcing Brazilian marijuana by applying IRMS analysis to seized samples. *Forensic Sci Int* 160:35–43. doi: 10.1016/j.forsciint.2005.08.011
- Symes WS, McGrath FL, Rao M, Carrasco LR (2018) The gravity of wildlife trade. *Biol Conserv* 218:268–276. doi: 10.1016/j.biocon.2017.11.007
- Tieszen LL, Boutton TW, Tesdahl KG, Slade NA (1983) Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: Implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. *Oecologia* 57:32–37. doi: 10.1007/BF00379558
- Vander Zanden MJ, Clayton MK, Moody EK, et al (2015) Stable isotope turnover and half-life in

animal tissues: A literature synthesis. PLoS One 10:. doi: 10.1371/journal.pone.0116182

Vander Zanden HB, Nelson DM, Wunder MB, Conkling TJ, Katzner T (2018) Application of isoscapes to determine geographic origin of terrestrial wildlife for conservation and management. *Biological conservation*, 228, 268-280.

Wassenaar LI, Hobson KA (1998) Natal origins of migratory monarch butterflies at wintering colonies in Mexico: New isotopic evidence. *Proc Natl Acad Sci* 95:15436–15439. doi: 10.1073/pnas.95.26.15436

West AG, February EC, Bowen GJ (2014) Spatial analysis of hydrogen and oxygen stable isotopes (“isoscapes”) in ground water and tap water across South Africa. *J Geochemical Explor* 145:213–222. doi: 10.1016/j.gexplo.2014.06.009

Wunder MB, Norris DR (2008) Analysis and Design for Isotope-Based Studies of Migratory Animals. *Terr. Ecol.* 2:107–128

Wylter LS, Sheikh PA (2008) *International Illegal Trade in Wildlife: Threats and U. S. Policy*

Capítulo 1 - Determinação da origem geográfica de vestígios utilizando isótopos estáveis: base científica e potencial de uso no Brasil

Fábio José Viana Costa, João Paulo Sena-Souza, Gabriela Bielefeld Nardoto

O presente capítulo está aceito para publicação na próxima edição do periódico “Revista Brasileira de Ciências Policiais”.

Determinação da origem geográfica de vestígios utilizando isótopos estáveis: base científica e potencial de uso no Brasil

Fábio José Viana Costa

Polícia Federal, Instituto Nacional de Criminalística

Endereço: SAIS 07, lote 23 – Brasília – DF - CEP 70.610

Perito Criminal Federal, Doutorando em Ciências Ambientais, Mestre em Biologia Animal - UnB

João Paulo Sena-Souza

Universidade de Brasília, Pós-graduação em Ciências Ambientais, Faculdade UnB de Planaltina

Endereço: Área Universitária, 01, Vila Nossa S^a de Fátima – Planaltina – DF - CEP 73345-010

Doutorando em Ciências Ambientais, Mestre em Geografia - UnB

Gabriela Bielefeld Nardoto

Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas - Departamento de Ecologia

Endereço: Campus Universitário Darcy Ribeiro – IB - Brasília – DF - CEP 70910-900

Professora Adjunta, Doutora em Ecologia Aplicada - USP

Resumo

As ciências forenses baseiam-se na análise técnico-científica dos vestígios de crimes. A utilização de isótopos estáveis para determinação da origem geográfica de vestígios (atribuição isotópica) já é realizada em diversas partes do mundo e em variados contextos forenses. No presente artigo são apresentados os princípios biogeoquímicos e as metodologias utilizadas para atribuir amostras desconhecidas à sua origem geográfica utilizando isótopos estáveis. A aplicabilidade da ferramenta no contexto forense no Brasil é discutida para os seguintes vestígios: animais traficados, remanescentes humanos, madeira ilegal, drogas apreendidas e alimentos fraudados. Os modelos globais existentes podem ser aplicados no Brasil, sendo úteis para esclarecer algumas questões mais abrangentes. Para questões mais específicas recomenda-se utilizar as variáveis ambientais associadas aos dados isotópicos já existentes construindo isoscapes regionais específicas. Com a disponibilização dessas isoscapes, a metodologia de atribuição isotópica explicada neste artigo poderá ser amplamente explorada e resultar em modelos espaciais possíveis de serem aplicados especificamente no contexto forense brasileiro.

Palavras-chave: análise multi-isotópica, ciências forenses, perícia criminal, análise espacial, atribuição isotópica, tráfico de animais, desmatamento ilegal, pessoas desaparecidas, tráfico de drogas, alimentos adulterados

Determining the geographical origin of evidence using stable isotopes: scientific basis and potential use in Brazil

Abstract

Forensic sciences are based on tracing evidence using technical-scientific analysis. The use of stable isotopes to determine the geographical origin (assignment) of evidence has been widely spread in different parts of the world and in different forensic contexts. In this paper, isotopic biogeochemical principles and isotopic assignment methodologies are presented. Its applicability in the forensic context in Brazil is discussed in the following traces: trafficked animals, human remains, illegal wood, seized drugs, and fraudulent food. The existing global models can be applied in Brazil, being useful to clarify some broader questions. For more specific questions, it is recommended the associations between selected environmental variables and existing isotopic data to construct specific regional isoscapes. With the availability of these isoscapes, the isotopic attribution methodology described herein can be extensively explored resulting in spatial models that can be applied specifically in the Brazilian forensic context.

Key words: multi-isotopic analysis, forensic science, criminal expertise, spatial analysis, isotopic assignment, animal trafficking, illegal logging, missing persons, drug trafficking, adulterated foods

Determinación del origen geográfico de vestigios utilizando isótopos estables: base científica y potencial de uso en Brasil

Resumen

Las ciencias forenses se basan en análisis técnico-científico de los vestigios de crímenes. La utilización de isótopos estables para determinar el origen geográfico de vestigios (atribución) ya se hace en diversas partes del mundo y en variados contextos forenses. En el presente artículo se presentan los principios biogeoquímicos y las metodologías utilizadas para asignar muestras desconocidas a su origen geográfico utilizando isótopos estables. La aplicabilidad de la herramienta en el contexto forense en Brasil es discutida en los siguientes vestigios: animales traficados, remanentes humanos, madera ilegal, drogas incautadas y alimentos defraudados. Los modelos globales existentes pueden ser aplicados en Brasil, siendo útiles para aclarar algunas cuestiones más amplias. Para cuestiones más específicas se recomienda utilizar las variables ambientales en asociaciones con los datos isotópicos ya existentes construyendo isoscapes regionales específicas. Con la disponibilidad de estas isoscapes, la metodología de asignación isotópica explicada en este artículo podrá ser ampliamente explotada y

resultar em modelos espaciais possíveis de ser aplicados especificamente em o contexto brasileiro a médio prazo.

Palabras clave: análise multi-isotópica, ciências forenses, perícia criminal, análise espacial, atribuição isotópica, tráfico de animais, desmatamento ilegal, pessoas desaparecidas, tráfico de drogas, alimentos de qualidade

Introdução

As ciências forenses baseiam-se na análise técnico-científica dos vestígios de crimes (VELHO; GEISER; ESPINDULA, 2012). A individualização (qualidades do vestígio que permitem classificá-lo como semelhante somente a ele mesmo), identificação (qualidades do vestígio que permitem classificá-lo em uma categoria), transferência (troca de matéria entre intervenientes – princípio de Locard), associação (entre pessoas e locais de crime) e reconstrução (entendendo a sequência de eventos passados) dos vestígios têm sido os paradigmas dos exames periciais.

A associação de um vestígio com a sua fonte está relacionada a diferentes aspectos, como exemplo: (a) autoria, em que o autor do crime seria a fonte (ex. assinatura, voz, impressões papilares, DNA); (b) autenticidade, a fonte seria determinada fábrica (ex. relógios) e (c) origem geográfica, a fonte seria o local geográfico (ex. vinhos). Essa associação leva ao conceito de *procedência da fonte* (“source inference”) (KWAN, 1977), que é amplo e pode cobrir uma variedade de questões relacionadas ao item examinado e ao contexto em análise (GENTILE *et al.*, 2015).

Dentro da física, Inman e Rudin, 2002, propõem um arcabouço para a classificação de vestígios baseada na divisibilidade da matéria: “A matéria se divide em partes componentes menores quando força suficiente é aplicada. As partes componentes adquirirão características criadas pelo próprio processo de divisão e reterão propriedades físico-químicas da peça maior. Estendendo o aspecto físico de divisão da matéria, elementos químicos também deixam traços no material analisado resultantes da interação com a sua fonte.

Isótopos estáveis são marcadores governados por mecanismos biogeoquímicos. Nas reações entre substrato e produto, ocorre o fracionamento isotópico, em que o isótopo mais leve reage mais facilmente que o mais pesado, deixando assinaturas distintas nos materiais produzidos. O entendimento desses mecanismos torna possível a aplicação forense de isótopos estáveis, a exemplo de sua utilização já comum nos dias atuais para elucidar crimes e aceitação na justiça (EHLERINGER; MATHESON JR., 2010).

Quando se trata da origem geográfica na área forense utilizando isótopos estáveis, podem ser citados diversos casos, com materiais orgânicos e inorgânicos. São exemplos de materiais orgânicos analisados: animais e suas partes (CERLING *et al.*, 2006; HOBSON; WASSENAAR, 2018), investigação da região de origem da produção de drogas (EHLERINGER *et al.*, 2000; HURLEY; WEST; EHLERINGER, 2010; SHIBUYA *et al.*, 2006), origem de madeira ilegal (GORI; STRADIOTTI; CAMIN, 2018), reconstrução de histórias de indivíduos (EHLERINGER *et al.*, 2015; NARDOTO *et al.*, 2006) e inorgânicos: identificação de tintas utilizadas em arquivos confidenciais (CHESSON *et al.*, 2015), explosivos (GENTILE *et al.*, 2015) e análise de cena de crime (EHLERINGER *et al.*, 2015). O livro de Meier-Augenstein (2010) revisa a aplicação forense de isótopos estáveis como traçadores de materiais orgânicos e inorgânicos, incluindo tanto a base científica para a interpretação dos dados, com uma extensiva gama de exemplos.

Os isótopos estáveis de eleição para análise espacial de materiais orgânicos são os dos elementos da água, hidrogênio (H) e oxigênio (O). Sabe-se que a proporção entre o isótopo mais pesado e o mais leve do hidrogênio presente nas penas das aves e nas asas de borboletas estão altamente correlacionadas com os isótopos de hidrogênio da precipitação das localidades em que esses tecidos se formaram (HOBSON; WASSENAAR, 1997; WASSENAAR; HOBSON, 1998). Mais recentemente, descobriu-se que a proporção dos isótopos estáveis de hidrogênio da água da torneira e o cabelo humano formado na mesma localidade também apresentam forte correlação (EHLERINGER *et al.*, 2008). Esses estudos deram origem a uma série de outros utilizando a proporção dos isótopos estáveis de um mesmo elemento químico para atribuir por exemplo aves migratórias a suas regiões de origem (HOBSON; WASSENAAR, 2018), mas também em estudos forenses com seres humanos (EHLERINGER *et al.*, 2015).

Já os isótopos estáveis de carbono (C) e nitrogênio (N) têm sido mais frequentemente associados a estudos do nicho ecológico de animais (NEWSOME *et al.*, 2007) do que a determinação de origem geográfica. No entanto, a utilização destes como marcadores geográficos tem sido feita para tecidos vegetais, como exemplos de aplicações para a origem de drogas, como maconha (SHIBUYA *et al.*, 2006) e cocaína (EHLERINGER *et al.*, 2000) e madeira (KAGAWA; LEAVITT, 2010), mas também com animais, como aves (GARCÍA-PÉREZ; HOBSON, 2014) e elefantes (CERLING *et al.*, 2006).

Um outro elemento que vem sendo utilizado cada vez com mais frequência em estudos para determinação da origem geográfica, é o estrôncio (Sr). O Sr biodisponível é resultado da integração de variadas fontes (rocha mãe, água e fontes atmosféricas) que são resultantes de interações nas escalas de tempo ecológica e geológica. Isso tem sido mapeado em algumas regiões do mundo e

utilizado para estudos forenses de origem geográfica (BATAILLE *et al.*, 2014; BATAILLE; LAFFOON; BOWEN, 2012).

A possibilidade de atribuir indivíduos ou vestígios examinados às suas regiões de origem tem sido denominada na literatura internacional pelo termo, do inglês, “assignment”, no português atribuição (WUNDER; NORRIS, 2008). A metodologia utilizada para atribuição é ampla, utilizando modernas ferramentas de estatística multivariada (BOWEN *et al.* 2014; RUNDEL *et al.*, 2013).

No presente artigo são apresentados os princípios biogeoquímicos e as metodologias utilizadas para atribuir amostras desconhecidas à sua origem geográfica utilizando isótopos estáveis. Após isso, são apresentados contextos forenses de aplicação destas ferramentas e o potencial quanto à sua aplicabilidade no Brasil.

Bases biogeoquímicas

Isótopos são espécies de um mesmo elemento químico que apresentam variações no número de nêutrons em seu núcleo atômico, mantendo o mesmo número de prótons e elétrons. Quando não emitem radiação, são denominados de isótopos estáveis. Como por exemplo, o carbono (C), apresenta os isótopos estáveis ^{12}C e ^{13}C . O isótopo ^{12}C contém 6 prótons e 6 nêutrons no núcleo enquanto o isótopo ^{13}C possui 6 prótons, mas 7 nêutrons em seu núcleo. Desta forma o isótopo ^{12}C é mais leve que o isótopo ^{13}C , mais pesado por ter uma massa atômica maior. Naturalmente, os isótopos mais leves são muito mais abundantes na natureza do que os isótopos mais pesados. Desta forma usa-se a razão isotópica (R) entre eles, onde a R da amostra é comparada à R de um padrão internacional pré-definido para definir o valor de delta: $\delta = (R_{\text{amostra}} / R_{\text{padrão}} - 1)$ e multiplicado por 1000 para se obter um valor mais fácil de ser visualizado e comparado. R_{amostra} é a razão entre átomos mais pesados e mais leves de um mesmo elemento químico de uma determinada amostra. $R_{\text{padrão}}$ é a razão entre átomos mais pesados e mais leves de um padrão internacionalmente reconhecido. No caso do carbono, este padrão é a proporção isotópica de carbono encontrada no rostro de um cefalópode do Jurássico denominado “PeeDee Belemnite” (PDB), enquanto utiliza-se o ar atmosférico para o nitrogênio. Para o hidrogênio e oxigênio, o valor de referência internacional é o oxigênio da água do mar (VSMOW – “Vienna Standard Mean Ocean Water”). O valor R é, portanto, adimensional e seu valor é multiplicado por mil, criando uma notação chamada δ por mil (‰), que, no caso do carbono, por exemplo, pode ser expressa como ou $\delta^{13}\text{C}$ ou composição isotópica do carbono.

Isótopos leves e pesados, devido a processos biogeoquímicos e físicos, reagem de modo diferente, o que gera diferentes proporções deles em materiais ou ambiente, o que é chamado de fracionamento isotópico (FRY, 2006).

Para o hidrogênio e oxigênio, a evidente marcação geográfica apresentada pela composição isotópica destes elementos ($\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$, respectivamente) está relacionada à circulação atmosférica da água. À medida que o vapor do oceano se encaminha para o continente dando origem às chuvas, ocorre fracionamento, que é resultado da precipitação e evaporação diferenciais entre o isótopo mais pesado (precipita mais e evapora menos) e o mais leve (ficando cada vez mais predominante na atmosfera continental) (BAISDEN *et al.*, 2016). Isso gera diferenças entre as suas proporções à medida que a chuva avança ao interior do continente, marcando a origem geográfica da água da chuva. Esse efeito é denominado de continentalidade. Outros efeitos marcantes são temperatura e elevação. As regiões de maiores latitudes e maiores altitudes no planeta apresentam-se bastante evidenciadas em mapeamentos isotópicos globais, apresentando maior fracionamento e razões isotópicas mais baixas (BOWEN, 2010). A água disponível em cada local, apresenta diferentes razões isotópicas e isso é incorporado nos tecidos quando a água é ingerida (EHLERINGER *et al.*, 2008).

Já a variação na composição isotópica de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) reflete o tipo de fotossíntese utilizado pelas plantas (tipo C_3 , em geral leguminosas, árvores e arbustos, e tipo C_4 , em geral gramíneas tropicais como a cana-de-açúcar, milho e as utilizadas para forragem). O $\delta^{13}\text{C}$ das plantas C_3 varia entre -34‰ e -24‰ e as do tipo C_4 varia entre -15‰ e -11‰ (FARQUHAR; EHLERINGER; HUBICK, 1989). A diferente faixa de variação entre C_3 e C_4 é bastante evidente, não havendo sobreposição entre elas, o que torna fácil a diferenciação entre plantas C_3 e C_4 como fontes alimentares. O $\delta^{13}\text{C}$ das plantas consumidas pelos animais é mantido nos tecidos dos animais herbívoros, que por sua vez é mantido pelos seus predadores, de modo que é possível rastrear a base da alimentação ao longo da cadeia alimentar, uma vez que este processo de assimilação e incorporação nos tecidos (exceto o tecido adiposo), praticamente não altera o valor do $\delta^{13}\text{C}$ das plantas que foram consumidas. Utilizar o $\delta^{13}\text{C}$ como marcador geográfico de animais e humanos, está relacionado com a disponibilidade de plantas C_3 ou C_4 em uma determinada região e com o quanto cada tipo de planta será a base de consumo de toda a cadeia alimentar. Isso pode variar de espécie para espécie, dependendo das preferências alimentares, ou de região para região, de acordo com a distribuição espacial de plantas C_3 ou C_4 .

Levando em consideração somente o grupo de plantas C_3 , sabe-se que pode haver variação de $\delta^{13}\text{C}$ em função de fatores ambientais como irradiância, temperatura, umidade relativa e disponibilidade de água no solo, geralmente relacionados à geografia. Esses fatores

influenciam no funcionamento dos estômatos e nas taxas fotossintéticas, influenciando no fracionamento do carbono incorporado pelas plantas. Essa característica permitiu o rastreamento de *Cannabis sativa* (SHIBUYA *et al.*, 2006) e de madeira apreendida (KAGAWA; LEAVITT, 2010), uma vez que o $\delta^{13}\text{C}$ de *Cannabis sativa*, por exemplo, pode variar de -30‰ a -24‰ dependendo das condições ambientais de cultivo. As concentrações de CO_2 ambiental também podem interferir no fracionamento isotópico, e conseqüentemente no $\delta^{13}\text{C}$ das plantas. Isso permite, por exemplo, a diferenciação entre maconha (*Cannabis sativa*) produzida em ambientes internos e externos, especialmente se houver adição de CO_2 oriundo de combustíveis fósseis engarrafados na atmosfera da estufa e isso é refletido na folha da maconha ($\delta^{13}\text{C}$ varia de -37‰ a -28‰, enquanto o $\delta^{13}\text{C}$ atmosférico é -8‰, em média) (HURLEY; WEST; EHLERINGER, 2010).

Já a composição isotópica de nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) refletem principalmente os complexos processos biogeoquímicos que ocorrem no solo e são dependentes tanto de fatores ambientais e bióticos. O $\delta^{15}\text{N}$ de compostos nitrogenados produzidos a partir da fixação biológica ou produção antrópica a partir do nitrogênio atmosférico é próximo a 0‰, enquanto que os oriundos de fertilizantes orgânicos possuem $\delta^{15}\text{N}$ mais elevado (BATEMAN; KELLY, 2007). O solo em geral é o ponto de referência para estudos com esse elemento, já que a partir de seus níveis basais ocorre a interação com as plantas e a incorporação na cadeia alimentar. Por isso, estudos são feitos para entender que fatores ambientais (como precipitação, temperatura, latitude, altitude e pH), biológicos e estruturais do solo influenciam suas razões isotópicas (CRAINE *et al.*, 2015). Esses estudos permitem entender melhor como ocorrem as variações geográficas regionais e locais de $\delta^{15}\text{N}$, tornando os modelos de atribuição mais refinados.

O $\delta^{15}\text{N}$ também é fortemente influenciado pela posição do consumidor na cadeia alimentar, de forma que os herbívoros apresentam discriminação isotópica de cerca de 3‰ em relação às plantas, e os predadores de 3‰ em relação às presas (NEWSOME *et al.*, 2007), por conta do fracionamento durante as atividades metabólicas dos animais. Dessa maneira, a variação do $\delta^{15}\text{N}$ de uma espécie vai depender de suas preferências alimentares. No entanto, os níveis de $\delta^{15}\text{N}$ também vão ser influenciados pelos níveis basais de cada região. Se uma determinada espécie mantiver o seu nível trófico em diferentes regiões, será melhor candidata a ser usada como modelo do uso do $\delta^{15}\text{N}$ como marcador geográfico.

Mais recentemente, a razão isotópica de estrôncio ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$) vêm sendo utilizada para atribuição geográfica (BATAILLE; BOWEN, 2012). Esse elemento, ao contrário dos outros citados anteriormente, praticamente não sofre fracionamento entre substrato e produto (POUILLY *et al.*, 2014). A razão $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ varia de acordo com idade da rocha mãe, de forma que valores isotópicos do solo dependem da geologia local. No entanto processos erosivos ocorrem de

modo heterogêneo podendo alterar os níveis isotópicos no solo. Além disso, a deposição atmosférica também pode influenciar nos valores isotópicos do solo. Assim, modelar espacialmente a razão $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ na água e no solo não é uma tarefa simples, mas a utilização da razão $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ como marcador geográfico tem sido testada e se apresentado promissora (BATAILLE; BOWEN, 2012). Os valores de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ disponíveis no solo e na água são incorporados aos tecidos por meio da alimentação e da ingestão de água. No entanto, o estrôncio atmosférico pode se depositar no cabelo, confundindo o valor isotópico intrínseco (oriunda da água e comida) do extrínseco (oriundo do ambiente). Produtos aplicados ao cabelo como shampoos e tintas também podem alterar a composição isotópica de estrôncio. No entanto, lavagens do material analisado, eliminando o estrôncio superficial têm se mostrado eficientes em remover o isótopo acumulado mais externamente, o que torna o uso do cabelo ainda válido para análises (TIPPLE *et al.*, 2013).

Como o fracionamento isotópico de cada elemento apresenta bases biogeoquímicas diferentes as informações geradas podem ser utilizadas de modo complementar, de forma que o uso de mais de um elemento para determinar a origem geográfica de um vestígio tem sido amplamente usado na literatura e resultado em informações mais detalhadas na forma de melhor resolução espacial para a atribuição (CHABOT *et al.*, 2012; RUNDEL *et al.*, 2013).

Tempo de renovação dos tecidos

O crescimento dos diferentes tecidos vegetais tem periodicidade diferente e pode variar de acordo com a fenologia de cada espécie. Enquanto para folhas, flores e frutos este crescimento pode ser semestral, anual ou bi-anual, os troncos normalmente terão crescimento contínuo, e uma vez formados são permanentes (tecido permanente).

As árvores das florestas temperadas normalmente apresentam anéis de crescimento bem marcados relacionados a diferentes condições climáticas ao longo do ano, marcando a sazonalidade bem definida no hemisfério norte. No verão as plantas crescem mais rápido e no inverno as plantas crescem mais lentamente, marcando a estrutura do tronco, que é visualizada em seu corte transversal. Desta forma a quantidade de anéis marcados é usado como indicativo da idade da árvore. Esses anéis podem ser amostrados sequencialmente de modo a representar as variações isotópicas anuais, sendo utilizado inclusive para estudos de variações climáticas (ANCHUKAITIS *et al.*, 2008). Por outro lado, esses anéis normalmente não são bem marcados nas regiões tropicais, já que a sazonalidade climática não é tão bem marcada com diferenças drásticas de temperatura, como no hemisfério norte. Nestas regiões alguns estudos estimam a idade das plantas a partir de estudos individuais para cada espécie (JACOBY, 1989).

Em relação aos animais, quando um indivíduo se alimenta, parte dos elementos que constituem esse alimento será absorvido pelo organismo, incorporando-se aos seus tecidos. É importante conhecer previamente a taxa de renovação (ou “turnover”) específica do tecido estudado, e com isso, o tempo que a razão isotópica dos diferentes elementos (C, N, O, H) levam desde a sua ingestão pelo organismo até a sua incorporação em cada tecido e subsequente excreção (HOBSON; CLARK, 1992). No caso dos mamíferos, células hepáticas e sanguíneas são as que se renovam mais rapidamente, enquanto as células de tecidos musculares e pelo são as mais lentas (TIESZEN *et al.*, 1983). Além disso, estas taxas também podem variar ao longo da ontogenia e de acordo com as condições a que o indivíduo está sujeito (e.g.: estresse hídrico e nutricional).

Penas de aves, cabelos e unhas são tecidos de queratina metabolicamente inertes. Estes tecidos refletem as razões isotópicas dos elementos presentes na dieta do indivíduo no momento em que foram formados (PEARSON *et al.*, 2003). As penas normalmente se formam durante a muda, que em geral ocorre uma vez ao ano (PYLE; RUTH, 2008), o cabelo humano se desenvolve cerca de 1 cm por mês (EHLERINGER *et al.*, 2008) e as unhas apresentam crescimento lento e contínuo (BEARHOP *et al.*, 2002).

Esse entendimento é importante, pois conhecendo-se a taxa de renovação do tecido, podem ser feitas interpretações isotópicas temporais do vestígio analisado. Quando se estuda aves migratórias, por exemplo, sabe-se que a pena analisada foi trocada nos locais de veraneio ou de invernada e as inferências sobre sua origem baseiam-se no conhecimento sobre a fenologia das mudas (HOBSON *et al.*, 2012).

O cabelo humano vai acumulando sequencialmente as variações isotópicas decorrentes da alimentação e da locomoção por diferentes regiões geográficas. A análise sequencial do cabelo em seu comprimento, pode ser feito, o que mostra a história recente da pessoa. Um exemplo clássico é o caso de Saltair Sally, um corpo encontrado à beira de uma rodovia que pode ser reconhecido graças à utilização de isótopos estáveis para a reconstrução de sua história individual (EHLERINGER *et al.*, 2015). O cabelo é um vestígio comum em cenas de crime e sua estrutura permanece inalterada por longo tempo, o que faz dele um bom traçador isotópico.

Os dentes representam períodos distintos da vida de um indivíduo. Assim, alguns dentes permanentes são formados na primeira infância, outros na segunda infância e outros na adolescência. A análise de diferentes dentes pode fornecer informações sobre parte da história de vida da pessoa.

O esmalte dentário é a parte superficial dos dentes. É composta principalmente de hidroxiapatita de cálcio. Como tem pouca vascularização e é altamente mineralizado (~ 96% mineral), o esmalte praticamente não é remodelado ou alterado durante a vida do indivíduo. É também

altamente resistente a alterações post-mortem. A razão isotópica dos diferentes elementos contidos no dente reflete a incorporação de alimentos e água consumidos durante o período de mineralização da coroa (BENTLEY, 2006). O esmalte dos dentes decíduos integra a formação ocorrida entre a formação no útero e a primeira infância; dos permanentes, diferentes períodos de mineralização de suas coroas ao longo da infância; e pré-molares por exemplo mineralizam entre 3-6 anos da vida de uma pessoa, refletindo a dieta da primeira infância (ALQAHTANI; HECTOR; LIVERSIDGE, 2010).

Desta forma, quanto mais informações sobre as diferenças na fisiologia e metabolismo das espécies e sobre as diferentes taxas de crescimento e renovação dos tecidos mais refinada será a interpretação dos valores isotópicos. Há também a assimilação diferente das razões isotópicas entre vários tipos de tecidos, devido às diferentes rotas metabólicas e fracionamento, que deve ser levada em consideração (PEARSON *et al.*, 2003; QUILLFELDT *et al.*, 2008).

Isoscapes

A distribuição da variação isotópica ambiental ao longo da geografia é representada em mapas, conhecidos como *isoscapes* (do inglês: “isoscapes” = “isotopic” + “landscapes”) (BOWEN, 2010). Isoscapes ambientais globais e regionais, de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$, são largamente utilizadas na literatura (WEST; FEBRUARY; BOWEN, 2014). No contexto brasileiro, Sena-Souza *et al.*, 2019, apresentam o potencial de aplicação das isoscapes com os métodos já existentes e como preencher lacunas espaciais e metodológicas, mostrando como as isoscapes podem ser uma ferramenta fundamental em aplicações forenses.

As isoscapes refletem por diferentes processos biogeoquímicos, dependendo da escala geográfica e dos materiais estudados. As principais isoscapes ambientais disponíveis atualmente e utilizadas para atribuição são as de escalas globais e estão indicadas na Tabela 1. Para a montagem de isoscapes de escalas locais e regionais, a tendência é utilizar coletas de campo georreferenciadas e sistematizadas. De posse dos valores das razões isotópicas obtidas destas amostras reais, usa-se a krigagem ordinária (“ordinary krigging”) após a análise de semivariogramas para a construção das isoscapes (WEBSTER; OLIVER, 2007).

Tabela 1 – Exemplos de modelos de isoscapes globais. R² é o coeficiente de determinação estatística.

Referência	Razão Isotópica	Tipo	Método/Equação [†]	R ²	Tamanho do pixel
FARQUHAR <i>et al.</i> , 1993	$\delta^{18}\text{O}$	Precipitação e CO ₂	$\delta^{18}\text{O} = 0.587(\text{MAT}) - 0.00993(\text{MAT})^2 + 1.152(\text{MAP}) - 0.339(\text{MAP})^2 - 0.054(\text{E})^{-2} - 13.3$	0.72	2.5° x 2.5°
LLOYD; FARQUHAR, 1994	$\delta^{13}\text{C}$	Assimilação líquida de ¹³ C por plantas	Calculado usando a temperatura média mensal e a precipitação e as temperaturas do bulbo úmido e seco		1° x 1°
FUNG <i>et al.</i> , 1997	$\delta^{13}\text{C}$	Assimilação líquida de ¹³ C por plantas	Assimilação líquida média mensal do SiB2 acoplada ao modelo climático		4° x 5°
BOWEN; WILKINSON, 2002	$\delta^{18}\text{O}$	Precipitação	$\delta^{18}\text{O} = 0.1805(\text{L}) - 0.0051(\text{L})^2 - 0.002(\text{E}) - 5.2$; Regressão da base de dados GNIP com altimetria e variáveis climáticas / interpolação residual	0.76	5' x 5'
KAPLAN <i>et al.</i> , 2002	$\delta^{13}\text{C}$	Biosfera e atmosfera	Adaptação do modelo BIOME4 baseado em variáveis climáticas		0.5° x 0.5°
AMUNDSON <i>et al.</i> , 2003	$\delta^{15}\text{N}$	Planta e solo	$\delta^{15}\text{N}_{\text{soil}} = 0.2048(\text{MAT}) - 0.0012(\text{MAP}) + 4.3266$ $\delta^{15}\text{N}_{\text{plant}} = 0.1548(\text{MAT}) - 0.0016(\text{MAP}) + 0.0697$	0.39 0.34	0.5° x 0.5°
BOWEN; REVENAUGH, 2003	$\delta^{18}\text{O}$ $\delta^2\text{H}$	Precipitação	$\delta^2\text{H} = 0.562(\text{L}) - 0.0338(\text{L})^2 - 0.0136(\text{E}) + \theta$ $\delta^{18}\text{O} = 0.0780(\text{L}) - 0.00428(\text{L})^2 - 0.00194(\text{E}) + \theta$	0.58 0.61	5' x 5'
SUITS <i>et al.</i> , 2005 [‡]	$\delta^{13}\text{C}$	Assimilação líquida de ¹³ C por plantas	Assimilação líquida usando SiB2.5 e parâmetros de vegetação a partir de observações de satélite		1° x 1°
BOWEN <i>et al.</i> , 2005	$\delta^{18}\text{O}$ $\delta^2\text{H}$	Precipitação e penas de aves	Regressão entre $\delta^2\text{H}_f$ and $\delta^2\text{H}_p$ de Bowen e Revenaugh (2003): $\delta^2\text{H}_f = 0.89(\delta^2\text{H}_p) - 25.2$	0.67	20' x, 20'
WEST <i>et al.</i> , 2008	$\delta^{18}\text{O}$ $\delta^2\text{H}$	Água foliar	Combination of biophysical models of isotope fractionation and Bowen and Revenaugh (2003) model		10' x 10'
VAN DER VEER <i>et al.</i> , 2009	$\delta^{18}\text{O}$ $\delta^2\text{H}$	Precipitação	$\delta^2\text{H} = -51.2 \exp[-0.040(\text{CQT})] - 5.1$ $\delta^{18}\text{O} = -5.9 \exp[-0.041(\text{CQT}) - 2.4]$	0.79 0.79	10' x 10'
POWELL <i>et al.</i> , 2012	$\delta^{13}\text{C}$	Cobertura da terra e solo	Divisão entre as formas de crescimento da vegetação e classificação de pixels como favoráveis a C ₃ ou C ₄		5' x 5'
TERZER <i>et al.</i> , 2013	$\delta^{18}\text{O}$ $\delta^2\text{H}$	Precipitação	Precipitação Regional Isotópica da Água Baseada em Cluster (RCWIP)		10' x 10'

Abreviações: “CQT,” temperatura do quarto mais frio; E, elevação (m); L, latitude (°); “MAT”, temperatura média anual (°C); “MAP”, precipitação média anual (mm); θ , interpolação residual; “GPP”, produção primária bruta; “GPP”, produtividade primária bruta; “SiB2” modelo simples da biosfera.

Calibração

O termo *calibração* tem sido utilizado na literatura com o objetivo de projetar as informações das isoscapes ambientais para tecidos ou materiais orgânicos para se obter uma representação espacial contínua dos valores isotópicos teciduais, gerando uma isoscape tecidual. A amostra de origem desconhecida vai pertencer, de modo probabilístico, a determinadas regiões dessa isoscape tecidual.

A forma como os tecidos orgânicos incorporam a variação geográfica ambiental dos isótopos estáveis de um determinado elemento depende de uma série de fatores. Diferenças entre as espécies, características dos micro-habitat de uma determinada região, o momento da muda e o nicho trófico de uma determinada espécie, já foram identificadas como cruciais para a calibração (HOBSON *et al.*, 2012). Assim, uma etapa essencial no processo de criação de modelos de atribuição, é saber como o tecido estudado varia ao longo da geografia.

Se existem amostras suficientemente distribuídas ao longo do espaço estudado, podem ser utilizados métodos geoestatísticos para a interpolação dos dados e gerada uma isoscape a partir do próprio tecido de um determinado material (HOBSON *et al.*, 2009). Essa seria a situação ideal para um melhor refinamento do modelo de atribuição. No entanto, amostrar amplas áreas geográficas pode ser inviável do ponto de vista prático, por demandar uma logística complexa, assim como recursos financeiros. Por isso, a calibração é feita para se extrapolar informações para áreas não amostradas.

A relação entre a razão isotópica de um elemento que se encontra no ambiente e nos tecidos animais pode ser estimada de algumas maneiras. Uma delas é conhecer quais os mecanismos que influenciam na incorporação destes elementos. Essa relação pode ser estimada a partir de experimentos em cativeiro, por exemplo (PODLESK *et al.*, 2008). Outra forma é, a partir de pontos de amostras de origem conhecida, fazer uma aproximação estatística (p.ex. regressão) entre a isoscape ambiental e os valores das razões isotópicas do material em questão. Quando essa relação é encontrada, outros estudos podem utilizá-la como padrão (GARCÍA-PÉREZ; HOBSON, 2014). No entanto, Wunder e Norris, 2008, sugerem que uma simples função de calibração não deve ser usada em muitos casos diferentes, mas que uma calibração específica seja feita para cada caso para que se produza resultados mais robustos e confiáveis. Por exemplo, isoscapes teciduais podem ser geradas para grupos de espécies (HOBSON *et al.*, 2012) ou a partir das isoscapes de outras espécies. Hobson *et al.*, 2009, fizeram ampla amostragem de penas de pardais no México e geraram um modelo de isoscape de $\delta^2\text{H}$ para o país. Os autores sugerem o uso desse modelo para subsidiar outros estudos sobre origem de animais.

Modelos de atribuição isotópica

A base primordial da atribuição isotópica é referenciar uma amostra ou grupo de amostras de origem desconhecida às localidades com razões isotópicas mais condizentes com a razão isotópica desta amostra ou grupo de amostras. O modo mais intuitivo de atribuição, é, de posse do resultado isotópico da amostra de origem desconhecida, localizar visualmente na isoscape os locais mais prováveis de ocorrência (“map-lookup approach”, WUNDER, 2010). No entanto, esta abordagem apresenta a desvantagem de considerar um mesmo valor isotópico para uma ampla faixa geográfica, que por sua vez pode apresentar uma variação natural intrínseca. Além disso, esta abordagem visual não leva em consideração a variabilidade (ou incertezas) das variáveis ambientais e biológicas, seja individualmente, temporalmente ou em decorrência da análise laboratorial.

Modelos estatísticos de atribuição consideram esta variação ambiental e biológica e são capazes de apresentar as prováveis áreas de origem de modo espacialmente contínuo ou discreto (WUNDER; NORRIS, 2008).

Áreas contínuas são denominadas de superfícies probabilísticas, que na prática são *rasters* (imagem formada por matriz de pontos que representa uma grade retangular de pixels ou células), contendo pixels com valores de probabilidade. Quando se trabalha com dados contínuos, a isoscape tecidual é a base para se estimar a probabilidade de atribuição, utilizando-se funções de distribuição normal. O valor da razão isotópica da amostra que se quer atribuir, e sua variação, estimada a partir da variância estatística dos valores isotópicos de origem conhecida, são utilizados para estimar a superfície probabilística de atribuição.

As áreas discretas são localidades, blocos ou regiões previamente definidas. Essa definição pode se dar por questões políticas, práticas ou por viés de amostragem e nem sempre representar a variação isotópica intrínseca de um determinado elemento na natureza. Grupos de amostras podem apresentar semelhanças entre si e a atribuição ocorrer por similaridade com essas amostras. Exemplos mostram diferentes regiões com diferentes razões isotópicas a que é possível atribuir amostras de origem desconhecida (CERLING *et al.*, 2006; SHIBUYA *et al.*, 2007). O grau de similaridade, quando se trabalha com dados discretos, entre a amostra e a localidade, ou entre uma amostra e grupos de amostras, é medido a partir de funções de verossimilhança (“likelihood function”), em geral, realizadas através de análises discriminantes.

A avaliação dos modelos de atribuição elaborados a partir de amostras de origem conhecida, é feita estimando-se a razão de chance (“odds ratio”) entre a máxima probabilidade estimada após a atribuição isotópica e a probabilidade resultante no pixel referente às coordenadas geográficas de origem da amostra, o que mede a robustez do modelo independente de limites de

confiança estatística (WUNDER, 2012). Pode-se testar o modelo, excluindo-se a cada rodada, uma amostra de origem conhecida. A distância da atribuição estimada para essa amostra, a partir da localidade de máxima probabilidade, é medida até sua origem real. Um melhor modelo apresenta uma maior porcentagem de atribuições, dentro de uma área máxima estipulada como limite, representando o nível de assertividade do modelo.

Potencial de uso dos modelos de atribuição isotópica no contexto forense

Espera-se no contexto forense, atribuir as amostras individuais às suas reais áreas de origem, ou diferenciar entre duas ou mais regiões de origem, certificar se vieram de uma determinada região de interesse, ou por exclusão de áreas de menor probabilidade de origem. Em qualquer uma das hipóteses, o resultado da atribuição será fornecido na forma de probabilidades e a robustez da predição vai depender dos testes do modelo realizados com amostras conhecidas.

O resultado dos laudos periciais em forma de probabilidades é comum para análise de DNA na área forense (EVETT; WEIR, 1998) e tem sido sugerido para outras áreas, como a grafoscopia (HOLLER; VILLELA, 2005). Mesmo que não haja um resultado taxativo, ou enfático, o resultado pericial em probabilidades pode subsidiar a investigação policial, indicando as regiões mais prováveis para busca de elementos provatórios, e também poderá ser apreciado pela autoridade julgadora e ser auxiliar para fundamentar a sentença.

Para tornar os modelos de atribuição mais assertivos para aplicação forense, o ideal seria a formação de bancos de dados isotópicos, uma vez que os valores isotópicos são comparáveis entre laboratórios por seguirem um padrão único. Um banco de dados mundial reduziria consideravelmente a necessidade de duplicação de esforços individuais (GENTILE *et al.*, 2015). Dessa maneira, bancos de dados isotópicos podem ser construídos de maneira colaborativa com fins forenses, que poderia ter abrangência tanto nacional como internacional. Quanto mais amostras de origem conhecida adicionadas ao banco, mais robusta a predição de similaridade das amostras questionadas. Pauli *et al.*, 2017, sugerem a criação de um repositório de dados centralizado e de uso amplo, reunindo diversas aplicações isotópicas, iniciativa que denominam de Isobank.

O resultado probabilístico de atribuição pode ainda ser complementado por outras informações contextuais. Há estudos que mostram exclusão de áreas baseados em diversos critérios, como históricos (FONT *et al.*, 2015) e biológicos (ROYLE; RUBENSTEIN, 2004). No caso de Saltair Sally, por exemplo, a atribuição isotópica foi útil por resultar em áreas de origem fora da jurisdição inicialmente investigada. Ao ampliar a área provável, a queixa por pessoa desaparecida dada pela família foi localizada, e foi possível fazer a identificação do corpo (EHLERINGER *et al.*, 2015).

No caso de aves migratórias, a distribuição natural das aves, ou abundância nas regiões de origem, pode ser utilizada como informação complementar.

A junção dessas informações contextuais em termos numéricos, é feito por meio de estatística Bayesiana. Na ausência de dados isotópicos, existindo, por exemplo, dados sobre a maior abundância natural de indivíduos de uma mesma espécie em uma região (1) versus em outra região (2), é razoável pensar que o indivíduo alvo teria uma chance maior de ter vindo da região 1. Os dados de abundância serão utilizados à priori, de acordo com as regras Bayesianas: $P(B | A) = P(A | B) * P(B) / P(A)$, onde, $P(B | A)$ é a probabilidade posterior de um evento B, dado o evento A, $P(A | B)$ é a probabilidade dos dados observados dados os parâmetros do modelo (por exemplo, os resultados da função de probabilidade normal citada acima), $P(B)$ é a probabilidade a priori para B e $P(A)$ é uma probabilidade marginal que serve como uma constante de normalização (WUNDER; NORRIS, 2008).

Exemplo de aplicação da metodologia de atribuição

Para exemplificar o uso da metodologia descrita anteriormente, foram utilizados os dados de Nardoto *et al.*, 2014, para produzir um modelo de atribuição baseado em $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ para folhas de árvores da Amazônia brasileira. Para subsidiar a montagem destas isoscapes foliares foram utilizadas como base as isoscapes de $\delta^{13}\text{C}$ de folhas (POWELL; YOO; STILL, 2012) e $\delta^{15}\text{N}$ do solo (NARDOTO *et al.*, 2019) e variáveis ambientais (precipitação nos três meses mais quentes do ano, precipitação nos meses mais úmidos, temperatura mínima nos meses mais frios e meses em que a precipitação esteve abaixo de 100 mm) obtidas no site WorldClim (HIJMANS *et al.*, 2005). Para utilização da isoscape de $\delta^{13}\text{C}$ de folhas, foram selecionados somente os valores inferiores a -20‰, já que o interesse era somente por árvores (plantas C_3).

O teste de atribuição foi realizado utilizando a distribuição normal bivariada de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, com resultados para indivíduos da espécie matamatá (*Eschweilera coriacea*) publicados em Nardoto, 2005, e Martinelli *et al.*, 2007. A espécie possui potencial madeireiro, ocorre em praticamente toda a região de terra-firme na Amazônia brasileira.

Foi adotado o seguinte procedimento: (1) plotagem dos valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ foliar de árvores das parcelas amostradas; (2) aplicação do modelo de regressão linear múltipla entre $\delta^{13}\text{C}$ foliar e $\delta^{15}\text{N}$ foliar e as variáveis ambientais citadas acima; (3) extrapolação a partir da equação do modelo utilizando operação de *raster* e gerando a isoscape foliar de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ da Amazônia brasileira (calibração, Figura 1 a e b); e (4) teste de atribuição utilizando função da distribuição normal bivariada (Figura 2).

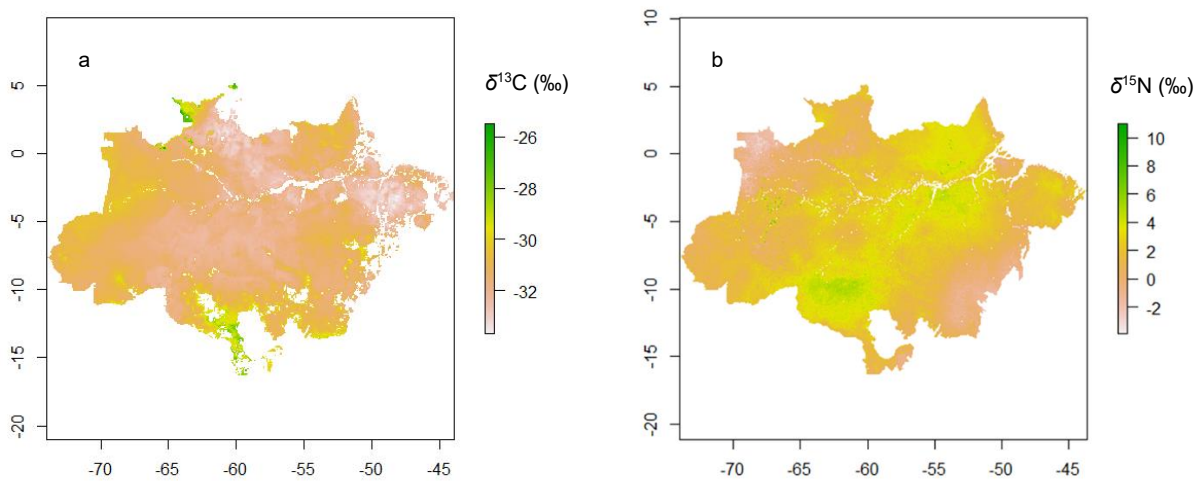


Figura 1 – Isoscapes de $\delta^{13}\text{C}$ (a) e $\delta^{15}\text{N}$ (b) de folhas de árvores da Amazônia brasileira. Eixos: x – longitude em graus decimais, eixo y – latitude em graus decimais.

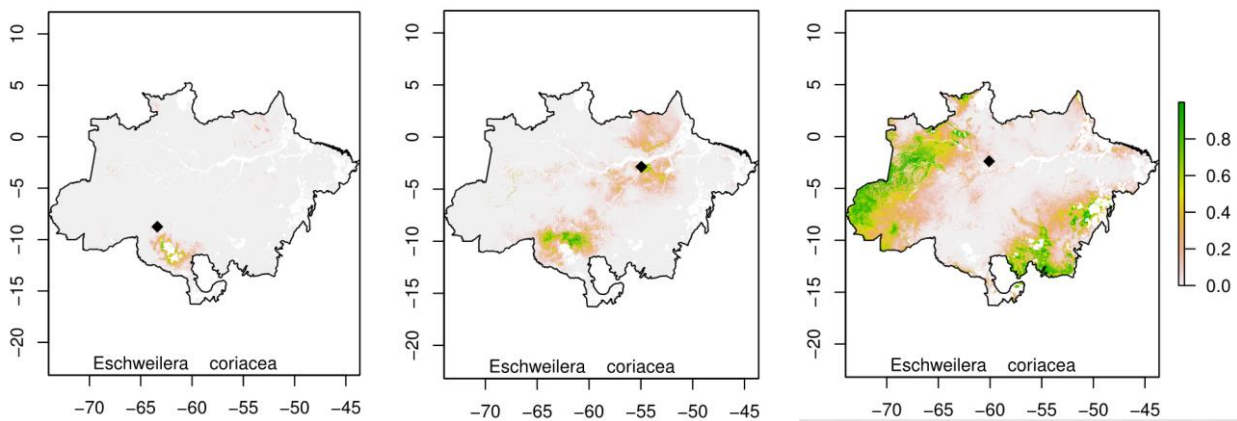


Figura 2 – Resultados dos testes de atribuição para três indivíduos da espécie matamatá (*Eschweilera coriacea*). Escala colorida em probabilidade de origem, normalizada. Eixos: x – longitude em graus decimais, eixo y – latitude em graus decimais. O ponto preto representa a localização geográfica conhecida da amostra em teste.

Aplicações da atribuição isotópica

Origem de animais

Os impactos diretos do tráfico de animais silvestres continuam a ameaçar a biodiversidade no Brasil. Há ainda um grande número de animais vivos e produtos de origem animal sendo confiscados todos os anos em atividades ilegais (ALVES; DE FARIAS LIMA; ARAUJO, 2012; DESTRO *et al.*, 2012; REGUEIRA; BERNARD, 2012). O transporte causado pelo tráfico de animais

pode ser comparado à migração natural de aves, devido ao deslocamento de animais em escala continental (COSTA *et al.*, 2018; DESTRO *et al.*, 2012).

A atribuição de animais migratórios aos seus locais de origem utilizando marcadores isotópicos tem sido realizada amplamente na literatura internacional, sobretudo para aves, havendo inclusive um livro tratando do assunto (HOBSON; WASSENAAR, 2018). Outros estudos abordam diversos grupos animais, como por exemplo mamíferos (CERLING *et al.*, 2006; CRYAN; STRICKER; WUNDER, 2014), répteis (SEMINOFF *et al.*, 2012), peixes (HANSON *et al.*, 2013; TORNIAINEN *et al.*, 2017), e invertebrados (WASSENAAR; HOBSON, 1998).

A relação entre a variação isotópica da água precipitada e tecidos de aves é conhecida para diversas espécies na América do Norte, o que facilita a utilização de modelos isotópicos mais específicos (HOBSON, *et al.*, 2012). Algumas limitações de seu uso também são conhecidas (FARMER; CADE; TORRES-DOWDALL, 2008). Os estudos visam sobretudo estabelecer a conectividade entre suas origens e destinos, estabelecendo rotas migratórias a fim de subsidiar programas de conservação e monitoramento das áreas mais suscetíveis a ameaças.

Modelos de atribuição de aves migratórias já foram feitos para a América do Sul (GARCIA-PEREZ *et al.*, 2013; GARCÍA-PÉREZ; HOBSON, 2014; HOBSON; KARDYNAL, 2016). E no Brasil, associando a isoscape de $\delta^2\text{H}$ da precipitação com a isoscape de $\delta^{13}\text{C}$ com base nos tipos de vegetação (POWELL; YOO; STILL, 2012), foi possível distinguir três amplas regiões de origem destas aves migratórias (GARCÍA-PÉREZ; HOBSON, 2014).

O potencial de atribuir animais traficados às suas regiões de origem no Brasil depende do refinamento das isoscapes ambientais atualmente existentes para o Brasil (NARDOTO *et al.*, 2019) com a obtenção de mais pontos amostrados tanto espacialmente como temporalmente. A isoscape de $\delta^{13}\text{C}$ foliar que foi construída com dados de sensoriamento remoto, não considera por exemplo, a variação local da vegetação do Cerrado em mosaico, região em que o erro do modelo é o maior entre as regiões brasileiras (POWELL; YOO; STILL, 2012).

Origem de vestígios humanos

A identificação de vítimas de assassinatos, reconstrução da história individual, o combate ao tráfico humano e imigração ilegal são alguns exemplos de contexto em que a atribuição isotópica tem sido utilizada (EHLERINGER *et al.*, 2015; EHLERINGER; MATHESON JR., 2010).

Existem exemplos que utilizam isoscapes ambientais em modelos estatísticos de atribuição e outros baseiam-se em exclusão de áreas com valores isotópicos bastante diferentes ou fazem inferências lógicas diretas a partir da análise de conjunto de dados contextuais. Laffoon *et al.*,

2017, utilizam duas metodologias para atribuição humana na região caribenha, uma delas utilizando modelos estatísticos de atribuição e a outra utilizando abordagem de localização direta no mapa.

Assim como para as aves, o $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ da água são importantes indicadores da posição geográfica para o ser humano, como podem ser vistos na relação existente entre as isoscapes de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ para o cabelo humano e da água da torneira ao longo dos Estados Unidos (EHLERINGER *et al.*, 2008).

O $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ são normalmente usados em associação, fornecendo informações sobre alimentação, que podem depender da nacionalidade, de hábitos alimentares ou da região (NARDOTO *et al.*, 2006; NARDOTO *et al.*, 2011; VALENZUELA *et al.*, 2011). A construção da isoscape “fonte-consumidor”, entre o carbono e nitrogênio da unha de populações rurais e urbanas brasileiras e o $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das fontes alimentares, como demonstrado por Nardoto *et al.*, 2019, foi utilizada como uma ferramenta para traçar os padrões alimentares humanos no Brasil. Esse padrão pode ser usado no contexto da antropologia forense para rastreamento da origem de restos humanos, assim como em estudos de movimentação humana por diferentes regiões geográficas.

A razão $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, por sua vez, têm sido utilizada para atribuição, sobretudo em combinação com $\delta^{18}\text{O}$ (LAFFOON *et al.*, 2017), mas depende de informações prévias da isoscape ambiental, ainda não disponível para todas as regiões do mundo.

Diferentes hábitos alimentares e culturais devem ser levados em consideração em estudos envolvendo seres humanos. A preferência por alimentação onívora ou vegetariana, o hábito de cozinhar alimentos e de ferver a água, por exemplo são alguns fatores que podem interferir nos resultados isotópicos. Por isso, para aplicações com seres humanos deve-se trabalhar com isoscapes específicas.

Para aplicação no Brasil, seria importante um maior detalhamento a partir da utilização de dados de tecido humano para criação de uma isoscape tecidual de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$, a exemplo do que foi feito nos Estados Unidos. Os dados de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de Nardoto *et al.*, 2019, podem ser complementados para todo o país, produzindo informações sobre hábitos alimentares de modo mais detalhado. Além destas, isoscapes da razão $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ podem ser produzidas a partir de dados geológicos existentes utilizando a modelagem proposta por Bataille e Bowen, 2012.

Origem de madeira ilegal

A extração ilegal de madeira no Brasil é um grande problema, principalmente na Amazônia, com coletas de espécies selecionadas a partir da prática de fraudes nos mecanismos de controle, como o sistema de documento de origem florestal (DOF-IBAMA). Frequentemente são

observadas transferências indevidas de créditos no sistema, utilizados para comercialização ilegal (BRANCALION *et al.*, 2018).

Gori, Stradiotti e Camin, 2018, apresentaram um modelo de aplicação isotópica para a detecção da origem geográfica da madeira na Itália, em uma escala regional, utilizando $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$. Os autores produziram uma isoscape de madeira utilizando amostras coletadas sistematicamente na região estudada. O modelo mostrou-se útil para atribuição de madeira de origem ilegal. A variação espacial desses isótopos ocorreu sobretudo em razão da altitude, relação já conhecida entre esses isótopos da água precipitada. No entanto, os autores alertam que a utilização de isoscapes de precipitação não evidencia a tendência espacial relacionada à latitude na região, sugerindo que o uso dessas isoscapes como co-variáveis para madeira deve ser feita com cautela.

Gori *et al.*, 2013, não obtiveram sucesso em utilizar $\delta^{13}\text{C}$ para atribuição de madeira, sugerindo que o insucesso se deva à menor escala da área estudada ou aos diferentes materiais vegetais amostrados. No entanto, Kagawa e Leavitt, 2010, compararam métodos de dendro-procedência, que utilizam comparações com anéis da madeira com amostras de origem conhecida, com $\delta^{13}\text{C}$, chegando à conclusão que o uso da metodologia isotópica se mostrou efetiva.

Os trabalhos citados acima estudam poucas espécies arbóreas, o que torna mais fácil a padronização e interpretação dos resultados encontrados. No Brasil, a diversidade de espécies de árvores que produzem madeira de valor comercial é bem maior e variações específicas de metabolismo vegetal (como plantas capazes de associações simbióticas e diferenças na eficiência no uso da água) podem alterar as razões isotópicas.

Contudo, as isoscapes foliares de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de árvores da Amazônia demonstradas acima, neste artigo, apresentam-se promissoras. Observa-se uma ampla variação espacial isotópica ao longo da Amazônia, com padrões específicos para $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$. Esses modelos podem ser refinados com melhor amostragem espacial, comparando diferentes tecidos vegetais e espécies madeireiras e estabelecendo métricas de assertividade e de avaliação dos modelos.

Origem de drogas ilícitas

As drogas de abuso mais consumidas no Brasil são a maconha (*Cannabis sativa*) e a cocaína (*Erythroxylum coca*) (VELHO *et al.*, 2012). As duas drogas são traficadas mundialmente. O tráfico de maconha ocorre regionalmente, sendo em geral consumida no mesmo país em que é produzida, enquanto a cocaína é transportada dos países andinos da América Latina para os mercados da Europa (UNITED NATIONS, 2018).

Estudos para determinar a origem geográfica da maconha apreendida têm se baseado na variação de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ nas plantas em função das condições climáticas e de solo. No caso

do Brasil, um estudo diferenciando a razão isotópica de C e N de algumas áreas produtoras de maconha já foi realizado (SHIBUYA *et al.*, 2006). A metodologia demonstrou-se útil para identificar possíveis regiões de origem de maconha apreendida no estado de São Paulo, demonstrando que poucas amostras dentre as analisadas eram oriundas do sertão nordestino, ao contrário do que era suposto pelas autoridades (SHIBUYA *et al.*, 2007).

A situação do mercado de maconha atual deve ser diferente da época do estudo de Shibuya *et al.*, 2007, já que os criminosos tendem a migrar para áreas menos fiscalizadas e a usar diferentes tecnologias para plantações (UNITED NATIONS, 2018). Assim, o rastreamento destas áreas usando as diferenças regionais na razão isotópica pode ser usado para auxiliar no entendimento do tráfico de drogas, rotas e principais áreas fontes e para se priorizar ações de repressão ou prevenção, mas precisam produzir resultados atualizados. A aplicação continuada da metodologia nos casos de apreensão de drogas poderia alimentar banco de dados e fornecer informações importantes para a inteligência policial, a exemplo do que já ocorre em países como os Estados Unidos.

O uso de isótopos estáveis para determinar a origem de cocaína tem sido alvo de numerosos estudos internacionais (EHLERINGER *et al.*, 2000; MALLETTTE *et al.*, 2016). Mallette *et al.*, 2016, por exemplo, utilizaram estatística multivariada para elaborar isoscapes regionais e a partir da análise de amostras apreendidas puderam acessar as principais origens da cocaína traficada para os Estados Unidos.

Nos EUA, há um programa da Agência de Repressão a Drogas (DEA), no sentido de criar uma base de dados com assinaturas das drogas (CHESSON *et al.*, 2018). No Brasil, uma iniciativa semelhante da Polícia Federal, destinado a estudar o perfil químico das drogas visando “*estabelecer origens geográficas e rotas do tráfico de drogas de abuso comercializadas no Brasil e contribuir com dados e estatísticas que consigam apontar as tendências deste mercado ilícito*” (MALDANER *et al.*, 2009) poderia contemplar análises isotópicas para se fazer testes de atribuição isotópica.

Origem de alimentos

Os países importadores precisam certificar-se da nacionalidade de origem do produto e detectar informações errôneas nos rótulos dos alimentos importados. Na Europa o controle da qualidade e origem de alimentos está em um estágio bastante avançado (CAMIN *et al.*, 2016). Há uma legislação específica sobre rastreabilidade (178/2002/EC) de alimentos. Há ainda a obrigação de constar no rótulo de carnes informações sobre o país de origem e do abate do animal e alimentos com proteções especiais, dotados de propriedades organolépticas e culinárias únicas. Produtos oriundos de determinadas regiões geográficas possuem uma marca, como os queijos franceses e italianos.

Alimentos de alta qualidade (como vinhos, queijos, embutidos e azeites) e de origem geográfica conhecida acabam sendo mais valorizados pelos consumidores e alcançam preços maiores no mercado, tornando-se alvos de falsificações.

A metodologia de isótopos estáveis para saber a origem de alimentos tem sido aplicada para diversos itens alimentares, de origem vegetal, como vinhos, café, suco-de-laranja, azeite de oliva, ou animal, como leite, queijo, carne e cera de abelha (CERLING *et al.*, 2016). Análise de vinho, suco de frutas, queijos e azeite de oliva já possuem métodos estabelecidos reconhecidos oficialmente (“standard methods”) (CAMIN *et al.*, 2016). Nos Estados Unidos há estudos que demonstram a relação de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ de alimentos, como leite, carnes e bebidas, com o $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ da precipitação (CHESSON *et al.*, 2010, 2011).

Em relação ao modo de produção e alimentação dos animais domésticos, o bife oriundo do Brasil, por exemplo, destaca-se por apresentar um $\delta^{13}\text{C}$ elevado, uma vez que predomina no país o forrageamento usando gramíneas exóticas africanas do tipo C_4 para a alimentação do gado, sendo facilmente diferenciado do originado em outros países, em que predomina uma dieta com base em plantas C_3 ou mistura de C_3 x C_4 (HEATON *et al.*, 2008; MARTINELLI *et al.*, 2011). Outros tipos de alimentação animal, como silagens, diferentes tipos de concentrados, rações e pastagens, podem diferenciar regiões de origem. Animais estabulados ou em pastejo extensivo são diferenciados pelo $\delta^{15}\text{N}$, dependendo da fonte nitrogenada utilizada nas forragens. O $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ diferenciam países ou regiões de diferentes altitudes e latitudes (CAMIN *et al.*, 2016). Trânsito ilegal de animais representa um grande risco sanitário para os rebanhos, como o de disseminação da doença de febre aftosa (CARVALHO; MELO; HADDAD, 2012). Informações sobre a origem da carne em abatedouros, poderiam ser de auxílio nesse controle oficial.

A análise da autenticidade da origem geográfica pode ser realizada por meio de comparações com amostras padrões de bancos de dados. Na Europa, esses bancos de dados estão bastante avançados, havendo alguns governamentais, outros gerenciados por associações produtoras e comerciais (geralmente de uso restrito) e alguns destinados a gerenciar a autenticidade de determinado produto (como sucos) ou detectar determinadas fraudes (como de caviar). Há ainda critérios para inclusão de amostras padrão e limites de aceitação para amostras examinadas. A União Européia possui um banco de dados de vinhos atualizado anualmente, utilizado para controle oficial, que pode rejeitar lotes em caso de não conformidade isotópica (CAMIN *et al.*, 2016).

No Brasil, há um estudo na região sul do país, diferenciando regiões produtoras de vinho em uma pequena escala geográfica. Neste estudo foi possível diferenciar regiões e diferentes safras com base em $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ (ADAMI *et al.*, 2010). Barbosa *et al.*, 2014, utilizaram uma abordagem integrada para auxiliar na diferenciação de variedades de cafés de alta qualidade oriundos da Serra da

Mantiqueira, em Minas Gerais. Estes artigos publicados no Brasil mostram o potencial da metodologia isotópica para o controle de origem de alimentos de alta qualidade, no entanto, a sua aplicação ainda é incipiente. Os resultados de análises isotópicas realizadas de maneira rotineira com alimentos de origem conhecida poderiam ser adicionadas a bancos de dados para subsidiar os testes de atribuição isotópica e com isso auxiliar o controle governamental e comercial.

Considerações finais

Internacionalmente, a metodologia isotópica vem sendo usada amplamente em casos forenses relacionados à determinação da origem geográfica. Existe um arcabouço científico bem embasado, tornando a aplicação possível nas mais diversas áreas. Os modelos globais existentes podem ser aplicados no Brasil, e já seriam úteis para esclarecer algumas questões geograficamente mais abrangentes. No entanto, para que haja respostas de atribuição de vestígios ao seu local de origem, alguns refinamentos devem ser feitos. Os modelos globais não são capazes de mostrar as variações regionais no Brasil, o que pode subdimensionar a variabilidade regional existente. Assim, estudos capazes de ressaltar as variações ambientais regionais, seriam os mais indicados.

Seria importante ampliar os estudos sobre como as razões isotópicas variam espacialmente nos tecidos vegetais e animais e de acordo com as condições ambientais regionais, produzindo ou refinando isoscapes teciduais específicas e temporalmente compatíveis com os casos forenses em questão. Pode-se priorizar algumas espécies chave, que forneceriam informações mais abrangentes ou mais relacionadas aos casos forenses. Para que esses avanços sejam feitos, pode-se utilizar as variáveis ambientais em associações com os dados isotópicos já existentes construindo isoscapes regionais específicas. Com a disponibilização desses dados, a metodologia de atribuição isotópica explicada neste artigo pode ser amplamente explorada e resultar em modelos espaciais possíveis de serem aplicados na prática especificamente no contexto brasileiro.

O banco de dados gerado para a construção destas isoscapes regionais brasileiras poderão fazer parte do banco de dados isotópico mundial em construção (Isobank) (PAULI *et al.*, 2017) (<https://github.com/BrianHayden/IsoBank>).

Em casos mais específicos como a determinação de origem de alimentos, a exemplo do que ocorre na Europa, a iniciativa privada pode utilizar esta metodologia para certificar a origem de produtos de alta qualidade. Essas informações privadas podem ser compartilhadas com os órgãos periciais, policiais e fiscalizadores, favorecendo a aplicação da ferramenta isotópica para controle de fraudes. Já no caso do tráfico de drogas, a análise isotópica de rotina em drogas apreendidas

poderia compor um banco de dados de uso exclusivo das forças policiais, gerando informações de inteligência com relação à origem e de rotas de tráfico, o que pode orientar ações de repressão, prevenção e combate ao narcotráfico. Nestes casos, os dados isotópicos obtidos poderiam ser incorporados neste banco de dados centralizado para todo o país, podendo auxiliar no refinamento das isoscapes para usos múltiplos.

Referências

- ADAMI, L. *et al.* Geographic origin of southern Brazilian wines by carbon and oxygen isotope analyses. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 20, p. 2943–2948, 2010.
- ALQAHTANI, S. J.; HECTOR, M. P.; LIVERSIDGE, H. M. Brief communication: The London atlas of human tooth development and eruption. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 142, n. 3, p. 481–490, 2010.
- ALVES, R. R. N.; DE FARIAS LIMA, J. R.; ARAUJO, H. F. P. The live bird trade in Brazil and its conservation implications: an overview. **Bird Conservation International**, v. 23, n. 1, p. 1–13, 2012.
- AMUNDSON, R. *et al.* Global patterns of the isotopic composition of soil and plant nitrogen. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 17, n. 1, p. 1031-1041, 2003.
- ANCHUKAITIS, K. J. *et al.* Stable isotope chronology and climate signal calibration in neotropical montane cloud forest trees. **Journal of Geophysical Research**, v. 113, p. 3030, 2008.
- BAISDEN, W. T. *et al.* Precipitation isoscapes for New Zealand: enhanced temporal detail using precipitation-weighted daily climatology. **Isotopes in Environmental and Health Studies**, v. 52, n. 4–5, p. 343–352, 2016.
- BARBOSA, J. *et al.* Discrimination of Production Environments of Specialty Coffees by Means of Stable Isotopes and Discriminant Model. **Journal of Agricultural Science**, v. 6, n. 5, 2014.
- BATAILLE, C. P. *et al.* A geostatistical framework for predicting variability in strontium concentrations and isotope ratios in Alaskan rivers. **Chemical Geology**, v. 389, p. 1–15, 2014.
- BATAILLE, C. P.; BOWEN, G. J. Mapping $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ variations in bedrock and water for large scale provenance studies. **Chemical Geology**, v. 304–305, p. 39–52, 2012.
- BATAILLE, C. P.; LAFFOON, J.; BOWEN, G. J. Mapping multiple source effects on the strontium isotopic signatures of ecosystems from the circum-Caribbean region. **Ecosphere**, v. 3, n. 12, p. art118, 2012.
- BATEMAN, A. S.; KELLY, S. D. Fertilizer nitrogen isotope signatures. **Isotopes in Environmental and Health Studies**, v. 43, n. 3, p. 237–247, 2007.
- BEARHOP, S. *et al.* Factors that influence assimilation rates and fractionation of nitrogen and carbon stable isotopes in avian blood and feathers. **Physiological and biochemical zoology**, v. 75, n. 5, p. 451–458, 2002.
- BENTLEY, R. A. Strontium Isotopes from the Earth to the Archaeological Skeleton: A Review. **Journal of Archaeological Method and Theory**, v. 13, n. 3, 2006.
- BOWEN, G. J. *et al.* Geographic assignment with stable isotopes in IsoMAP. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 5, n. 3, p. 201–206, 2014.
- BOWEN, G. J. Isoscapes: Spatial Pattern in Isotopic Biogeochemistry. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 38, n. 1, p. 161–187, abr. 2010.
- BOWEN, G. J.; REVENAUGH, J. Interpolating the isotopic composition of modern meteoric precipitation. **Water Resources Research**, v. 39, n. 10, p. 1-13, 2003.
- BOWEN, G. J.; WASSENAAR, L. I.; HOBSON, K. A. Global application of stable hydrogen and oxygen isotopes to wildlife forensics. **Oecologia**, v. 143, n. 3, p. 337-348, 2005.
- BOWEN, G. J.; WILKINSON, B. Spatial distribution of $\delta^{18}\text{O}$ in meteoric precipitation. **Geology**, v. 30, n. 4, p. 315-318, 2002.

- BRANCALION, P. H. S. *et al.* Fake legal logging in the Brazilian Amazon. **Science Advance**, v. 4, p. eaat1192, 2018.
- CAMIN, F. *et al.* Stable Isotope Ratio Analysis for Assessing the Authenticity of Food of Animal Origin. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 15, n. 5, p. 868–877, 2016.
- CARVALHO, L. F. R.; MELO, C. B. DE; HADDAD, J. P. A. Cadastro Da Exploração Pecuária E O Controle Do Trânsito De Bovídeos Considerando a Saúde Animal No Brasil. Uma Breve Revisão. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. 1, p. 19–26, 2012.
- CERLING, T. E. *et al.* Forensic Stable Isotope Biogeochemistry. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 44, n. 1, p. 175–206, 2016.
- CERLING, T. E. *et al.* Stable isotopes in elephant hair document migration patterns and diet changes. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, v. 103, n. 2, p. 371–373, 2006.
- CHABOT, A. A. *et al.* Advances in linking wintering migrant birds to their breeding-ground origins using combined analyses of genetic and stable isotope markers. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.
- CHESSON, L. A. *et al.* Applying the principles of isotope analysis in plant and animal ecology to forensic science in the Americas. **Oecologia**, v. 187, n. 4, p. 1077–1094, 2018.
- CHESSON, L. A. *et al.* Consistent predictable patterns in the hydrogen and oxygen stable isotope ratios of animal proteins consumed by modern humans in the USA. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 25, n. 24, p. 3713–3722, 2011.
- CHESSON, L. A. *et al.* Hydrogen and Oxygen Stable Isotope Ratios of Milk in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2358–2363, 2010.
- CHESSON, L. A. *et al.* The potential for application of ink stable isotope analysis in questioned document examination. **Science and Justice**, v. 55, n. 1, p. 27–33, 2015.
- COSTA, F. J. V. *et al.* Espécies de Aves Traficadas no Brasil: Uma Meta-Análise com Ênfase nas Espécies Ameaçadas. **Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science**, v. 7, n. 2, p. 324–346, 2018.
- CRAINE, J. M. *et al.* Convergence of soil nitrogen isotopes across global climate gradients. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8280, 2015.
- CRYAN, P. M.; STRICKER, C. A.; WUNDER, M. B. Continental-scale, seasonal movements of a heterothermic migratory tree bat. **Ecological Applications**, v. 24, n. 4, p. 602–616, 2014.
- DESTRO, G. F. G. *et al.* Efforts to Combat Wild Animals Trafficking in Brazil. **Biodiversity Enrichment in a Diverse World**, v. 1542, n. 9, p. 33–36, 2012.
- EHLERINGER, J. R. *et al.* Hydrogen and oxygen isotope ratios in human hair are related to geography. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 8, p. 2788–2793, 2008.
- EHLERINGER, J. R. *et al.* Stable isotopes trace the truth: From adulterated foods to crime scenes. **Elements**, v. 11, n. 4, p. 259–264, 2015.
- EHLERINGER, J. R. *et al.* Tracing the geographical origin of cocaine: Cocaine carries a chemical fingerprint from the region where the coca was grown. **Nature**, v. 408, n. 6810, p. 311–312, 2000.
- EHLERINGER, J. R.; MATHESON JR., S. M. Stable isotopes and courts. **Utah Law Review**, v. 2010, n. 2, p. 385–442, 2010.
- EVETT, I. W.; WEIR, B. S. **Interpreting DNA Evidence: Statistical Genetics for Forensic Scientists**. Sunderland: Sinaur Associates Inc, 1998.
- FARMER, A.; CADE, B. S.; TORRES-DOWDALL, J. Fundamental limits to the accuracy of deuterium isotopes for identifying the spatial origin of migratory animals. **Oecologia**, v. 158, n. 2, p. 183–192, 2008.
- FARQUHAR, G. D. *et al.* Vegetation effects on the isotope composition of oxygen in atmospheric CO₂. **Nature**, v. 363, p. 439–443, 1993.
- FARQUHAR, G. D.; EHLERINGER, J. R.; HUBICK, K. T. Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, n. 1, p.

503–537, 1989.

- FONT, L. *et al.* Provenancing of unidentified World War II casualties: Application of strontium and oxygen isotope analysis in tooth enamel. **Science and Justice**, v. 55, n. 1, p. 10–17, 2015.
- FRY, B. **Stable Isotope Ecology**. New York: Springer, 2006. v. XII.
- FUNG, I. *et al.* Carbon 13 exchanges between the atmosphere and biosphere. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 11, n. 4, p. 507–533, 1997.
- GARCIA-PEREZ, B. *et al.* Switching Hemispheres: A New Migration Strategy for the Disjunct Argentinean Breeding Population of Barn Swallow (*Hirundo rustica*). **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e55654, 31 jan. 2013.
- GARCÍA-PÉREZ, B.; HOBSON, K. A. A multi-isotope ($\delta^2\text{H}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) approach to establishing migratory connectivity of Barn Swallow (*Hirundo rustica*). **Ecosphere**, v. 5, n. 2, p. 1–12, 2014.
- GENTILE, N. *et al.* Isotope ratio mass spectrometry as a tool for source inference in forensic science: A critical review. **Forensic Science International**, v. 251, p. 139–158, 2015.
- GORI, Y. *et al.* Carbon, hydrogen and oxygen stable isotope ratios of whole wood, cellulose and lignin methoxyl groups of *Picea abies* as climate proxies. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 27, n. 1, p. 265–275, 2013.
- GORI, Y.; STRADIOTTI, A.; CAMIN, F. Timber isoscapes. A case study in a mountain area in the Italian Alps. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, 2018.
- HANSON, N. N. *et al.* Reconstructing marine life-history strategies of wild Atlantic salmon from the stable isotope composition of otoliths. **Marine Ecology Progress Series**, v. 475, p. 249–266, 2013.
- HEATON, K. *et al.* Verifying the geographical origin of beef: The application of multi-element isotope and trace element analysis. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 506–515, 2008.
- HIJMANS, R. J. *et al.* Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. **International Journal of Climatology**, v. 25, p. 1965–1978, 2005.
- HOBSON, K. A. *et al.* A feather hydrogen isoscape for Mexico. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 102, n. 3, p. 167–174, 2009.
- HOBSON, K. A. *et al.* Linking hydrogen ($\delta^2\text{H}$) isotopes in feathers and precipitation: Sources of variance and consequences for assignment to isoscapes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35137, 2012.
- HOBSON, K. A.; CLARK, R. G. Assessing Avian Diets Using Stable Isotopes I: Turnover of ^{13}C in Tissues. **The Condor**, v. 94, n. 1, p. 181–188, fev. 1992.
- HOBSON, K. A.; KARDYNAL, K. J. An isotope ($\delta^{34}\text{S}$) filter and geolocator results constrain a dual feather isoscape ($\delta^2\text{H}$, $\delta^{13}\text{C}$) to identify the wintering grounds of North American Barn Swallows. **The Auk**, v. 133, n. 1, p. 86–98, 2016.
- HOBSON, K. A.; WASSENAAR, L. I. Linking breeding and wintering grounds of neotropical migrant songbirds using stable hydrogen isotopic analysis of feathers. **Oecologia**, v. 109, n. 1, p. 142–148, 7 jan. 1997.
- HOBSON, K. A.; WASSENAAR, L. I. **Tracking Animal Migration with Stable Isotopes**. 2^a ed. Academic Press, 2018.
- HOLLER, M.G.; VILLELA, C.A.X. A utilização de escalas de probabilidade nos exames grafoscópicos e sua margem de erro. **Perícia Federal**, v.22, p. 14–19, 2005.
- HURLEY, J. M.; WEST, J. B.; EHLERINGER, J. R. Tracing retail cannabis in the United States: Geographic origin and cultivation patterns. **International Journal of Drug Policy**, v. 21, n. 3, p. 222–228, 2010.
- INMAN, K.; RUDIN, N. The origin of evidence. **Forensic Science International**, v. 126, n. 1, p. 11–16, 2002.
- JACOBY, G. C. Overview of tree-ring analysis in tropical regions. **IAWA Bulletin**, v. 10, n. 2, p. 99–108, 1989.
- KAGAWA, A.; LEAVITT, S. W. Stable carbon isotopes of tree rings as a tool to pinpoint the geographic origin of timber. **Journal of Wood Science**, v. 56, n. 3, p. 175–183, 2010.
- KAPLAN, J. O.; PRENTICE, I. C.; BUCHMANN, N. The stable carbon isotope composition of the terrestrial

- biosphere: Modeling at scales from the leaf to the globe. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 16, n. 4, p. 1-8, 2002.
- KWAN, Q.Y. **Inference of identity of source**, PhD Thesis, University of California, 1977.
- LAFFOON, J. E. *et al.* Investigating human geographic origins using dual-isotope ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, $\delta^{18}\text{O}$) assignment approaches. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0172562, 2017.
- LLOYD, J.; FARQUHAR, G. D. ^{13}C discrimination during CO_2 assimilation by the terrestrial biosphere. **Oecologia**, v. 99, p. 201-215, 1994.
- MALDANER, A. O. *et al.* Gerenciamento de ações voltadas para obtenção de Perfis Químicos de Drogas – Projeto PeQui da Polícia Federal. **Resumos da 34a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, p. 275, 2009.
- MALLETTE, J. R. *et al.* Geographically Sourcing Cocaine’s Origin – Delineation of the Nineteen Major Coca Growing Regions in South America. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 23520, 2016.
- MARTINELLI, L. A. *et al.* Worldwide stable carbon and nitrogen isotopes of Big Mac® patties: An example of a truly “glocal” food. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1712–1718, 2011.
- MARTINELLI, L. A. *et al.* The Use of Carbon and Nitrogen Stable Isotopes to Track Effects of Land-Use Changes in the Brazilian Amazon Region. In: DAWSON, T. E.; SIEGWOLF, R. T. W. (Org.). **Stable Isotopes as Indicators of Ecological Change**. 1. ed. St. Louis: Elsevier, 2007. v. 1. p. 301–318.
- MEIER-AUGENSTEIN, W. **Stable isotope forensics : an introduction to the forensic application of stable isotope analysis**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010.
- NARDOTO, G. B. **Abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ na Amazônia e Cerrado – implicações para a ciclagem de nitrogênio**. Universidade de São Paulo: Tese de Doutorado. 99 f., 2005.
- NARDOTO, G. B. *et al.* Basin-wide variations in Amazon forest nitrogen-cycling characteristics as inferred from plant and soil ^{15}N : ^{14}N measurements. **Plant Ecology & Diversity**, v. 7, n. 1–2, p. 173–187, 2014.
- NARDOTO, G. B. *et al.* Frozen chicken for wild fish: Nutritional transition in the Brazilian Amazon region determined by carbon and nitrogen stable isotope ratios in fingernails. **American Journal of Human Biology**, v. 23, n. 5, p. 642–650, 2011.
- NARDOTO, G. B. *et al.* Tracking geographic patterns of contemporary human diet in Brazil using stable isotopes of nail keratin. In: PARRA, R. *et al.*, **Forensic Science and Humanitarian Action: Interacting with the dead and the living**. New Jersey: Wiley & Sons, 2019. No prelo.
- NARDOTO, G. B. *et al.* Geographical patterns of human diet derived from stable-isotope analysis of fingernails. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 131, n. 1, p. 137–146, 2006.
- NEWSOME, S. D. *et al.* A Niche for Isotope Ecology. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 5, n. 8, p. 429–436, 2007.
- PAULI, J. N. *et al.* Opinion: Why we need a centralized repository for isotopic data. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 12, p. 2997–3001, 2017.
- PEARSON, S. F. *et al.* Effects of elemental composition on the incorporation of dietary nitrogen and carbon isotopic signatures in an omnivorous songbird. **Oecologia**, v. 135, n. 4, p. 516–523, 2003.
- PODLESAK, D. W. *et al.* Turnover of oxygen and hydrogen isotopes in the body water, CO_2 , hair, and enamel of a small mammal. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 72, n. 1, p. 19–35, 2008.
- POUILLY, M. *et al.* Geographical Origin of Amazonian Freshwater Fishes Fingerprinted by $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ Ratios on Fish Otoliths and Scales. **Environmental Science and Technology**, v. 48, p. 8987, 2014.
- POWELL, R. L.; YOO, E.-H.; STILL, C. J. Vegetation and soil carbon-13 isoscapes for South America: integrating remote sensing and ecosystem isotope measurements. **Ecosphere**, v. 3, n. 11, p. art109, 2012.
- PYLE, P.; JONES, S. L.; RUTH, J. M. Molt and aging criteria for four North American grassland passerines. **Biological Technical Publication**, n. BTP-R6011-2008, p. 19, 2008.
- QUILLFELDT, P. *et al.* Differences in stable isotopes in blood and feathers of seabirds are consistent across species, age and latitude: Implications for food web studies. **Marine Biology**, v. 155, n. 6, p. 593–598, 2008.

- REGUEIRA, R. F. S.; BERNARD, E. Wildlife sinks: Quantifying the impact of illegal bird trade in street markets in Brazil. **Biological Conservation**, v. 149, n. 1, p. 16–22, 2012.
- ROYLE, J. A.; RUBENSTEIN, D. R. The role of species abundance in determining breeding origins of migratory birds with stable isotopes. **Ecological Applications**, v. 14, n. 6, p. 1780–1788, 2004.
- RUNDEL, C. W. *et al.* Novel statistical methods for integrating genetic and stable isotope data to infer individual-level migratory connectivity. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 16, p. 4163–4176, 2013.
- SEMINOFF, J. A. *et al.* Stable Isotope Tracking of Endangered Sea Turtles: Validation with Satellite Telemetry and $\delta^{15}\text{N}$ Analysis of Amino Acids. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37403, 2012.
- SENA-SOUZA, J. P.; COSTA, F.J.V.C.; NARDOTO, G.B. Background and the use of isoscapes in the Brazilian context: essential tool for isotope data interpretation and natural resources managing. **Ambiente & Água**, v.14, n. 2, 2019.
- SHIBUYA, E. K. *et al.* Carbon and nitrogen stable isotopes as indicative of geographical origin of marijuana samples seized in the city of São Paulo (Brazil). **Forensic science international**, v. 167, n. 1, p. 8–15, 2007.
- SHIBUYA, E. K. *et al.* Sourcing Brazilian marijuana by applying IRMS analysis to seized samples. **Forensic Science International**, v. 160, n. 1, p. 35–43, 2006.
- SUITS, N. S. *et al.* Simulation of carbon isotope discrimination of the terrestrial biosphere. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 19, n. 1, p. 1-15, 2005.
- TERZER, S. *et al.* Global isoscapes for δH in precipitation: improved prediction using regionalized climatic regression models. **Hydrology Earth System Science**, v. 17, p. 4713–4728, 2013.
- TIESZEN, L.L.; BOUTTON, T.W.; TESDAHL, K.G.; SLADE, N.A. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. **Oecologia**, v.57, p.32-37, 1983.
- TIPPLE, B. J. *et al.* Isolation of strontium pools and isotope ratios in modern human hair. **Analytica Chimica Acta**, v. 798, p. 64–73, 2013.
- TORNIAINEN, J. *et al.* Oxygen and carbon isoscapes for the Baltic Sea: Testing their applicability in fish migration studies. **Ecology and Evolution**, v. 7, n. 7, p. 2255–2267, 2017.
- UNITED NATIONS. **World Drug Report. Analysis of drug markets**. 2018. Disponível em: <<https://www.unodc.org/wdr2018>>. Acesso em: 17 dez. 2018.
- VALENZUELA, L. O. *et al.* Spatial distributions of carbon, nitrogen and sulfur isotope ratios in human hair across the central United States. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 25, n. 7, p. 861–868, 2011.
- VAN DER VEER, G. *et al.* Spatial interpolation of the deuterium and oxygen-18 composition of global precipitation using temperature as ancillary variable. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 101, n. 2, p. 175-184, 2009.
- VELHO, J. A.; BRUNI, A. T.; CAMARGO, M. A.; OLIVEIRA, M. F. Química forense. In: VELHO, J. A. (Org.); GEISER, G. C. (Org.); ESPINDULA, A. (Org.). **Ciências Forenses - Uma introdução às principais áreas da Criminalística Moderna**. 2ª ed. Campinas: Millennium, 2012, p.165-189.
- VELHO, J. A.; GEISER, G. C.; ESPINDULA, A. Introdução às ciências forenses. In: VELHO, J. A. (Org.); GEISER, G. C. (Org.); ESPINDULA, A. (Org.). **Ciências Forenses - Uma introdução às principais áreas da Criminalística Moderna**. 2ª ed. Campinas: Millennium, 2012, p.1-18.
- WASSENAAR, L. I.; HOBSON, K. A. Natal origins of migratory monarch butterflies at wintering colonies in Mexico: New isotopic evidence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 26, p. 15436–15439, 1998.
- WEBSTER, R.; OLIVER, M. A. **Geostatistics for Environmental Scientists**. England: Wiley, 2007.
- WEST, A. G.; FEBRUARY, E. C.; BOWEN, G. J. Spatial analysis of hydrogen and oxygen stable isotopes (“isoscapes”) in ground water and tap water across South Africa. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 145, p. 213–222, 2014.
- WEST, J. B.; SOBEK, A.; EHLERINGER, J. R. A simplified GIS approach to modeling global leaf water isoscapes. **PLoS ONE**, v. 3, n. 6, p. 1-8, 2008.
- WUNDER, M. B. Determining geographic patterns of migration and dispersal using stable isotopes in

keratins. **Journal of Mammalogy**, v. 93, n. 2, p. 360–367, 2012.

WUNDER, M. B. Using Isoscapes to Model Probability Surfaces for Determining Geographic Origins. In: WEST, J. B. *et al.* (Org.). **Isoscapes: Understanding Movement, Pattern, and Process on Earth Through Isotope Mapping**. 1. ed. Amsterdam: Springer Netherlands, 2010. p. 251–270.

WUNDER, M. B.; NORRIS, D. R. Analysis and Design for Isotope-Based Studies of Migratory Animals. *Terrestrial Ecology*. **Terrestrial Ecology**, v.2, n. 7, p. 107-128, 2008.

**Capítulo 2 – Linking environmental indicators to $\delta^{18}\text{O}$ in the Saffron Finch
(*Sicalis flaveola*) tissues in the Central Brazilian savannas**

Linking environmental indicators to $\delta^{18}\text{O}$ in the Saffron Finch (*Sicalis flaveola*) tissues in the Central Brazilian savannas

Abstract

Understanding environmental factors that influence bird biology is essential for assisting the mitigation of bird threatens. While hydrogen stable isotope ratios ($\delta^2\text{H}$) in animal tissues has been widely used, the use of oxygen stable isotope ratios ($\delta^{18}\text{O}$) as spatial and temporal integrative markers, signaling environmental information, is increasing lately. Using $\delta^2\text{H}$ in animal tissue has analytical complications due to the possibility of protein hydrogen exchanging with ambient water vapor hydrogen, while tissue $\delta^{18}\text{O}$ oxygen isotopes has the advantage of not exchanging. We used the Saffron Finch (*Sicalis flaveola*), a resident bird, as a model to understand how seasonal environmental $\delta^{18}\text{O}$ variation is reflected in metabolically active and inactive tissues, and how is it possible to infer key aspects of Saffron Finch ecology from the $\delta^{18}\text{O}$ pattern found. We conducted a periodical sampling in a single location in a highly marked seasonal savanna ecosystem in Central Brazil. We sampled blood, feather, and claw tissues for $\delta^{18}\text{O}$. There was a marked monthly blood $\delta^{18}\text{O}$ variation. The $\delta^{18}\text{O}$ in avian tissues reflected climatic variables during the period that the tissue was formed. $\delta^{18}\text{O}$ in the blood ranged from 12.8 to 20.6 ‰ throughout the sampled period. A more marked molting period incorporates less isotopic variation related to temporal fluctuations in adults than young individuals. Differences in tissues $\delta^{18}\text{O}$ showed to be useful markers of the temporal environmental variation in this seasonal tropical ecosystem, but also the combined information between feather $\delta^{18}\text{O}$ and molting was able to describe some key aspects of the Saffron Finch ecology.

Keywords: oxygen isotopes, annual cycle, bird phenology, molting, Cerrado

Introduction

Tropical regions are known for their episodic and seasonal changes in rainfall. The Central Brazilian savannas is a high biodiversity ecosystem and a hotspot for species conservation, occupying a vast territory in Central Brazil (Mittermeier et al. 2011), locally known as Cerrado. The Cerrado climate is seasonal, marked with a marked dry period and is currently a highly threatened biome due to agricultural conversion. As a result, the region has high levels of endemic and threatened biodiversity (Mittermeier et al. 2011). Cerrado is also a source and route of bird species exploited in the illegal wildlife trade (Destro et al. 2012).

Understanding environmental factors that influence bird populations is essential for assisting conservation actions. Environmental drivers in Cerrado vary temporally and spatially and this drives the distribution of many bird species (Marini et al. 2009). The annual cycle of birds includes periods such as breeding and molting that are also tightly linked to wet-dry seasonality and there is a correlation between the beginning of the rainy period and nesting in the region (Marini et al. 2012). Other environmental features, such as relative humidity and temperature are short-term signals for annual cycles, being related to a fine-tuning in reproduction initiation (Paiva 2008). Understanding linkages between biotic and abiotic processes operating in such highly seasonal environments is tremendously challenging but has been aided considerably through the use of biogeochemical markers. Stable isotope ratios, in particular, have been widely used as spatial and temporal integrative markers, signaling environmental information (Vander Zanden et al. 2016).

Stable isotope ratios of oxygen ($\delta^{18}\text{O}$) and hydrogen ($\delta^2\text{H}$) reflect the origins and routing of water in the hydrosphere (Clark and Fritz 1997). This approach is based on the fact that various well known biogeochemical processes lead to differential discrimination between the heavier and lighter isotopes of these key elements. Values of $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^2\text{H}$ vary in environmental waters due to physical processes linked to the amount of rainfall, continentality, temperature, and altitude (Clark and Fritz 1997, Bowen 2010; Terzer et al. 2013; Baisden et al. 2016). These processes result in spatially explicit patterns or *isoscapes* (West et al. 2010). Isoscapes involving $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^2\text{H}$ are widely used for studies of the hydrogeological cycle (Dasgaard 1964), paleo-records (Anchukaitis et al. 2008), forensic tracking of animal and plant provenance (Meier-Augenstein and Fraser 2008; Chesson et al. 2014), animal migration (Hobson and Wassenaar 2018), and food authentication (Carter and Chesson 2017).

Animal tissues incorporate isotopic signature from local food and water, and for $\delta^{18}\text{O}$, also from the air (Bryant and Froelich 1995). Metabolically inactive tissues such as feathers, hair, and claws fix isotopic signature once formed, and, metabolically active tissues, such as blood and liver,

reflect isotopic signature from various periods of integration (Bearhop et al. 2003). The combination of knowledge of bird molting phenology and large-scale isoscape patterns is usually the basis for applying $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ measurements in animal migration studies (Rubenstein and Hobson 2004). If the bird molts in wintering, or breeding, grounds, it carries local isotopic signature in feather before moving, which can be later examined to infer previous locations or habitat use (Hobson and Wassenaar 1997).

Measurements of the $\delta^2\text{H}$ in feathers of migratory birds demonstrate a strong relationship with amount-weighted meteoric precipitation $\delta^2\text{H}$ at continental scales, especially in North America (Bowen et al. 2005). In South America, the precipitation $\delta^2\text{H}$ isoscape is more complex but has been used to infer avian movements and molt origins at coarser scales (Garcia-Perez et al. 2013; García-Pérez and Hobson 2014). In the Brazilian Central savannas, one study used stable isotope ratios of carbon and nitrogen to differentiate foraging behavior during migration from a migratory and non-migratory congeners bird species (Guaraldo et al. 2016).

Migratory studies using $\delta^2\text{H}$ measurements clarify important aspects about movement and origin of birds (reviewed by Hobson and Wassenaar 2018), and other taxonomic groups, such as insects (Wassenaar and Hobson 1998; Flockhart et al. 2013), bats (Voigt et al. 2013; Cryan et al. 2014), and fish (Soto et al. 2013).

Despite similar physical-chemical processes in hydrology to both $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$, which make their ratios highly correlated in meteoric water, this association is not homogeneous through the organisms (Bryant and Froelich 1995). For humans (Ehleringer et al. 2008), rodents and ungulates (Pietsch et al. 2011), this relationship is strong. Feather of birds in North America correlates strongly with meteoric $\delta^2\text{H}$ while $\delta^{18}\text{O}$ shows a weaker pattern (Hobson and Koehler 2015).

The Saffron Finch (*Sicalis flaveola*) is a small resident species throughout much of South America (Remsen et al. 2016, Piacentini et al. 2015). We focused on the subspecies *S. f. brasiliensis*, which is distributed in northeast and west-central Brazil. Natural habitats of this species include open areas with some shade or forest borders, usually in association with human farms (Palmerio and Massoni 2009). This species is the most frequently found in the illegal wildlife trade confiscations in the Brazilian territory (Alves et al. 2012; Costa et al. 2018). We were interested, then, in factors influencing the $\delta^{18}\text{O}$ composition of feathers in this species in order to inform the use of forensic investigations involving this species. We reasoned that establishing temporal and spatial linkages involving feather $\delta^{18}\text{O}$ patterns in this species would be a first step in evaluating the use of

$\delta^{18}\text{O}$ measurements as both a forensic tool and as a means of investigating the ecology of this and other passerines in the Cerrado of Central Brazil.

Material and Methods

Studied site

We conducted the study at the Tabapuã dos Pireneus farm (15°46'40"S 48°49'22"W; elevation 1,100m asl), in the Municipality of Cocalzinho de Goiás, GO, Brazil. Predominant vegetation are pastures and agriculture, while there are patches of forests along the streams and reservation areas (Cordeiro 2019). It also limits to a 2,822 ha natural area, the Pireneus State Park, with the predominance of savanna and grassland formations (Pinto et al. 2009). Average annual rainfall is about 1,500 mm, and the average annual temperature is 22°C (Figure 1). For the studied period (2016 - 2018), average annual rainfall was 1,415 mm, and the average annual temperature was 21.9 °C (min 9.3 °C, max 35.6 °C). Average air humidity in the dry season was 53.3%, and during the rainy season, it was 71.2%. The predominant climate is the Köppen Aw type, characterized by two distinct seasons: a dry season between April and October, which corresponds to autumn/ winter, and a humid one, with relative heavy rains during the spring/summer period, which corresponds to November to March.

Bird species model

Marques-Santos et al. (2018) describes dull and yellow colored plumages in Saffron-Finch and delayed plumage maturation for both sexes. The male turns yellow after the second year, while females may delay this change. We classified birds as dull (DULL) and yellow (YEL) birds based on a subjective score of their plumage brightness.

Some hollowed gourds are commonly spread out around the houses in the farm, which are used as nests by the Saffron Finches. We checked for overall initiation and ending of reproductive activity (eggs and chicks presence and feeding chicks behavior) in these nests. We observed activity beginning in December and finishing around May that corresponds to the similar reproductive period of Stripe-tailed Yellow-Finch (*Sicalis citrina*; (Gressler and Marini 2011) and other granivorous birds in the region, such as Blue-black Grassquits (*Volatinia jacarina*; Aguilar et al. 2008) and Double-collared Seedeaters (*Sporophila caerulescens*; Francisco 2006). Saffron Finch usually nests 1.8 – 2.5 nests per season and fledges 1.8 – 3.9 chicks in one reproductive season (Marques-Santos et al. 2018).

Bird capture and tissues sampling

We captured wild Saffron Finches with mist nets and marked individuals with numbered metallic bands. In total, we sampled 194 individuals in seven field samplings between January 2017 and March 2018, with a variable number of birds and recaptures (Table 1). We performed field work as detailed below with all captured birds. Laboratory analysis was done with all YEL or recaptured birds, while not all captured DULL were analyzed, as they were in a more elevated number. We visually examined each bird for the presence of body coverts, wing primaries, and tail rectrix growing feathers as signal of molt in these regions.

We collected, from each bird, about 100 μ L of whole blood by wing venipuncture, which was air dried on a glass slide. We collected whole feathers from the left wing (first and tenth primaries – P1, P10, respectively), tail (second rectrix, R2) and body feathers. For some birds, one of these feathers were developing (still with a blood irrigated bulb) which we used for calculating the conversion factor between blood and feather (Quillfeldt et al. 2008).

We cut a 1-2 mm tip fragment of the outer claw from the left foot, in the first two sampling events. We assume the tip would reflect diet from the previous 2 - 5 months (Bearhop et al. 2003). Feather and claw samples were stored in individual plastic bags and tagged.

As flight feathers usually develop sequentially among Passeriformes, from inner to outer feathers (Silveira and Marini 2012), they should reflect incorporated isotope ratios relative to the period of each feather grown. We reasoned it would be possible to find out if there were discrepancies on isotopic ratios between feathers, which would represent individual movements or variations on environmental isotope ratios during the molt.

Recaptured birds blood isotope signal, as a rapidly growing tissue, should follow environmental isotopic variation. As we sampled individual feathers from each bird, recaptured birds had supposedly regrown feathers in the study area.

Stable isotope analyses

Feathers and claws were cleaned with distilled water and a mixture of methanol and chloroform (1:2). We dried keratin tissues, blood, and blood fractions in the oven at 60 °C for 24 hours. We subsampled, weighted (1-2 mg) and packed samples in silver capsules and sent them for oxygen stable isotope analysis at the Davis Isotope Facility, Davis, CA, USA. There, capsules were introduced into a zero blank carousel of a PyroCube (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany). Samples were combusted at 1400 °C in a glassy carbon reactor. CO was separated from any interfering N₂ on an adsorption trap and introduced into an interfaced Isoprime VisION (Isoprime Ltd., Stockport, UK, a unit of Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany) mass spectrometer under helium

flow. IAEA-V9, IAEA-600, USGS-42, USGS-43, USGS-35 were used as laboratory standards. Stable oxygen isotope ratios are expressed in delta (δ) notation relative to VSMOW.

Environmental variables

We obtained daily environmental data from the National Meteorological Institute website for 2016-2018 (INMET 2019). We used variables from the conventional measuring station located in the city of Brasilia (Federal District), about 120 km apart from the study site. Data were downloaded from the following environmental variables: precipitation (mm), maximum temperature ($^{\circ}\text{C}$), minimum temperature ($^{\circ}\text{C}$), insolation (hours), average temperature compensated ($^{\circ}\text{C}$), average relative humidity (%), average wind speed (MPS).

Statistical analyses

Blood is turned over continuously, and total replacement is estimated to about one month for a small passerine (Hobson and Clark 1992; Bearhop et al. 2002). Our sampling intervals were about two months or more, so we used blood isotopic results as independent temporal variables. We used the robust Brown-Forsythe Levene-type test for testing equality of group variances and Shapiro-Wilk for testing for normality. As months groups isotopic data were not normal distributed, we used the non-parametric tests: Kruskal Wallis sum test for comparing between DULL and YEL groups and between monthly observations of blood and claw $\delta^{18}\text{O}$, and Wilcoxon rank sum tests as *pos hoc* pairwise comparisons. We used the “fdr” p-value adjustment method.

Feathers once formed maintain their isotopic composition. Feather isotopic results correspond to diet and/or environmental conditions during molt. From field observations, it was possible to estimate general patterns of molt, but it was not possible to know individual bird molting dates, which prevented us from drawing any statistical inferences about a timely variation on this tissue.

To check for correspondence in $\delta^{18}\text{O}$ values among feathers, we performed Spearman correlation tests between different feathers isotopic ratios. For P1 feathers, we had samples analyzed from January/2017, March/2017, and May/2017, for body feathers, we had samples analyzed from January and for claw, from January and March. We calculated conversion factors between growing feathers and blood using the equation: $\Delta_{dt} = \delta_{(tissue)} - \delta_{(blood)}$ (paired t test). As suggested by Vander Zanden et al. (2014), the regression equation estimating the relationship between tissues was derived. This should support future studies using these tissues.

To understand climate effects on the blood $\delta^{18}\text{O}$, we built models with a different set of environmental variables as predictors of blood $\delta^{18}\text{O}$. We used 21 combinations of different predictors and selected the best model using Akaike's Information Criterion (AIC) (Burnham and Anderson 2002).

Results

Molting observations

YEL birds showed a consistent pattern of primary molt in a short period. Molts were detected in May (1 molting in 5 – 20 %) and July (5 molting in 7 – 71.4% - Figure 2A, middle circle), after the breeding season. In contrast, DULL birds spread out their molting over three months. Molts were detected in January (1 molting in 8 – 12.5 %), March (1 molting in 42 – 2.4%, considering 2017 and 2018), and May (3 molting in 39 – 7.7%, - Figure 2A, inner circle). Less than 5% of DULL birds were detected wing molting in total (5 molting in 95, in all year), probably because first-year DULL birds may only molt after turning yellow adult birds (by molting body feathers first), so molting should account to yellow categories.

Feathers from tail and body, showed a more protracted molt pattern through the year, having a less structured molting period. YEL tail molts were detected in March (1 molting in 12 – 8.3%), July (5 molting in 7, 71.4%), and December (1 molting in 8, 12.5% - Figure 2B, middle circle). DULL tail molts were detected in March (5 molting in 42 – 11.9 %, %, considering 2017 and 2018), May (8 molting in 39 – 20.5 %), July (5 molting in 15 – 33.3 %) and October (1 molting in 13 – 7.7 %). YEL body molts were detected in January (2 molting in 10, 20%), March (1 molting in 12, 8.3%, %, considering 2017 and 2018), May (1 molting in 5, 20%) and July (3 molting in 7, 42.8% - Figure 2C, middle circle). DULL body molts were detected in March (8 molting in 42 – 19%, %, considering 2017 and 2018), May (1 molting in 39 – 2.6%), July (6 molting in 15 – 40%) and October (3 molting in 13 – 23% - Figure 2C, inner circle).

$\delta^{18}\text{O}$ differences in bird categories and months of collection

Blood $\delta^{18}\text{O}$ in YEL and DULL categories were not different (Kruskal-Wallis chi-squared = 0.49, df = 1, $p = 0.482$). Blood $\delta^{18}\text{O}$ showed extensive variation throughout the year (12.8 to 20.6 ‰) and monthly blood $\delta^{18}\text{O}$ values were significantly different (Kruskal-Wallis chi-squared =

105.52, $df = 6$, $p = 2.2e-16$ - Figure 3, A and B, Table 2). After *Post Hoc* pairwise comparisons between months using Wilcoxon rank sum test, only July/2017 and October/2017 were not different (Table 2).

The P10 and R2 feathers for all categories showed similar isotopic ranges to blood (P10: 10.2 to 19.0 ‰; R2: 10.3 to 19.5 ‰ (Figure 3, C to F). However, for P10 feathers, YEL birds had a smaller range (13.0 to 18.6 ‰) than DULL (10.2 to 19.0 ‰, Figure 3, C and D).

Claws $\delta^{18}\text{O}$ sampled in Jan and March 2017 averaged $14.1\text{‰} \pm 0.86$, and were not significantly different between YEL and DULL categories (Kruskal-Wallis chi-squared = 0.69, $df = 1$, $p = 0.41$) or among months (Kruskal-Wallis chi-squared = 2.29, $df = 1$, $p = 0.13$, Figure S1, Supplemental Material).

$\delta^{18}\text{O}$ correlations between tissues

On average, blood $\delta^{18}\text{O}$ values were 2.5 ‰ more positive than new grown feathers ($t = -9.9$, $df = 7$, $p < 0,001$; $y = 4.7 + 0.6 x$). Feather P1 $\delta^{18}\text{O}$ showed a positive and significant correlation with P10 $\delta^{18}\text{O}$ (Figure 4, A). Feather R2 $\delta^{18}\text{O}$ also showed a positive, but weaker correlation with P10 $\delta^{18}\text{O}$ (Figure 4, B). Body feathers $\delta^{18}\text{O}$ were not correlated with P10 $\delta^{18}\text{O}$ (Figure 4, C).

Correlations to Environmental Variables

Temporal variation in blood $\delta^{18}\text{O}$ was related to climatic variables. The most parsimonious model included minimum temperature, precipitation, wind velocity, air relative humidity, insolation, and second model includes minimum temperature, precipitation and wind velocity. Third and fourth models also included minimum temperature, precipitation, and air relative humidity, but not wind velocity (Table 3).

Discussion

Our results show that $\delta^{18}\text{O}$ values in avian tissues reflect climatic variables in their environment, tracking their changes through time. Together, temperature, precipitation, wind velocity, air relative humidity, and the insolation are strongly related to $\delta^{18}\text{O}$ in blood. The $\delta^{18}\text{O}$ pattern reflected the molting pattern as well as corroborates the resident behavior of Saffron Finches in this seasonal tropical region in Central Brazil.

Climatic factors show to be important drivers of Saffron Finch $\delta^{18}\text{O}$ variation throughout time. Similarly, sheep wool $\delta^{18}\text{O}$ revealed to be a good proxy for seasonal variability and useful as a short-term proxy for climate in Ireland. $\delta^{18}\text{O}$ was the isotopic ratio that most reflected seasonal variation, compared to $\delta^2\text{H}$, $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$. Sheep wool in Ireland reflected climate more than cattle as they find most of their needed water in plant they eat (Zazzo et al. 2015).

Blood isotopic values of the Saffron Finch showed the variations between the rainy and dry periods, as well as their transitions, but specially the monthly variations within these two periods. Zazzo et al. (2015) also found an evident seasonal variation in oxygen isotopes from sheep wool. Our findings are consistent with a cyclic annual pattern of oxygen isotopic variation, however, a mixture of a set of environmental variables, is a good explanation for blood isotopic variation, not depending solely on precipitation.

Because blood reflects these temporal variations in $\delta^{18}\text{O}$, it is a good marker for making ecological inferences over a short period of time. Molting time exhibits different patterns in dull and yellow birds. For wing feathers, yellow birds show a short molting period, while dull birds show a more spread pattern. Isotopic ratios in feathers indicate this difference, having more variable values in dull than in yellow birds. This relationship confirms that a more marked period of tissue growing incorporates less variation related to temporal fluctuations.

Moreover, the correlation between body, rectrices, and wing feathers isotopic values show different degrees of strength, from no correlation to strong correlation. Considering the molting of the wing, from proximal to distal positions, P1 and P10 $\delta^{18}\text{O}$ correlation show that these feathers molting is not timely or spatially far apart, confirming Saffron Finch residency and molting happening in short periods. Other tissues isotopic signals are not so strongly correlated with P1. This result has practical applications for forensic or provenance studies: feather sampling should favor wing primaries instead of feathers from other parts of the body. However, this generalization depends on the molting regimen of other birds.

We found a -2.5‰ tissue to tissue conversion factor between blood and feather, which falls into the range between -1.4 and -3.5‰ reported for House Sparrow between plasma and red blood cells, respectively, and feathers (Wolf et al. 2011). As both bird species are similar in size and feeding habits, these results are compatible. Claw isotopic signals findings cannot be directly paralleled to other tissues, as they reflect 2-5 months before sampling, which does not overlap to other tissues

sampled. However, despite the small sample size, they seem to be a good time integration tissue, as their isotopic ratio variation is smaller than other tissues.

Animal incorporates $\delta^{18}\text{O}$ from different sources, mainly from free water, metabolic oxygen from food, and inhaled atmospheric O_2 . Differences in importance of these inputs are related to species ecology and physiology and the amount of water ingestion necessity. Studies account that larger animals are more prone to ingest more water than small animals (Bryant and Froelich 1995), but climate may also affect water ingestion, mainly temperature and humidity (Abeni et al. 2015). Animals adapted to dry habitats ingest less water than animals in humid habitats (Bryant and Froelich 1995). The less water ingested, the less influence of meteoric isotopic values in tissues.

If a higher proportion of body oxygen originates from food sources, there are many other uncertainties related to vegetal or animal food items. Plant $\delta^{18}\text{O}$ assimilation is related to many factors, as soil isotopic signature, temperature and hydraulic properties of the plant. The relative humidity is closely related to isotopic enrichment in water leaves (reviewed by Cernusak et al. 2016). Different preys may accumulate $\delta^{18}\text{O}$ differently, as animals are subject to these factors explained here (Pietsch et al. 2011). Moreover, it is difficult to estimate relative quantities of food items ingested and digested and absorbed by animals.

When inside the body, oxygen reacts with many carbohydrate, protein and fat substances, generating water and carbon dioxide. Liquid water generated is eliminated mainly as urine, fecal water, and sweat, which are in equilibrium with total body water not affecting its $\delta^{18}\text{O}$ values. However, transcutaneous water loss and water vapor elimination in breathe processes fractionate oxygen molecules and $\delta^{18}\text{O}$ from CO_2 eliminated in breath is a lot more positive than in body water (Bryant and Froelich 1995). CO_2 elimination in breath depends on acidic equilibrium in blood and on thermoregulation, which in turn, depends on climatic factors. So, environmental factors may play a role in many different phases of isotopic tissue assimilation. It is impossible to predict, from this work, which these pathways are the more relevant for Saffron Finch $\delta^{18}\text{O}$ composition.

Although results presented here may be specific to this location, ecosystem, and species, they open an avenue for incorporating another tool to the isotopic toolbox for ecological (Vander Zanden et al. 2016) and forensic wildlife studies. The $\delta^{18}\text{O}$ can be used as an isotopic clock. Analyzing keratinous tissues, such as feathers, in known origin individuals, may allow inferences of their growing interval, based in past environmental observations, which can help studies on molting chronology or other phenological studies. For plants, Ohashi et al. (2016) found that $\delta^{18}\text{O}$ temporal

variation in wood cellulose in the Amazon Forest follows ^{14}C dating and can be used for cross-dating tree species in seasonal and inter-annual scales, but different regional patterns were found. Confronted to other isotopes, such as $\delta^2\text{H}$, that return geographic information, time information may constrain specific periods, making assignment possible, even when using continuously growing tissues, such as claw and fur (Zazzo et al. 2015), or making origin assignment more precise by delimitating samples with a less time window variation.

Further studies may expand the knowledge of how different organisms track changes in the environment using $\delta^{18}\text{O}$. Additional findings may help understand time frames integration and develop more ecologic and forensic applications based on oxygen isotopes.

Acknowledgements: This study was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and Edital Capes Pro-Forense/2014 (grant number 23038.006832/2014-11). We thank to Tabapuã do Pireneus farm and workers and volunteers who helped in field work. ICMBio for authorizing animal sampling (license number 8745-1).

References

- Abeni F, Petrera F, Capelletti M, et al (2015) Hydrogen and oxygen stable isotope fractionation in body fluid compartments of dairy cattle according to season, farm, breed, and reproductive stage. *PLoS One* 10:e0127391. doi: 10.1371/journal.pone.0127391
- Aguilar TM, Dias RI, Oliveira AC, Macedo RH (2008) Blue-black Grassquit nest-site selection in a Neotropical savanna: do choices influence nest success? *J. Field Ornithol.* 79: 24–31.
- Alves RRN, De Farias Lima JR, Araujo HFP (2012) The live bird trade in Brazil and its conservation implications: an overview. *Bird Conserv Int* 1–13. doi: 10.1017/S095927091200010X
- Anchukaitis KJ, Evans MN, Wheelwright NT, Schrag DP (2008) Stable isotope chronology and climate signal calibration in neotropical montane cloud forest trees. *J Geophys Res* 113:3030. doi: 10.1029/2007JG000613
- Baisden WT, Keller ED, Van Hale R, et al (2016) Precipitation isoscapes for New Zealand: enhanced temporal detail using precipitation-weighted daily climatology†. *Isotopes Environ Health Stud* 52:343–352. doi: 10.1080/10256016.2016.1153472

- Bearhop S, Furness RW, Hilton GM, et al (2003) A Forensic Approach to Understanding Diet and Habitat Use from Stable Isotope Analysis of (Avian) Claw Material. *Funct Ecol* 17:270–275
- Bearhop S, Waldron S, Votier SC, Furness RW (2002) Factors that influence assimilation rates and fractionation of nitrogen and carbon stable isotopes in avian blood and feathers. *Physiol Biochem Zool* 75:451–458. doi: 10.1086/342800
- Bowen GJ (2010) Isoscapes: Spatial Pattern in Isotopic Biogeochemistry. *Annu Rev Earth Planet Sci* 38:161–87. doi: 10.1146/annurev-earth-040809-152429
- Bowen GJ, Wassenaar LI, Hobson KA (2005) Global application of stable hydrogen and oxygen isotopes to wildlife forensics. *Oecologia* 143:337–48. doi: 10.1007/s00442-004-1813-y
- Bryant JD, Froelich PN (1995) A model of oxygen isotope fractionation in body water of large mammals. *Geochim Cosmochim Acta* 59:4523–4537. doi: 10.1016/0016-7037(95)00250-4
- Burnham KP, Anderson, DR (2002) Model selection and multimodel inference: A practical information-theoretic approach. New York: Springer-Verlag.
- Carter JF, Chesson LA (2017) Chapter 2: Sampling, sample preparation and analysis. In: *Food Forensics*. CRC Press, 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742, pp 22–45
- Cernusak LA, Barbour MM, Arndt SK, et al (2016) Stable isotopes in leaf water of terrestrial plants. *Plant Cell Environ* 39:1087–1102. doi: 10.1111/pce.12703
- Chesson LA, Tipple BJ, Howa JD, et al (2014) Stable Isotopes in Forensics Applications. In: *Treatise on Geochemistry*. Elsevier, pp 285–317
- Clark I, Fritz P (1997) The environmental isotopes. In: *Environmental isotopes in hydrogeology*. Lewis Publishers, pp 1–33
- Cordeiro GG (2019) Uso do $\delta^{13}\text{C}$ como indicador da influência de pastagens cultivadas em zonas ripárias na bacia do Alto Corumbá. Universidade de Brasília
- Costa FJV, Ribeiro RE, De Souza CA, Navarro RD (2018) Espécies de Aves Traficadas no Brasil. *Front J Soc Technol Environ Sci* 7:324–346. doi: 10.21664/2238-8869.2018v7i2.p324-346
- Cryan PM, Stricker CA, Wunder MB (2014) Continental-scale, seasonal movements of a heterothermic migratory tree bat. *Ecol Appl* 24:602–616. doi: 10.1890/13-0752.1

- Dansgaard W (1964) Stable isotopes in precipitation. *Tellus* 16:436–468. doi: 10.3402/tellusa.v16i4.8993
- Destro GFG, Lucena T, Monti R, et al (2012) Efforts to Combat Wild Animals Trafficking in Brazil. *Biodivers Enrich a Divers World* 1542:33–36. doi: 10.5772/48351
- Ehleringer JR, Bowen GJ, Chesson LA, et al (2008) Hydrogen and oxygen isotope ratios in human hair are related to geography. *Proc Natl Acad Sci* 105:2788–2793. doi: 10.1073/pnas.0712228105
- Flockhart DTT, Wassenaar LI, Martin TG, et al (2013) Tracking multi-generational colonization of the breeding grounds by monarch butterflies in eastern North America. *Proc R Soc B Biol Sci* 280:20131087–20131087. doi: 10.1098/rspb.2013.1087
- Francisco, M. R. 2006. Breeding biology of the Double-collared Seedeater (*Sporophila caerulescens*). *Wilson J. Ornithol.* 118: 85–90.
- García-Pérez B, Hobson K a. (2014) A multi-isotope ($\delta^2\text{H}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) approach to establishing migratory connectivity of Barn Swallow (*Hirundo rustica*). *Ecosphere* 5:1–12. doi: 10.3161/000164514X682896
- Garcia-Perez B, Hobson KA, Powell RL, et al (2013) Switching Hemispheres: A New Migration Strategy for the Disjunct Argentinean Breeding Population of Barn Swallow (*Hirundo rustica*). *PLoS One* 8:e55654. doi: 10.1371/journal.pone.0055654
- Gressler DT, Marini MÂ (2011) Breeding biology of the Stripe-tailed Yellow-Finch (*Sicalis citrina*) in central Brazilian cerrado. *Ornitol Neotrop* 22:319–328
- Guaraldo AC, Kelly JF, Marini M (2016) Contrasting annual cycles of an intratropical migrant and a tropical resident bird. *J Ornithol* 157:695–705. doi: 10.1007/s10336-016-1327-5
- Hobson KA, Clark RG (1992) Assessing Avian Diets Using Stable Isotopes I: Turnover of ^{13}C in Tissues. *Condor* 94:181–188. doi: 10.2307/1368807
- Hobson KA, Koehler G (2015) On the use of stable oxygen isotope (D18O) measurements for tracking avian movements in North America. *Ecol Evol* 5:799–806. doi: 10.1002/ece3.1383
- Hobson KA, Wassenaar LI (1997) Linking breeding and wintering grounds of neotropical migrant songbirds using stable hydrogen isotopic analysis of feathers. *Oecologia* 109:142–148. doi: 10.1007/s004420050068

- Hobson KA, Wassenaar LI (2018) Tracking animal migration with stable isotopes, 2nd. Academic Press
- Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) Available in: <http://www.inmet.gov.br/>, download in April/15/2019
- Lovette IJ, Fitzpatrick JW (2016) Handbook of Bird Biology. Wiley
- Marini MÂ, Barbet-Massin M, Lopes LE, Jiguet F (2009) Predicted climate-driven bird distribution changes and forecasted conservation conflicts in a neotropical savanna. *Conserv Biol* 23:1558–1567. doi: 10.1111/j.1523-1739.2009.01258.x
- Marini MÂ, Borges FJA, Lopes LE, et al (2012) Breeding biology of birds in the Cerrado. *Ornitol Neotrop* 23:385–405
- Marques-Santos F, Wischhoff U, Roper JJ, Rodrigues M (2018) Delayed plumage maturation explains differences in breeding performance of Saffron Finches. *Emu* 118:323–333. doi: 10.1080/01584197.2018.1450637
- Meier-Augenstein W, Fraser I (2008) Forensic isotope analysis leads to identification of a mutilated murder victim. *Sci Justice* 48:153–159. doi: 10.1016/j.scijus.2007.10.010
- Mittermeier RA, Turner WR, Larsen FW, et al (2011) Global Biodiversity Conservation: The Critical Role of Hotspots. In: *Biodiversity Hotspots*. pp 3–22
- Ohashi S, Durgante FM, Kagawa A, et al (2016) Seasonal variations in the stable oxygen isotope ratio of wood cellulose reveal annual rings of trees in a Central Amazon terra firme forest. *Oecologia* 180:685–696. doi: 10.1007/s00442-015-3509-x
- Paiva LV De (2008) Fatores que determinam o período reprodutivo de *Elaenia chiriquensis* (Aves: Tyrannidae) no cerrado do Brasil central. Tese: Universidade de Brasília.
- Palmerio AG, Massoni V (2009) Reproductive Biology of Female Saffron Finches does not Differ by the Plumage of the Mate. *Condor* 111:715–721. doi: 10.1525/cond.2009.080044
- Piacentini V de Q, Aleixo A, Agne CE, et al (2015) Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee / Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. *Rev Bras Ornitol* 23:91–298
- Pietsch SJ, Hobson KA, Wassenaar LI, Tü Tken T (2011) Tracking Cats: Problems with Placing Feline

Carnivores on d. doi: 10.1371/journal.pone.0024601

- Pinto JRR, Lenza E, Pinto A de S (2009) Composição florística e estrutura da vegetação arbustivo-arbórea em um cerrado rupestre, Cocalzinho de Goiás, Goiás. *Rev Bras Botânica* 32:1–10. doi: 10.1590/s0100-84042009000100002
- Quillfeldt P, Bugoni L, McGill RAR, et al (2008) Differences in stable isotopes in blood and feathers of seabirds are consistent across species, age and latitude: Implications for food web studies. *Mar Biol* 155:593–598. doi: 10.1007/s00227-008-1048-2
- Remsen J V., Jr. JI, Areta CD, et al (2016) A classification of the bird species of South America. American Ornithologists' Union. In: South Am. Classif. Comm. <http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.htm>. Accessed 23 Dec 2016
- Rubenstein DR, Hobson KA (2004) From birds to butterflies: Animal movement patterns and stable isotopes. *Trends Ecol Evol* 19:256–263. doi: 10.1016/j.tree.2004.03.017
- Silveira, MB, Marini, MA (2012) Timing, Duration, and Intensity of Molt in Birds of a Neotropical Savanna in Brazil. *Condor* 114:435–448. doi: 10.1525/cond.2012.110022
- Soto DX, Wassenaar LI, Hobson KA (2013) Stable hydrogen and oxygen isotopes in aquatic food webs are tracers of diet and provenance. *Funct Ecol* 27:535–543. doi: 10.1111/1365-2435.12054
- Terzer S, Wassenaar LI, Araguás-Araguás LJ, Aggarwal PK (2013) Global isoscapes for δ H in precipitation: improved prediction using regionalized climatic regression models. *Hydrol Earth Syst Sci* 17:4713–4728. doi: 10.5194/hess-17-4713-2013
- Vander Zanden HB, Tucker AD, Bolten AB, et al (2014) Stable isotopic comparison between loggerhead sea turtle tissues. *Rapid Commun Mass Spectrom* 28:2059–2064. doi: 10.1002/rcm.6995
- Vander Zanden HB, Soto DX, Bowen GJ, Hobson KA (2016) Expanding the Isotopic Toolbox: Applications of Hydrogen and Oxygen Stable Isotope Ratios to Food Web Studies. *Front Ecol Evol* 4:20. doi: 10.3389/fevo.2016.00020
- Voigt CC, Schneeberger K, Luckner A (2013) Ecological and dietary correlates of stable hydrogen isotope ratios in fur and body water of syntopic tropical bats. *Ecology* 94:346–355. doi: 10.2307/23435982

- Wassenaar LI, Hobson KA (1998) Natal origins of migratory monarch butterflies at wintering colonies in Mexico: New isotopic evidence. *Proc Natl Acad Sci* 95:15436–15439. doi: 10.1073/pnas.95.26.15436
- West JB, Bowen GJ, Dawson TE, Tu KP (2010) *Isoscapes: Understanding Movement, Pattern, and Process on Earth Through Isotope Mapping*. Springer Dordrecht Heidelberg, London
- Wolf N, Bowen GJ, del Rio CM (2011) The influence of drinking water on the δ D and $\delta^{18}\text{O}$ values of house sparrow plasma, blood and feathers. *J Exp Biol* 214:98–103. doi: 10.1242/jeb.050211
- Zazzo A, Cerling TE, Ehleringer JR, et al (2015) Isotopic composition of sheep wool records seasonality of climate and diet. *Rapid Commun Mass Spectrom* 29:1357–1369. doi: 10.1002/rcm.7228

Table 1 – Numbers of Saffron Finch individuals captured in each field sampling, between January – 2017 and March 2018. Birds were captured with mist nets at the Tabapuã dos Pireneus farm (15°46'40"S 48°49'22"W), in the Municipality of Cocalzinho de Goiás, GO, Brazil. Blood and feather were analyzed for $\delta^{18}\text{O}$.

Month	Year	Number Captured	Number Recaptured	Number analyzed
January	17	18		18
March	17	37	3	26
May	17	44	2	21
July	17	22	8	16
October	17	17	2	13
December	17	30	5	16
March	18	26	3	25
Total		194	23	135

Table 2 – Pairwise Wilcoxon rank sum p-value from test results for comparison between sampling months (January, March, May, July, October and December – 2017 and March - 2018) of blood $\delta^{18}\text{O}$ from Saffron Finch. Birds were captured and sampled at the Tabapuã dos Pireneus farm (15°46'40"S 48°49'22"W), in the Municipality of Cocalzinho do Goiás, GO, Brazil. The symbol (*) highlights the unique pair of months that were not different.

	Jan/2017	Mar/2017	May/2017	Jul/2017	Oct/2017	Dec/2017
Mar/2017	2.9e-05	-	-	-	-	-
May/2017	0.0204	1.8e-07	-	-	-	-
Jul/2017	0.0013	0.0180	1.0e-08	-	-	-
Oct/2017	0.0016	0.0278	6.0e-08	0.6451*	-	-
Dec/2017	1.7e-06	7.2e-07	1.4e-06	2.9e-06	9.1e-06	-
Mar/2018	6.2e-07	9.8e-07	2.6e-07	2.6e-06	9.1e-06	7.6e-05

Table 3 – Models AIC results from environmental effects on blood $\delta^{18}\text{O}$ from 133 Saffron Finches. Models were evaluated using AIC ranking between models (ΔAIC) and AIC weight. Birds were captured and sampled at the Tabapuã dos Pireneus farm (15°46'40"S 48°49'22"W), in the Municipality of Cocalzinho do Goiás, GO, Brazil. Sampling was made in January, March, May, July, October and December – 2017 and March – 2018. Wind = wind velocity; Min temp = minimum daily temperature; Prec = daily amount of precipitation; Temp range = daily temperature range.

Adj. r^2	ΔAIC	AIC	weight	models
0.82	0.0	344.6	0.51	Insolation+ Humidity + Wind + Min temp + Prec
0.81	0.1	344.7	0.48	Wind + Min temp + Prec
0.80	8.8	353.3	0.01	Humidity + Min temp + Prec
0.80	10.5	355.1	0.00	Insolation+ Humidity + Min temp + Prec
0.79	15.4	359.9	0.00	Insolation+ Humidity + Wind + Temp range + Prec
0.77	29.9	374.4	0.00	Insolation + Min temp + Prec
0.75	37.5	382.0	0.00	Humidity + Temp range + Prec
0.75	38.3	382.9	0.00	Insolation + Humidity + Temp range + Prec
0.73	47.7	392.3	0.00	Min temp + Prec
0.60	98.0	442.6	0.00	Prec
0.60	99.8	444.4	0.00	Temp range + Prec
0.48	137.4	482.0	0.00	Insolation + Humidity + Wind + Tr
0.46	139.6	484.2	0.00	Insolation + Wind
0.46	140.1	484.7	0.00	Insolation + Humidity + Wind
0.46	141.0	485.5	0.00	Insolation + Ven + Humidity + Min temp
0.44	146.5	491.0	0.00	Insolation + Humidity + Temp range
0.44	146.8	491.3	0.00	Insolation + Humidity + Min temp
0.30	173.1	517.6	0.00	Insolation
-0.001	221.4	565.9	0.00	Min temp
-0.007	222.2	566.7	0.00	Wind

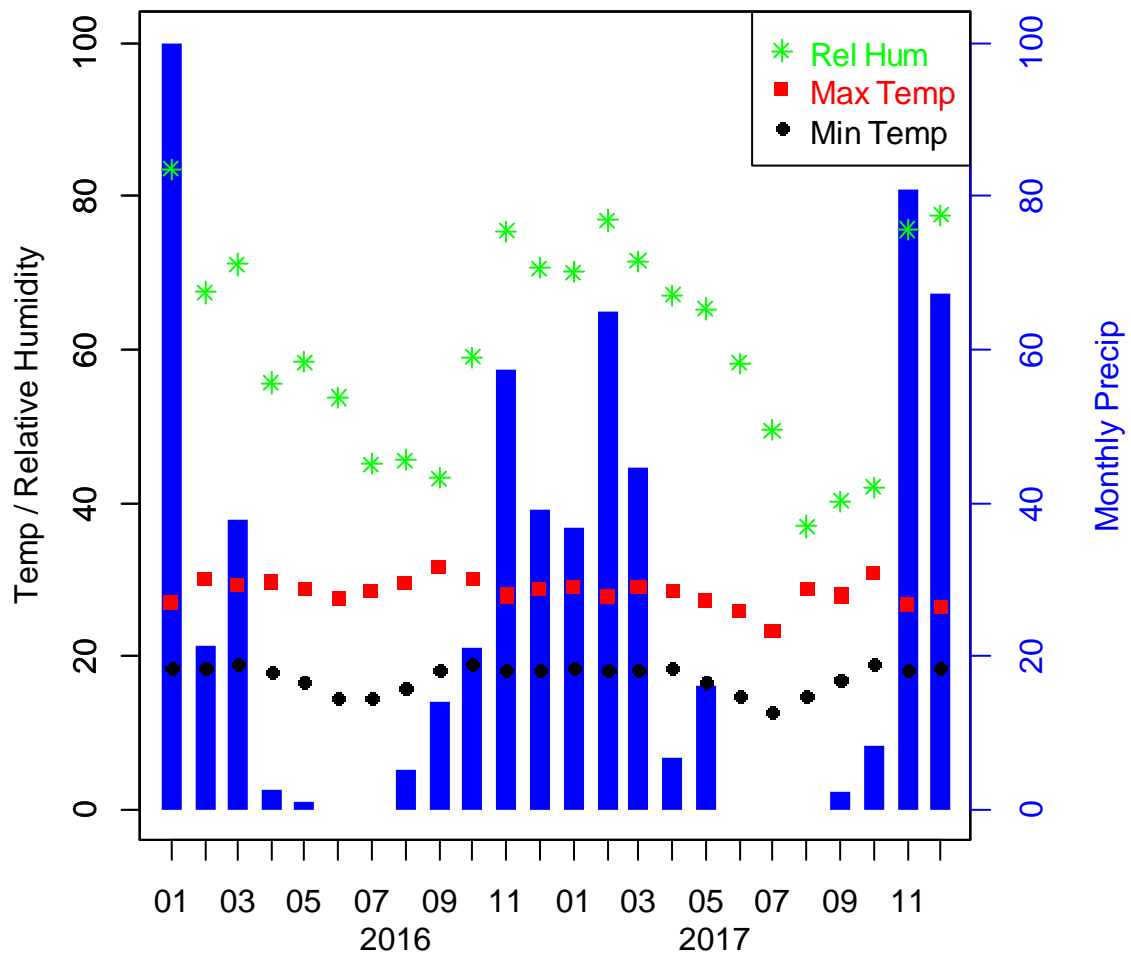


Figure 1 – Environmental variables for Brasilia weather forecast station, (National Meteorological Institute - 15°47'24.9"S 47°55'22.9"W). Numbers in horizontal axe are months from 2016 and 2017. Rel Hum = relative humidity; Max Temp = maximum temperature; Min Temp = minimum temperature; Precip = amount of precipitation.

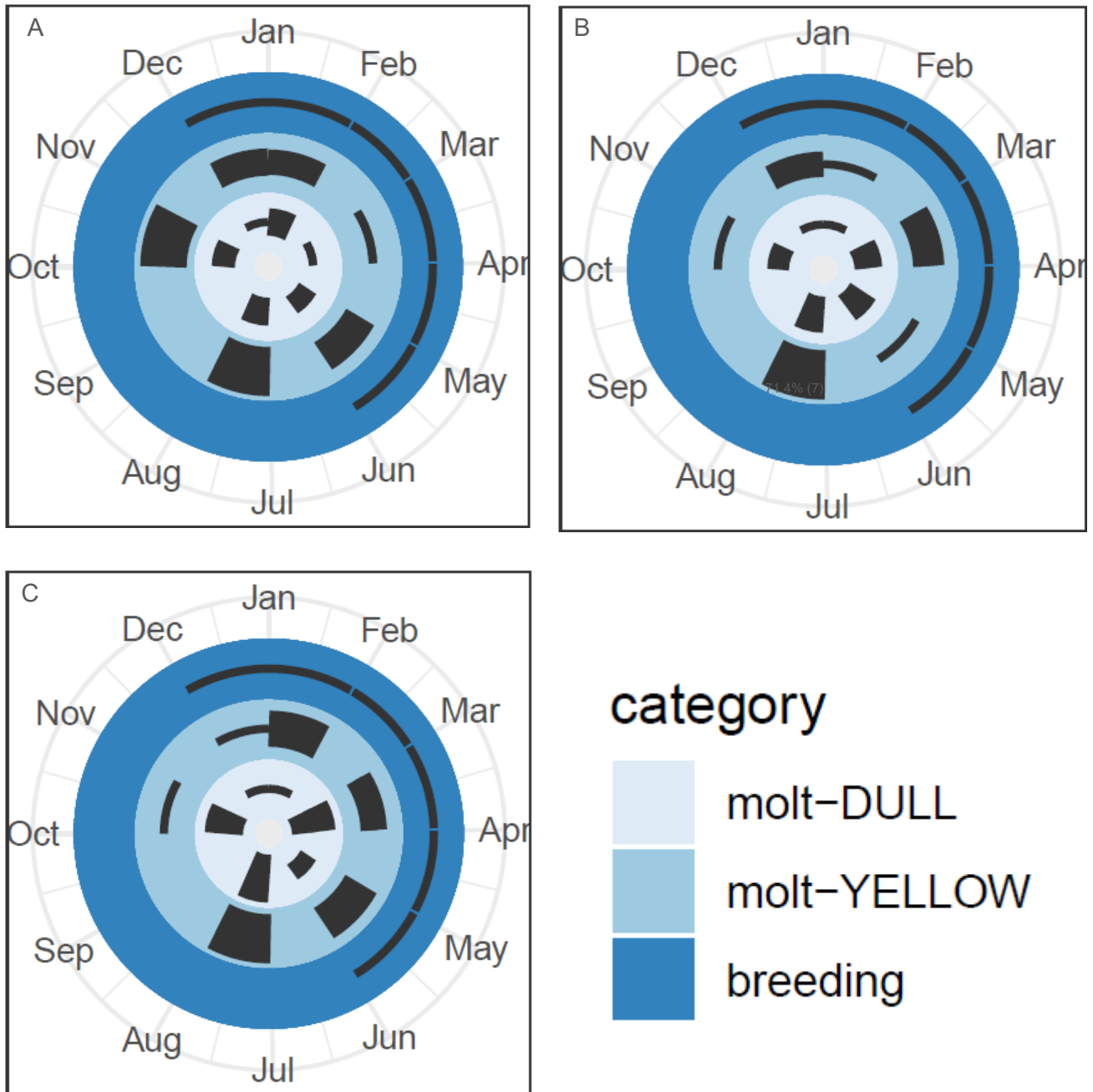


Figure 2 – Percentage of captured birds exhibiting molting in each category (DULL and YEL) and body region: A. wing; B. tail; C. body. Thinner traces represent zero percentages or breeding season. Months representations are plotted in a clockwise direction. See text for sampling numbers and percentages values.

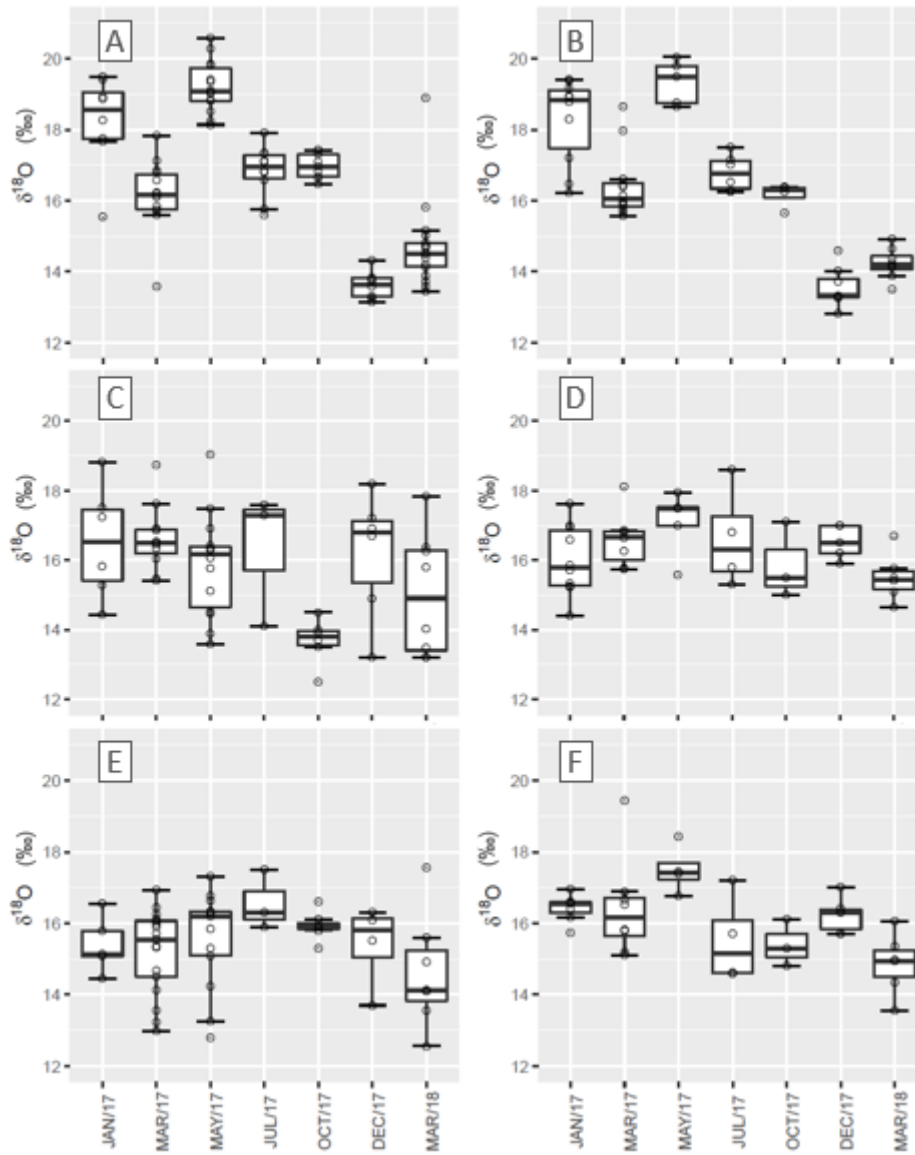


Figure 3 - Boxplots of $\delta^{18}\text{O}$ in bird categories and tissues by month collected. A. Blood of dull birds; B. Blood of yellow birds; C. P10 primary of dull birds; D. P10 primary of yellow birds; E. R2 rectrix of dull birds and F. R2 rectrix of yellow birds. Points are individual observations.

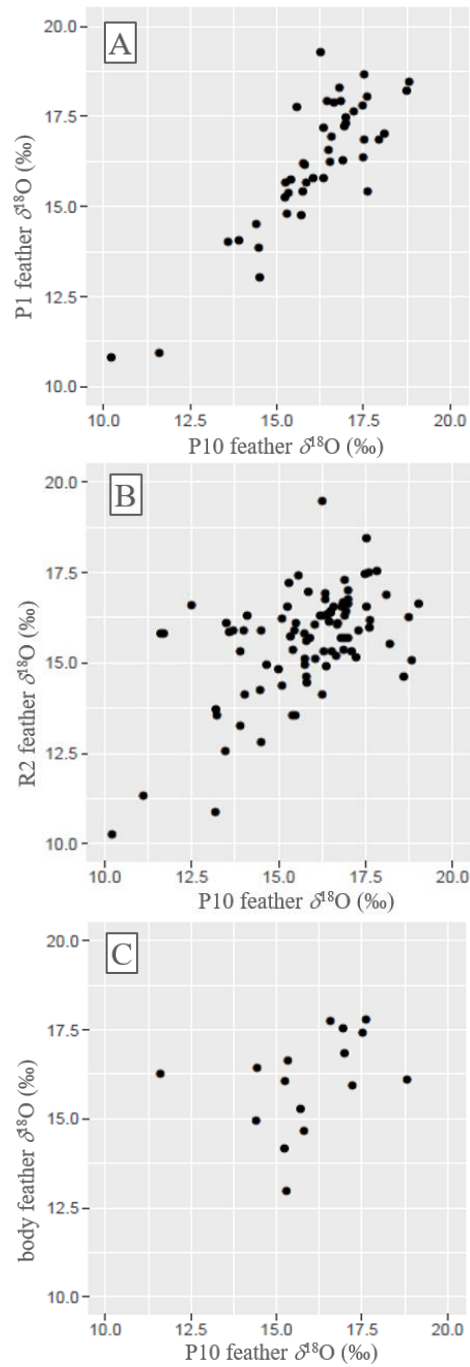


Figure 4 – Correlation between feathers $\delta^{18}\text{O}$ from different parts of the body of the Saffron Finch. A. P10 and P1 primaries ($r^2=0.75$, $n=43$, $p=2.692\text{e-}09$), B. P10 and R2 feathers $\delta^{18}\text{O}$ ($r^2=0.45$, $n=86$, $p=9.124\text{e-}06$) and C. P10 and body feathers ($r^2=0.47$, $n=14$, $p=0.067$).

Supplemental Material

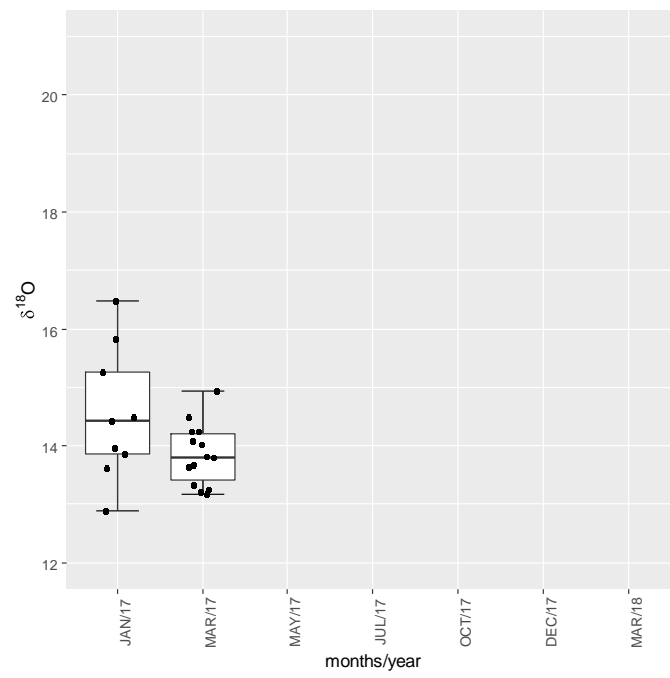


Figure S1 - Boxplot of $\delta^{18}\text{O}$ in claws from Saffron Finch for January/2017 and March/2017.

**Capítulo 3 – A regional oxygen isoscape in the Neotropics using mammal
hair**

A regional oxygen isoscape in the Neotropics using mammal hair

Abstract

Illegal Wildlife Trade (IWT) is a significant issue worldwide with several consequences associated with conservation. Wildlife forensic science has been using endogenous markers as tools for predicting the geographical provenance of seized animals, mainly genetic markers and stable isotopes. Using these markers mostly depends on the distribution of the species of interest and when/where the tissue of interest is formed. Studies using regional isoscapes are a global trend since global models are predicted from a larger scale that ends up underestimating regional variability. We present a regional isoscape approach using a regional spatial model based on stable oxygen isotopes for Cerrado and Pantanal. We collected mammal hair stable isotope data to construct the regional isoscape. Mammal hair $\delta^{13}\text{C}$ and body weight/size ratio associated with environmental variables underlined the constructed $\delta^{18}\text{O}$ isoscape. The isoscape ranged 6‰, which is consistent with previously variation seen in meteoric water $\delta^{18}\text{O}$ for this region. However, it showed a more pronounced longitudinal pattern, indicating a more refined geographic variation. Road-killed mammals as well as museums specimen tissues are primarily available and easily sampled. Moreover, they have a widespread distribution in the region, and most of them have well-defined life histories. Therefore, mammals showed to be a good alternative as reference organisms for $\delta^{18}\text{O}$ geographic variation region where currently there are not sampling water networks available, especially helping understanding ecological and biogeochemical processes controlling $\delta^{18}\text{O}$ spatial distribution. Therefore, it may be applied to subsidize assignment tests to support control agencies fight against IWT.

Keywords: animal poaching, regional isoscape, stable oxygen isotopes, wildlife forensics

Introduction

Illegal wildlife trade (IWT) generates billions of dollars in illicit revenue annually (Wyler and Sheikh 2008). In 2015, the United Nations General Assembly adopted a resolution for tackling illicit trafficking in wildlife and the Sustainable Development Goals stated specific targets to combat poaching and trafficking of protected species (Osborn et al. 2015). The withdrawal of individuals from their original locality has direct and indirect effects on biological and ecological functions in both population and community levels (Harrison 2011). Genetic variability deterioration, endogamy, and risks of extinction (Frankham 1995) are among other potential risks for the poaching species. Adverse conservation effects might also be associated with disease propagation (Kock et al. 2016), animal welfare misconducts (Ashley et al. 2014) and introduction of exotic species (Carrete and Tella 2008).

A large number of specimens or wildlife parts that originated from illegal trade are confiscated by control agencies every year. Seized animals, plants, and parts come from different parts of the world and are commercialized locally or globally (Regueira and Bernard 2012; Symes et al. 2018). The possibility of masking illegal origin by intermediate laundering countries also exists (Symes et al. 2018). This current scenario hampers more precise information about the geographical origin, or provenance, of those confiscated items.

The destination of live animals from IWT has encountered different challenges (Gray et al. 2017). Despite the existence of international guidelines for reintroduction (IUCN 2013) and for returning animals to their exporting countries (CITES 2016) these technical recommendations are not always easily followed in practice. There is a vacuity of National specific protocols and regulations for animal reintroduction. Qualified shelters for receiving and screening seized animals are not enough for their high number of specimens. Public judgment concern animal welfare and euthanasia of individuals justified by conservation are commonly criticized, even for exotic species (Bekoff and Ramp 2014). Releasing confiscated animals without criteria is not uncommon (Gray et al. 2017).

Breaking the IWT chain is essential. Wildlife forensic science has been using some tools for inferring IWT items provenance, or assignment, to their natural origins (Pimm et al. 2015). These tools are based on markers found in organic tissues named as endogenous markers (Hobson 2008). Genetic population structure has been vastly applied for provenance studies, where the accuracy of Bayesian tests and guidelines for application has been already developed (Manel et al. 2002). There are also successful case examples of fish, ivory, and timber assignment using this approach (Ogden and Linacre 2015). Despite the genetic utility, some limitations prevent its general application. First,

each species need to be studied separately, and an extensive and representative sampling is necessary for setting up the test, as it is necessary to know specific genetic markers and its population distribution for statistical analysis. Second, not every species is suitable for a genetic assignment, as there may be species with low genetic structure (panmixia) or populations that may only differentiate on continental scales (Leite et al. 2008; Reudink et al. 2016).

Tissue stable isotope ratios have been used as a more widespread endogenous marker for geographical provenance, and it is based on biogeochemical principles that lead to differential discrimination between the heavier and lighter isotope forms. Water isotopes ($\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^2\text{H}$, oxygen and hydrogen) are the most commonly stable isotope ratios used as geographical proxies, as their ratios change in the function of continentality, temperature, and altitude (Baisden et al. 2016). This characteristic marks spatial geography, especially where there is a high variation in temperature and altitude, making a gradient of isotope values, as it is the case in North America and Europe. Spatial patterns of stable isotope ratios have been represented in spatial models, called isoscapes (isoscapes = isotopic + landscapes) (Bowen 2010). Stable isotopic application to wildlife forensics is not new (Rubenstein and Hobson 2004; Bowen et al. 2005). Even regions where water isotopic assignment did not seem to be viable in earlier broader studies (Bowen et al. 2005) may benefit from this framework.

Global $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ models from meteoric precipitation are inferred from the International Atomic Energy Agency's Global Network of Isotopes in Precipitation (GNIP) sampling measurements (Rozanski et al. 1993). Precipitated water samples $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ are explained by climate and physiographic data, such as temperature, latitude, and altitude, and extrapolated to other regions (Bowen 2010). The significant continental isotopic variation in North America and Europe favors their use as geomarkers. However, in tropical regions, such as South America and Africa this natural isotope variation does not follow the same magnitude (Hobson and Kardynal 2016) and more refined models should be developed to support wildlife forensic science.

In 2013, Terzer et al. improved predictions of global water isoscapes in precipitation using more regionalized climatic regression models. However, in some relevant continental tropical regions, there are spatial and temporal gaps in precipitation isotopes collected as part of GNIP. Likewise, the climate is a complex phenomenon, and global estimates may not be universal for all regions, as the same environmental relationship may not adjust the same way to every case. Recently developed regional isoscapes have shown different combinations (West et al. 2014; Fiorella et al. 2015; Yamanaka et al. 2015; Zhang and Wang 2016; Gori et al. 2018). Moreover, it is not clear if regression

models used to link precipitation and feather $\delta^2\text{H}$ derived for North American birds (Hobson et al. 2012) can be directly applied to other regions.

Studies using regional isoscapes are a global trend since global models are predicted from a larger scale that end up underestimating regional variability. We present a regional isoscape approach using a regional spatial model based on stable oxygen isotopes. To test it we chose two contrasting and adjacent regions in the Neotropics, the Central Brazilian Savannas, locally called as Cerrado and a wetland region locally called as Pantanal.

Material and methods

Study areas

The Cerrado is a 2 million km² savanna, located in Central Brazil, in a central position in South America (Figure 1). It borders the Amazon basin, Chaco and Pantanal, Caatinga, and Atlantic forest. It is the richest savanna in the world with several plant and animal endemic species. Most of the Cerrado is located on large blocks of crystalline or sedimentary plateaus where the continuity is broken by large peripheral depressions. On plateaus ranging from 500 to 1,500 m high, the vegetation is dominated by savanna formation that grows on nutrient-poor, often deep and well-drained Oxisols. The vegetation varies from open grasslands to a tall closed forest with riparian forests along the small streams and rivers. The climate is seasonally marked with the drier period (about zero of precipitation) from May through September/October. The average annual rainfall varies between 1,250 and 2,000 mm, and the average annual temperature ranges between 20° and 26° C (WWF 2019a).

The Pantanal is the largest wetland in South America (Figure 1), with the majority of it occurring in Brazil as a floodplain around the Rio Paraguay and tributaries. While endemism in the region is lower compared to the Cerrado, the abundance of large birds, reptiles, and mammals makes its importance for conservation. The vegetation is driven by small changes in topography that in turn, determines the frequency and duration of flooding they experience. The terrain is mostly flat, ranging from 75 to 200 m above sea level. This elevation, coupled with the gentle slope of the rivers accounts for the massive flooding during the annual rainy season when up to 80 % of the region submerges. The Pantanal is bordered on the north and east by uplifted areas that are part of the Central Brazilian Shield. The climate is highly seasonal with over 100 mm per month of precipitation between November and March, followed by a dry winter. The average annual rainfall is about 1,100, and the average annual temperature ranges between 23° and 25°C (WWF 2019b).

Sample collection

For this study we used hair both from road-killed mammals and captured small mammals during the field campaigns. The spatial distribution of the sampled hair is shown on Figure 1. For the road-killed mammals we collected hair with forceps, and photographed the individuals for identification. For the small mammals, we used 1,000 overnight baited Sherman traps for capturing in each location. We collected the hair, weigh, and released them back to nature. We used a standardized mixture of mashed banana, cod, liver oil, corn meal, peanut butter and vanilla essence as bait in all traps. After collecting hair samples, they were released in the same trap location. We also sampled small mammals fur from museums and private collections, which date of collection were between 2012 and 2018. Geodesic coordinates for field sampling were acquired by a Global Positioning Satellite acquisition device.

Laboratory analysis

We cleaned hair samples, with distilled water and a mixture of methanol and chloroform (1:2) to remove all the impurities contained in the sample, such as solid residues and fats. We placed samples in the oven at 60°C for 24 hours for complete drying. We subsampled, weighted (1-2 mg) and packed samples in silver capsules and sent them for laboratory oxygen stable isotope analysis (Davis Isotope Facility, Davis, CA, USA). There, these capsules were introduced into a zero blank carousel of a PyroCube (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany). Samples were combusted at 1400 °C glassy carbon reactor filled with glassy carbon, graphite felt. CO was separated from any interfering N₂ on an adsorption trap and introduced into an interfaced Isoprime VisION (Isoprime Ltd., Stockport, UK, a unit of Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany) mass spectrometer under helium flow. IAEA-V9, IAEA-600, USGS-42, USGS-43, USGS-35 were used as laboratory standards. Stable oxygen isotope ratios are expressed in delta (δ) notation relative to VSMOW.

For $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ we subsampled, weighted (1-2 mg) and packed samples in tin capsules and sent them for laboratory analysis (Laboratório de Ecologia Isotópica of the CENA, USP, Piracicaba, Brazil). There, these capsules were introduced into a zero blank carousel of a EA (Carlo Erba) coupled with and Thermoquest – Finnigan Delta Plus IRMS (ThermoFischer Scientific GmbH, Bremen, Germany). Sugar cane and tropical soil were used as laboratory standards. Stable nitrogen and carbon isotope ratios are expressed in delta (δ) notation relative to Atmospheric air and VPDB, respectively.

Isoscape construction

To test the potential difference among dietary sources and habitat from different mammal life history, we used mammal hair $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ as predictors variables, since $\delta^{13}\text{C}$ is a well-known proxy for differences between habitats (C_3 x C_4 vegetation formation), while $\delta^{15}\text{N}$ is related both with nitrogen sources. We also used the difference between hair $\delta^{15}\text{N}$ and soil $\delta^{15}\text{N}$ isoscape (Nardoto et al. 2019) to minimize the difference in the $\delta^{15}\text{N}$ sources from different locations. We included species weight and size (Reis et al. 2011) and weight/size relationship to minimize differences among $\delta^{18}\text{O}$ fractionation related to differences in body oxygen balance (Bryant and Froelich 1995). We incorporated latitude and longitude coordinates as geographic representation differences between individuals related to the geographic position where they were sampled (squared longitude and latitude were used according to Bowen 2010). We tested 20 models using different combinations of these predictor variables (Table 2). We selected the best model using Akaike's Information Criterion (AIC) (Burnham and Anderson 2002). We then, used the best model to predict adjusted hair $\delta^{18}\text{O}$ values.

To build the hair $\delta^{18}\text{O}$ isoscape, we used some environmental data that are related to the oxygen isotope values in precipitation (Bowen 2005) as predictors of adjusted hair $\delta^{18}\text{O}$ values. The Gross Primary Productivity (GPP) was used because it integrates the balance between carbon input and evapotranspiration. We tested 38 models using different combinations of the predictor variables (Table 3). We selected the best model using Akaike's Information Criterion (AIC) to build the hair $\delta^{18}\text{O}$ isoscape.

The set of environmental variables were rasters from the WorldClim repository (Version 2 - Hijmans et al. 2005) that included mean annual precipitation, precipitation on the warmest quarter, precipitation on the wettest month, mean annual temperature and minimum temperature on the coldest month.

The topographic surface of the study area was examined by elevation dataset from Hydrological Data and Maps Based on Shuttle Elevation Derivatives at Multiple Scales (HydroSHEDS - <https://hydrosheds.cr.usgs.gov>), based on high-resolution elevation data obtained during a Space Shuttle flight for NASA's Shuttle Radar Topography Mission (SRTM) (Lehner et al. 2008). We used the three arc-seconds spatial resolution (approximately 90 meters at the equator line) to proceed with the mosaic of the elevation surface to cover the study area.

We used the Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer (MODIS) data set that provides a broader understanding of the global system functioning (Justice et al. 2002). We used an 8-

day composite of Gross Primary Productivity (GPP - MOD17A2H version 6), 500-meter spatial resolution, and embracing from 2000 to 2015 (724 images). The GPP is based on the radiation-use efficiency concept that can be potentially applied as inputs to data models to calculate terrestrial energy, carbon, water cycle processes, and biogeochemistry of vegetation (Running et al. 2015). After the temporal organization, we have smoothed the noise caused by atmospheric interferences, cloud covers, radiometric variation with three-step treatment (Carvalho Junior et al. 2012): 1) application of a moving median filter; 2) signal fraction separation by the transformation by the Minimum Noise Fraction (MNF); and 3) restoration of GPP values using the signal fraction of the MNF. We performed the raster statistics, pixel-by-pixel, and generated mean and range surfaces from this smoothed time series.

GPP and elevation rasters were resampled to 0.0083333 degrees (~1km), same resolution of the WorldClim data. We then extrapolated hair $\delta^{18}\text{O}$ to all Cerrado-Pantanal space, using the best AIC model to construct the regional mammal $\delta^{18}\text{O}$ hair isoscape.

Model Validation

We selected mammal species which had more than 10 observations (see Table 1) for testing relationship of meteoric mean annual $\delta^{18}\text{O}$ isoscape proposed by Terzer et al. (2013) and mammal $\delta^{18}\text{O}$ hair isoscape with hair $\delta^{18}\text{O}$ values for each species.

Results

The road-killed mammals belong to Artiodactyla, Perissodactyla, Edentata, and Carnivora orders. The small mammals belong to Rodentia and Didelphimorphia orders (Table1). The majority of the mammals used were smaller than 30 kg which, according to Bryant and Froelich (1995), about 20% of the total body water outflux represent metabolic water. None of the studied species are known to be migratory. Number of individuals from the same species, average body size, and average weight are presented on Table 1.

The predictor variables longitude, hair $\delta^{13}\text{C}$ and weight/size ratio showed up in the five best models for adjusting hair $\delta^{18}\text{O}$ (Table 2). The first best model showed relative likelihood twice higher than the second model, as showed by the ratio in AIC weight between the two models (Table 2).

AIC best hair $\delta^{18}\text{O}$ isoscape model includes mean annual minimum temperature, mean annual precipitation, elevation, water vapor, mean gross primary production, and gross primary production range (Table 3). The first best model showed relative likelihood being close to 1, and other models close to 0 (Table 3).

The hair $\delta^{18}\text{O}$ isoscape ranged 6‰ (Figure 2). Pantanal region showed the lowest values, while the eastern Cerrado region showed the highest values. The regression predicted hair $\delta^{18}\text{O}$ values with a marked longitudinal gradient (Figure 2).

Relationships of meteoric mean annual $\delta^{18}\text{O}$ isoscape (Terzer et al. 2013) and mammal $\delta^{18}\text{O}$ hair isoscape with hair $\delta^{18}\text{O}$ values for each species are shown in Table 4.

Discussion

The range found in our regional mammal hair $\delta^{18}\text{O}$ isoscape is consistent with previously variation seen in meteoric water $\delta^{18}\text{O}$ for this region (Terzer et al. 2013). However, it showed a more pronounced longitudinal pattern, indicating a more refined geographic variation.

The methodology presented here is also innovative in some other aspects. $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ are always used in animal ecology (Newsome et al. 2007) and isotopic ecological space interpretation results in rich information about the trophic position, primary vegetal sources used as food and communities trophic relationship, on local food webs. The best model for adjusting hair $\delta^{18}\text{O}$ includes hair $\delta^{13}\text{C}$, which reflect the local distribution of C_3 and C_4 plants (Powell et al. 2012). The Cerrado region comprises a mosaic of C_3 and C_4 plants, and neighboring animal species can base their diet differently (Ribeiro et al. 2019). Hair $\delta^{15}\text{N}$ appears in subsequent models, showing that it may also explain species differences in the trophic specializations as the amplitude of trophic niche as a response to food availability (Ribeiro et al. 2019). The first three best models include longitude, indicating the spatial structure of the data, or the covariates. The greater importance of longitude versus latitude is revealed there.

The weight/size ratio importance was expected, as we have significant differences in size (from 7 cm to 200 cm) and weigh (from 18 g to 150,000 g) among our samples. Body mass dependence was reported to be an essential factor in body water $\delta^{18}\text{O}$ fractionation (Luz et al. 1984, Bryant and Froelich 1995).

The relationships between $\delta^{18}\text{O}$ values and environmental variables reflect the interaction between biogeochemical and climate condition of this tropical region.

Road-killed mammals as well as museums specimen tissues are an option as reference organisms for measuring baseline variation in $\delta^{18}\text{O}$ in this regional scale where currently there are not sampling water networks available. They are primarily available and easily sampled, have a widespread distribution in the region, and most of them have well-defined life histories. Considering that agencies may have intelligence background information, and other datasets, such as suitable habitat areas, roads and easy accesses, may complement results utility and interpretation. A combination of other stable isotopes ratios, such as $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, and strontium (Sr) and trace elements models, can improve results. Statistical procedures can aggregate different datasets in a unique model, making final assignments more accurate (Rundel et al. 2013; Ruegg et al. 2014). The use of compound-specific isotopic analysis in recent researches may further contribute to differentiate food, water, and breath sources of $\delta^{18}\text{O}$ and refine future models (see Whiteman et al. 2019 for a revision).

The new approach used here can be replicated to other areas where wildlife poaching and IWT are a problem (Li 2000; Wyler and Sheikh 2008; White et al. 2012; Gray et al. 2017). Summarizing small scale derived information and organizing it in a systematic way as in databases (Pauli et al. 2017) can be used by government agencies, as customs, police, and inspectors. Combining different cases may reveal geographical tendencies and to improve enforcement in empty areas and may ultimately guide policies for inhibiting animal withdraw in their origins. Therefore, early provenance detection can lead to earlier actions and to prevent further exportations helping directly in IWT regulation.

Acknowledgments: This study was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and Edital Capes Pro-Forense/2014 (grant number 23038.006832/2014-11). We thank volunteers that provided mammal hair from their particular collections. ICMBio for authorizing animal sampling (license number 8745-1).

References

Ashley S, Brown S, Ledford J, et al (2014) Morbidity and Mortality of Invertebrates, Amphibians, Reptiles, and Mammals at a Major Exotic Companion Animal Wholesaler. *J Appl Anim Welf Sci*

17:308–321. doi: 10.1080/10888705.2014.918511

Baisden WT, Keller ED, Van Hale R, et al (2016) Precipitation isoscapes for New Zealand: enhanced temporal detail using precipitation-weighted daily climatology†. *Isotopes Environ Health Stud* 52:343–352. doi: 10.1080/10256016.2016.1153472

Bekoff M, Ramp D (2014) Cruel to be kind? *New Sci* 222:26–27. doi: 10.1016/S0262-4079(14)61210-0

Bowen GJ (2010) Isoscapes: Spatial Pattern in Isotopic Biogeochemistry. *Annu Rev Earth Planet Sci* 38:161–87. doi: 10.1146/annurev-earth-040809-152429

Bowen GJ, Wassenaar LI, Hobson KA (2005) Global application of stable hydrogen and oxygen isotopes to wildlife forensics. *Oecologia* 143:337–48. doi: 10.1007/s00442-004-1813-y

Bryant JD, Froelich PN (1995) A model of oxygen isotope fractionation in body water of large mammals. *Geochim Cosmochim Acta* 59:4523–4537. doi: 10.1016/0016-7037(95)00250-4

Burnham KP, Anderson, DR (2002) Model selection and model inference: A practical information-theoretic approach. New York: Springer-Verlag.

Carvalho Júnior OA de, Silva NC da, Carvalho, APF de, Couto Júnior, AF, Silva, CR, Shimabukuro, YE, Guimarães, RF, Gomes, RAT (2017). Combining noise-adjusted principal components transform and median filter techniques for denoising modis temporal signatures. *Rev. Bras. Geofísica* 30, 147–157. doi:10.22564/rbgf.v30i2.88

Carrete M, Tella JL (2008) Wild-bird trade and exotic invasions: A new link of conservation concern? *Front Ecol Environ* 6:207–211. doi: 10.1890/070075

CITES (2016) CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA - Committee II - Disposal of illegally traded and confiscated specimens of Appendix-I, -II and -III species. In: Seventeenth meeting of the Conference of the Parties. p 28

Fiorella RP, Poulsen CJ, Pillco Zolá RS, et al (2015) Spatiotemporal variability of modern precipitation $\delta^{18}\text{O}$ in the central Andes and implications for paleoclimate and paleoaltimetry estimates. *J Geophys Res* 120:4630–4656. doi: 10.1002/2014JD022893

Frankham R (1995) Conservation Genetics. *Annu Rev Genet* 29:305–327. doi:

10.1146/annurev.ge.29.120195.001513

- Gori Y, Stradiotti A, Camin F (2018) Timber isoscapes. A case study in a mountain area in the Italian Alps. *PLoS One* 13:.. doi: 10.1371/journal.pone.0192970
- Gray TNE, Marx N, Khem V, et al (2017) Holistic management of live animals confiscated from illegal wildlife trade. doi: 10.1111/1365-2664.12916
- Harrison RD (2011) Emptying the Forest: Hunting and the Extirpation of Wildlife from Tropical Nature Reserves. *Bioscience* 61:919–924. doi: 10.1525/bio.2011.61.11.11
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, et al (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int J Climatol Int J Clim* 25:1965–1978. doi: 10.1002/joc.1276
- Hobson KA (2008) Using endogenous and exogenous markers in bird conservation. *Bird Conserv Int* 18:S174–S199. doi: 10.1017/S0959270908000361
- Hobson KA, Kardynal KJ (2016) An isotope ($\delta^{34}\text{S}$) filter and geolocator results constrain a dual feather isoscape ($\delta^2\text{H}$, $\delta^{13}\text{C}$) to identify the wintering grounds of North American Barn Swallows. *Auk* 133:86–98. doi: 10.1642/AUK-15-149.1
- Hobson KA, Van Wilgenburg SL, Wassenaar LI, Larson K (2012) Linking hydrogen ($\delta^2\text{H}$) isotopes in feathers and precipitation: Sources of variance and consequences for assignment to isoscapes. *PLoS One* 7:e35137. doi: 10.1371/journal.pone.0035137
- IUCN/SSC (2013) Guidelines for Reintroductions and Other Conservation Translocations. Version 1.0.
- Justice C, Townshend JR, Vermote E, Masuoka E, Wolfe R, Saleous N, Roy D, Morisette J (2002). An overview of MODIS Land data processing and product status. *Remote Sens. Environ.* 83: 3–15. doi:10.1016/s0034-4257(02)00084-6
- Kock RA, Woodford MH, Rossiter PB (2016) Disease risks associated with the translocation of wildlife. *Rev Sci Tech I’OIE* 29:329–350. doi: 10.20506/rst.29.2.1980
- Lehner B, Verdin K, Jarvis A (2008) New Global Hydrography Derived From Spaceborne Elevation Data. *Eos, Trans. Am. Geophys. Union* 89: 93. doi:10.1029/2008EO100001
- Leite KC, Seixas GH, Berkunsky I, et al (2008) Population genetic structure of the blue-fronted Amazon (*Amazona aestiva*, Psittacidae: Aves) based on nuclear microsatellite loci: implications

for conservation. *Genet Mol Res* 7:819–829. doi: 10.4238/vol7-3gmr474

Luz B, Kolodny Y, Horowitz M (1984) Fractionation of oxygen isotopes between mammalian bone-phosphate and environmental drinking water. *Geochim. Cosmochim. Acta* 48:1689–1693

Manel S, Berthier P, Luikart G (2002) Detecting wildlife poaching: Identifying the origin of individuals with Bayesian assignment tests and multilocus genotypes. *Conserv Biol* 16:650–659. doi: 10.1046/j.1523-1739.2002.00576.x

Nardoto GB, Sena-Souza JP, Chesson LA, Martinelli LA (2019) Tracking geographic patterns of contemporary human diet in Brazil using stable isotopes of nail keratin. In: *Forensic Science and Humanitarian Action: Interacting with the dead and the living*. Wiley & Sons, New Jersey

Newsome SD, Rio, Martinez del C, Bearhop S, Phillips DL (2007) A Niche for Isotope Ecology. *Front Ecol Environ* 5:429–436. doi: 10.1890/060150.01

Ogden R, Linacre A (2015) Wildlife forensic science: A review of genetic geographic origin assignment. *Forensic Sci Int Genet* 18:152–159. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.02.008

Osborn D, Cutter A, Ullah F (2015) Universal Sustainable Development Goals: Understanding the transformational challenge for developed countries. *Univers Sustain Dev Goals* 1–24

Pauli JN, Newsome SD, Cook JA, et al (2017) Opinion: Why we need a centralized repository for isotopic data. *Proc Natl Acad Sci* 114:2997–3001. doi: 10.1073/pnas.1701742114

Pimm SL, Alibhai S, Bergl R, et al (2015) Emerging Technologies to Conserve Biodiversity. *Trends Ecol Evol* 30:685–696. doi: 10.1016/j.tree.2015.08.008

Powell RL, Yoo E-H, Still CJ (2012) Vegetation and soil carbon-13 isoscapes for South America: integrating remote sensing and ecosystem isotope measurements. *Ecosphere* 3:art109. doi: 10.1890/ES12-00162.1

Reis NR, Peracchu AL, Pedro, WA, Lima, IP (2011). *Mamíferos do Brasil*. Londrina: Nelio R. dos Reis, 2. ed. 439 p.

Ribeiro JF, Guaraldo AC, Santoro G, Nardoto GB, Vieira EM (2019). Habitat type and seasonality influence the isotopic trophic niche of small mammals in a neotropical savanna. *Hystrix*. accepted

Regueira RFS, Bernard E (2012) Wildlife sinks: Quantifying the impact of illegal bird trade in street markets in Brazil. *Biol Conserv* 149:16–22. doi: 10.1016/j.biocon.2012.02.009

- Reudink MW, Kyle CJ, McKellar AE, et al (2016) Linking Isotopes and Panmixia: High Within-Colony Variation in Feather $\delta^2\text{H}$, $\delta^{13}\text{C}$, and $\delta^{15}\text{N}$ across the Range of the American White Pelican. *PLoS One* 11:e0150810. doi: 10.1371/journal.pone.0150810
- Rozanski K, Araguás-Araguás L, Gonfiantini R (1993) Isotopic Patterns in Modern Global Precipitation. In: *Geophysical Monograph Series*. American Geophysical Union (AGU), pp 1–36
- Rubenstein DR, Hobson KA (2004) From birds to butterflies: Animal movement patterns and stable isotopes. *Trends Ecol Evol* 19:256–263. doi: 10.1016/j.tree.2004.03.017
- Ruegg KC, Anderson EC, Paxton KL, et al (2014) Mapping migration in a songbird using high-resolution genetic markers. *Mol Ecol* 23:5726–39. doi: 10.1111/mec.12977
- Rundel CW, Wunder MB, Alvarado AH, et al (2013) Novel statistical methods for integrating genetic and stable isotope data to infer individual-level migratory connectivity. *Mol Ecol* 22:4163–4176. doi: 10.1111/mec.12393
- Running S, Mu Q, Zhao M (2015). MOD17A2H MODIS/Terra Gross Primary Productivity 8-Day L4 Global 500m SIN Grid V006. distributed by NASA EOSDIS Land Processes DAAC, <https://doi.org/10.5067/MODIS/MOD17A2H.006>
- Symes WS, McGrath FL, Rao M, Carrasco LR (2018) The gravity of wildlife trade. *Biol Conserv* 218:268–276. doi: 10.1016/j.biocon.2017.11.007
- Terzer S, Wassenaar LI, Araguás-Araguás LJ, Aggarwal PK (2013) Global isoscapes for $\delta^2\text{H}$ in precipitation: improved prediction using regionalized climatic regression models. *Hydrol Earth Syst Sci* 17:4713–4728. doi: 10.5194/hess-17-4713-2013
- West AG, February EC, Bowen GJ (2014) Spatial analysis of hydrogen and oxygen stable isotopes (“isoscapes”) in ground water and tap water across South Africa. *J Geochemical Explor* 145:213–222. doi: 10.1016/j.gexplo.2014.06.009
- White NE, Dawson R, Coghlan ML, et al (2012) Application of STR markers in wildlife forensic casework involving Australian black-cockatoos (*Calyptorhynchus* spp.). *Forensic Sci Int Genet* 6:664–670. doi: 10.1016/j.fsigen.2011.10.003
- Whiteman JP, Smith EAE, Besser AC, Newsome SD (2019) A guide to using compound-specific stable isotope analysis to study the fates of molecules in organisms and ecosystems. *Diversity* 11:1–18. doi: 10.3390/d11010008

Wylter LS, Sheikh PA (2008) International Illegal Trade in Wildlife: Threats and U. S. Policy

WWF (2019) Cerrado. Website: https://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/areas_prioritarias/cerrado/ Accessed in 07/09/2019

WWF (2019) Pantanal. Website: https://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/areas_prioritarias/pantanal/ Accessed in 07/09/2019

Yamanaka T, Makino Y, Wakiyama Y, et al (2015) How reliable are modeled precipitation isoscapes over a high-relief mountainous region? *Hydrol Res Lett* 9:118–124. doi: 10.3178/hrl.9.118

Zhang M, Wang S (2016) A review of precipitation isotope studies in China: Basic pattern and hydrological process. *J. Geogr. Sci.* 26:921–938

Table 1 – Species sampled in the Cerrado and Pantanal regions in Brazil. Size and weight values were obtained in literature (Reis et al. 2011). Hair from road-killed mammals (RK) was collected during field trips between 2016 – 2018 years. Hair from small mammals (S) was collected with traps in National parks (2016-2018) or from museum specimens (2012-2018).

Order				
Species	category	size (cm)	weight (g)	sampled number
Artiodactila				3
<i>Ozotocerus bezoarticus</i>	RK	88	35,000	2
<i>Tayassu pecari</i>	RK	105	33,000	1
Carnivora				76
<i>Cerdocyon thous</i>	RK	65	7,350	45
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	RK	105	25,000	2
<i>Conepatus semistriatus</i>	RK	40	2,700	5
<i>Galictis vittata</i>	RK	51	3,200	1
<i>Lycalopex vetulus</i>	RK	61	3,000	2
<i>Nasua nasua</i>	RK	60	8,350	11
<i>Procyon cancrivorus</i>	RK	70	6,250	10
Didelphimorphia				46
<i>Caluromys philander</i>	S	21	246	1
<i>Didelphis albiventris</i>	S	74	1,673	2
<i>Gracilinanus agilis</i>	S	11	32	36
<i>Marmosa murina</i>	S	12	59	4
<i>Micoureus sp.</i>	S	18	119	1
<i>Philander frenatus</i>	S	265	325	1
<i>Thylamys sp.</i>	SK	10	30	1
Edentata				61
<i>Euphractus sexcintus</i>	RK	40	5,000	5
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	RK	110	45,000	17
<i>Tamandua tetradactyla</i>	RK	62	7,000	39
Perissodactila				3
<i>Tapirus terrestris</i>	RK	210	150,000	3
Rodentia				164
<i>Calomys spp.</i>	S	13	31	51
<i>Cerradomys sp</i>	S	16	143	4
<i>Clyomys sp.</i>	S	18	179	6
<i>Holochilus sp.</i>	S	18	268	1
<i>Holochilus sciureus</i>	S	18	268	1
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	S	115	54,000	2
<i>Hylaeamys megacephalus</i>	S	24	43	7
<i>Necomys lasiurus</i>	S	12	37	47
<i>Oecomys sp.</i>	S	12	190	4
<i>Oligoryzomys sp.</i>	S	9	25	3
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	S	9	25	1
<i>Oxymycterus delator</i>	S	13	88	6

<i>Proechimys sp.</i>	S	32	245	2
<i>Rhipidomys macrurus</i>	S	15	88	13
<i>Thalpomys cerradensis</i>	S	10	27	3
<i>Thalpomys lasiotis</i>	S	10	27	10
<i>Thricomys apereoides</i>	S	19	283	3
Total		---	---	353

Table 2 – AIC results for hair $\delta^{18}\text{O}$ adjusting models. Mammal species hair were sampled in the Cerrado and Pantanal regions in Brazil, between 2012 - 2018. Models were built using multivariate linear regressions combining sets of the independent variables: latitude (lat), longitude (long), $\delta^{13}\text{C}$ from hair ($\delta^{13}\text{C}_{\text{hair}}$), $\delta^{15}\text{N}$ from hair ($\delta^{15}\text{N}_{\text{hair-iso}}$), $\delta^{15}\text{N}$ from the soil isoscape ($\delta^{15}\text{N}_{\text{iso}}$) and weight and size values for each species. Dependent variable was hair $\delta^{18}\text{O}$ (n=353). Models were evaluated using AIC ranking between models (ΔAIC) and AIC weight. The first best model was used for adjusting hair $\delta^{18}\text{O}$ values for subsequent building of the mammal hair isoscape (Table 3).

Adj r^2	AIC	ΔAIC	weight	models
0.226	1357.4	0	0.31	long+ $\delta^{13}\text{C}_{\text{hair}}$ + weight /size
0.225	1358.8	1.4	0.16	long ² + $\delta^{15}\text{N}_{\text{hair-iso}}$ + $\delta^{13}\text{C}_{\text{hair}}$ +weight/size
0.222	1359.0	1.6	0.14	long ² + $\delta^{13}\text{C}_{\text{hair}}$ +weight/size
0.226	1359.5	2.1	0.11	lat + long+ $\delta^{15}\text{N}_{\text{hair-iso}}$ + $\delta^{13}\text{C}_{\text{hair}}$ +weight /size
0.225	1359.9	2.4	0.09	lat ² +long+ $\delta^{15}\text{N}_{\text{hair-iso}}$ + $\delta^{13}\text{C}_{\text{hair}}$ +weight /size
0.221	1361.1	3.7	0.05	lat+long ² + $\delta^{15}\text{N}_{\text{hair-iso}}$ + $\delta^{13}\text{C}_{\text{hair}}$ +weight/size
0.222	1361.5	4.1	0.04	lat ² + long ² + $\delta^{15}\text{N}_{\text{hair-iso}}$ + $\delta^{13}\text{C}_{\text{hair}}$ + weight /size
0.223	1361.7	4.2	0.04	lat+long+ $\delta^{15}\text{N}_{\text{hair}}$: $\delta^{15}\text{N}_{\text{iso}}$ + $\delta^{13}\text{C}_{\text{hair}}$ + weight +size
0.217	1363.0	5.6	0.02	long+ $\delta^{13}\text{C}_{\text{hair}}$
0.211	1363.1	5.7	0.02	lat+long+ $\delta^{15}\text{N}_{\text{hair}}$: $\delta^{15}\text{N}_{\text{iso}}$ + $\delta^{13}\text{C}_{\text{hair}}$ + weight:size
0.217	1364.5	7.1	0.01	lat+long+ $\delta^{15}\text{N}_{\text{hair-iso}}$ + $\delta^{13}\text{C}_{\text{hair}}$ + weight +size
0.209	1365.8	8.4	0	lat+long+ $\delta^{13}\text{C}_{\text{hair}}$ + + $\delta^{15}\text{N}_{\text{hair-iso}}$
0.209	1366.8	9.4	0	lat+long+ $\delta^{15}\text{N}_{\text{hair-iso}}$ + $\delta^{13}\text{C}_{\text{hair}}$ + weight:size
0.209	1366.8	9.4	0	lat+long+ $\delta^{15}\text{N}_{\text{hair-iso}}$ + $\delta^{13}\text{C}_{\text{hair}}$ + weight:size
0.205	1367.6	10.2	0	lat ² + long ² + $\delta^{13}\text{C}_{\text{hair}}$ + $\delta^{15}\text{N}_{\text{hair-iso}}$
0.161	1384.9	27.4	0	long+ weight /size
0.161	1385.6	28.1	0	long+ $\delta^{15}\text{N}_{\text{hair-iso}}$ + weight /size
0.137	1395.6	38.2	0	lat ² + long ² + $\delta^{15}\text{N}_{\text{hair-iso}}$
0.136	1397.0	39.6	0	lat:long+ $\delta^{15}\text{N}_{\text{hair-iso}}$ + $\delta^{13}\text{C}_{\text{hair}}$ + weight /size
0.063	1424.5	67.1	0	$\delta^{13}\text{C}_{\text{hair}}$ + $\delta^{15}\text{N}_{\text{hair-iso}}$ + weight /size

Table 3 – AIC results models using environmental variables to construct $\delta^{18}\text{O}$ hair isoscape. Mammal species hair were sampled in the Cerrado and Pantanal regions in Brazil, between 2012 - 2018. Models were built using multivariate linear regressions combining sets of independent variables, which values were extracted from the geospatial rasters (pixel size= 0.0083333 degrees, ~1km): average annual minimal temperature (TMIN), average annual precipitation amount (PREC), atmospheric water vapor (VAP), elevation (SRTM), mean gross primary productivity (GPPM), range of gross primary productivity (GPPR), precipitation on the wettest months (PW), precipitation on the warmest months (PWM and minimum temperature on the coldest months (TC). Dependent variable was hair $\delta^{18}\text{O}$ values adjusted from best model in a previous set of model selection (Table 2). Models were evaluated using AIC ranking between models (ΔAIC) and AIC weight. The first best model was used for extrapolating hair $\delta^{18}\text{O}$ values to all Cerrado and Pantanal area for building the mammal hair isoscape.

Adj r^2	AIC	ΔAIC	weight	models
0.503	692.4	0	0.9958	TMIN+PREC+VAP+SRTM+GPPM
0.484	703.7	11.4	0.0035	GPPM+VAP+PREC
0.478	707.0	14.6	0.0006	PREC+GPPM
0.465	717.8	26.1	0	TMIN+PW+SRTM+GPPM+GPPR
0.445	729.4	37.8	0	GPPR+GPPM+TC+PW
0.442	730.0	38	0	GPPM+PWM
0.444	731.2	39.6	0	TC+PW+SRTM+GPPM+GPPR
0.441	732.1	40.5	0	PW+SRTM+GPPM+GPPR
0.441	733.0	41.2	0	TC+VAP+SRTM+GPPM+PW
0.433	737.2	45.4	0	TC+VAP+SRTM+GPPM
0.423	741.0	49.4	0	GPPR+GPPM
0.416	744.6	52.6	0	GPPM
0.360	779.6	88.2	0	TC+PWM+P100+PW
0.358	781.5	90.1	0	TC+PWM+P100+PW+VAP
0.341	788.7	97.4	0	PW+TC+P100
0.334	794.2	103.1	0	TC+VAP+SRTM+PW+GPPR
0.324	799.3	108.2	0	TMIN+VAP+SRTM+GPPR+PW
0.317	804.3	112.8	0	TC+PWM+PW+TMIN+VAP+PREC
0.315	804.6	113.1	0	PREC+TC+PWM+PW+VAP
0.302	807.7	116.5	0	PW+SRTM
0.302	809.1	117.9	0	PW+TC+PWM

0.298	809.9	118.7	0	PW+TC
0.300	811.1	119.8	0	TC+PWM+PW+VAP
0.300	811.1	119.8	0	TC+PWM+PW+VAP
0.296	812.7	121.6	0	TC+VAP+PW+GPPR
0.263	828.1	136.8	0	PWM+PW+VAP
0.263	828.1	136.8	0	PWM+PW+VAP
0.208	855.0	164.1	0	TC+VAP+SRTM+PWM+GPPR
0.141	880.9	189.9	0	PW+GPPR
0.138	884.0	192.9	0	TC+VAP+PWM+GPPR
0.128	885.5	194.8	0	PWM+SRTM
0.126	887.7	196.9	0	TMIN+VAP+PREC
0.126	887.7	196.9	0	TMIN+VAP+PREC
0.110	891.6	201.1	0	SRTM
0.107	893.9	202.5	0	PW
0.059	912.8	221.9	0	TC+PWM
-0.002	933.7	242.9	0	GPPR
-0.005	935.7	244.9	0	PREC+GPPR

Table 4 – Linear regression coefficients of the relationship between meteoric mean annual $\delta^{18}\text{O}$ isoscape proposed by Terzer et al. (2013) and mammal $\delta^{18}\text{O}$ hair isoscape with hair $\delta^{18}\text{O}$ values for each species. Mammal species hair were sampled in the Cerrado and Pantanal regions in Brazil, between 2012 - 2018. Adj r^2 = adjusted coefficient of determination; DF = degrees of freedom; p = p-value.

Specie	mammal hair $\delta^{18}\text{O}$ hair			meteoric mean annual $\delta^{18}\text{O}$		
	Adj r^2	DF	p	Adj r^2	DF	p
<i>Cerdocyon thous</i>	0.0611	41	0.0603	0.2223	41	0.0008
<i>Gracilinanus agilis</i>	0.4587	34	3.44E-06	0.0320	34	0.1512
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	0.0036	15	0.3200	0.1916	15	0.0448
<i>Tamandua tetradactyla</i>	0.1233	36	0.0175	0.5344	36	1.13E-07
<i>Calomys spp.</i>	0.1372	49	0.0043	0.0142	49	0.1960
<i>Rhipidomys macrurus</i>	0.1176	11	0.1352	0.3011	11	0.0304
Total	0.0914	350	4.29E-09	0.0400	350	6.13E-05

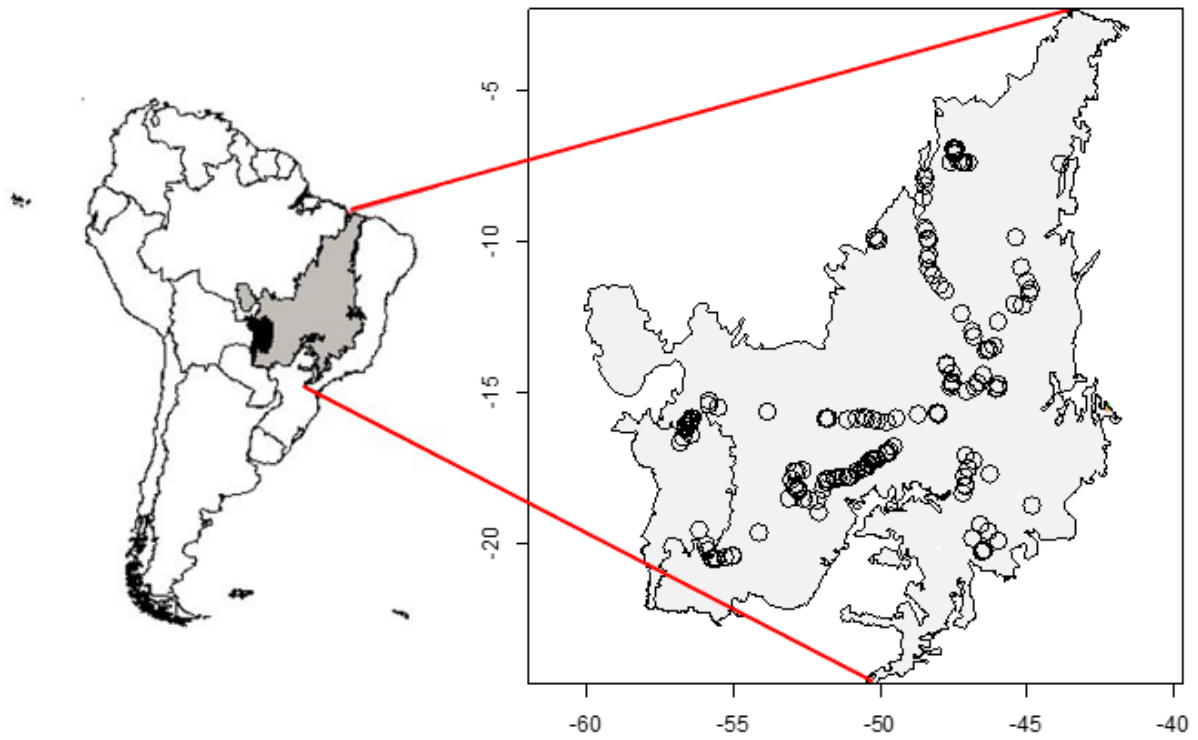


Figure 1 – On the left, Cerrado and Pantanal location in South America. On the right, sampled mammal hair distribution in the Cerrado and Pantanal regions (black circles). Horizontal and vertical axes are longitude and latitude, respectively.

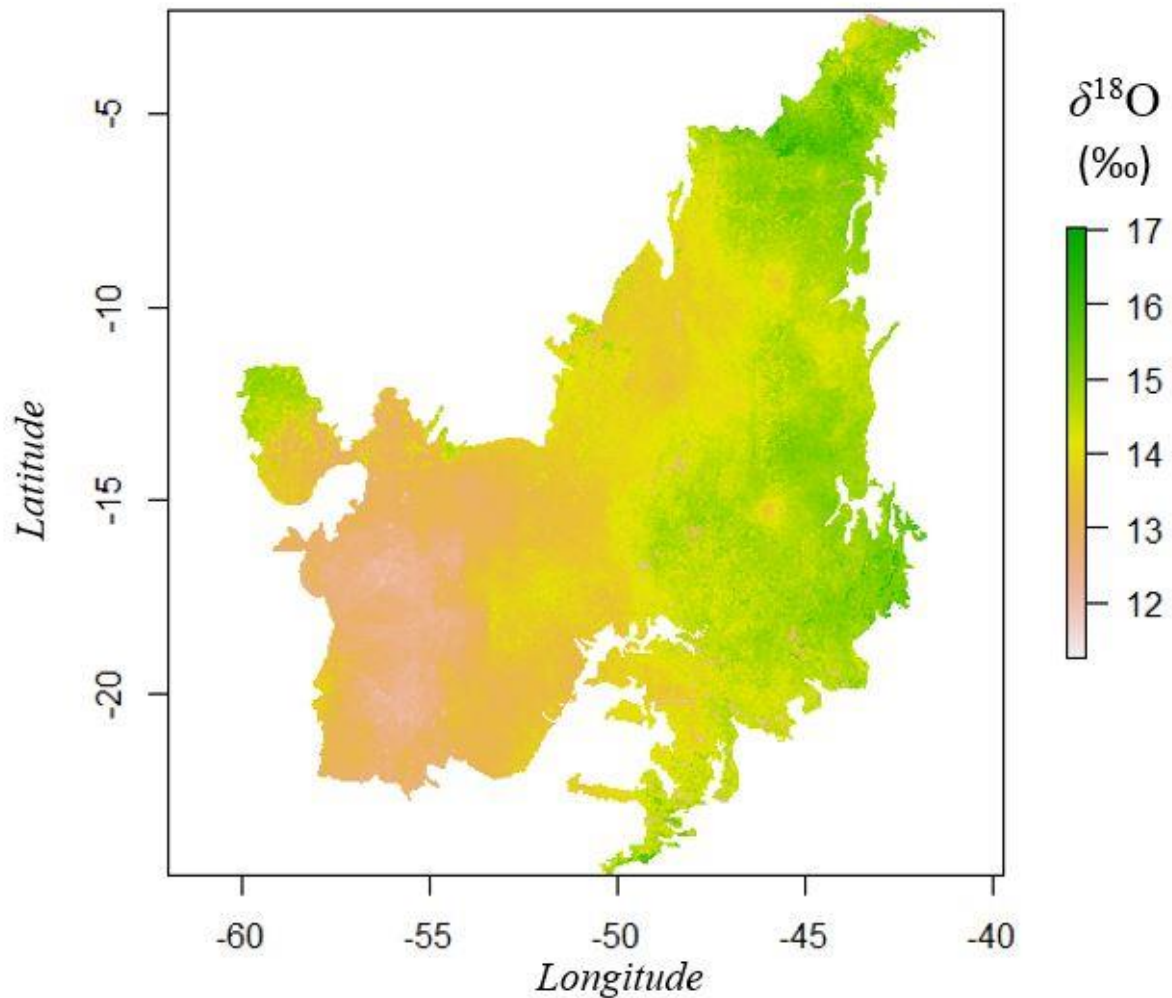


Figure 2 –Mammal hair $\delta^{18}\text{O}$ isoscape for the Cerrado and Pantanal regions. The figure represents a raster with pixel size = 0.0083333 degrees, ~1km. The isoscape was built from a multivariate linear model using as independent variables: average annual minimal temperature (TMIN), average annual precipitation amount (PREC), atmospheric water vapor (VAP), elevation (SRTM), mean gross primary productivity (GPPM). Dependent variable was hair $\delta^{18}\text{O}$ values adjusted from best model in a previous set of model selection (Table 2).

Capítulo 4 – Accuracy and precision sensitivity for multi-isotopic geographical assignment test

O presente capítulo seguiu a formatação e estrutura do periódico MethodsX.

Accuracy and precision sensitivity for multi-isotopic geographical assignment test

Section: Environmental science

ABSTRACT

Stable isotopes have been widely used as geographical proxies for animal studies, such as migration ecology and wildlife forensic studies. Our method is based in assigning stable isotope values to geographical spaces. This approach use regression fitting to calibrate isotopic values from known origin samples with an environmental isoscape (spatial distribution of environmental isotopic values across landscapes), which results in a tissue isoscape. Normal probabilistic density and/or bayesian functions are applied to this tissue isoscape to project surfaces showing probabilistic origins. Our method evaluate isotopic data adherence to space and strength for assignment, and presents the following customization:

- Uses a framework that aggregates the isoscape and environmental variables in a multi-model approach.
- Performs an automated arrangement that splits dataset in train and test data and repeats model construction and assignment testing with different subsets. In each trial, it launches nine calibrating models for each isotope, selects a best model using Akaike Information Criterion (AIC), and assembles a weighted model using AIC weights.
- Performs tests combining one, two or three isotopes and applying normal uni or multivariate probabilistic assignments. It compares resulting probabilistic surfaces of origin to known origins and assesses accuracy and precision.

SPECIFICATIONS TABLE

Subject Area	<i>Environmental Science</i>
More specific subject area:	<i>Environmental modelling</i>
Method name:	<i>Multi-modelling isotopic method</i>
Name and reference of original method	<p><i>Wunder, M.B., Kester, C.L., Knopf, F.L., Rye, R.O., 2005. A test of geographic assignment using isotope tracers in feathers of known origin. Oecologia 144, 607–617. https://doi.org/10.1007/s00442-005-0071-y</i></p> <p><i>Hengl, T., 2007. A Practical Guide to Geostatistical Mapping, Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. https://doi.org/10.1088/1751-8113/44/8/085201</i></p> <p><i>Vander Zanden, H.B., Nelson, D.M., Wunder, M.B., Conkling, T.J., Katzner, T., 2018. Application of isoscapes to determine geographic origin of terrestrial wildlife for conservation and management. Biol. Conserv. 228, 268–280. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.10.019</i></p>
Resource availability	<i>Contact the author throw the e-mail: mr.f.bio@gmail.com</i>

Method details

A flow chart explaining our method (adapted from Hengl [1]) is shown in Figure 1. Hengl [1] describes the steps in blue boxes and we add orange steps to create the present method. This chart illustrates only univariate assignment. For multivariate assignment, we used multivariate normal density functions with two or three isoscapes, both also resulting in one raster of probabilities as detailed below.

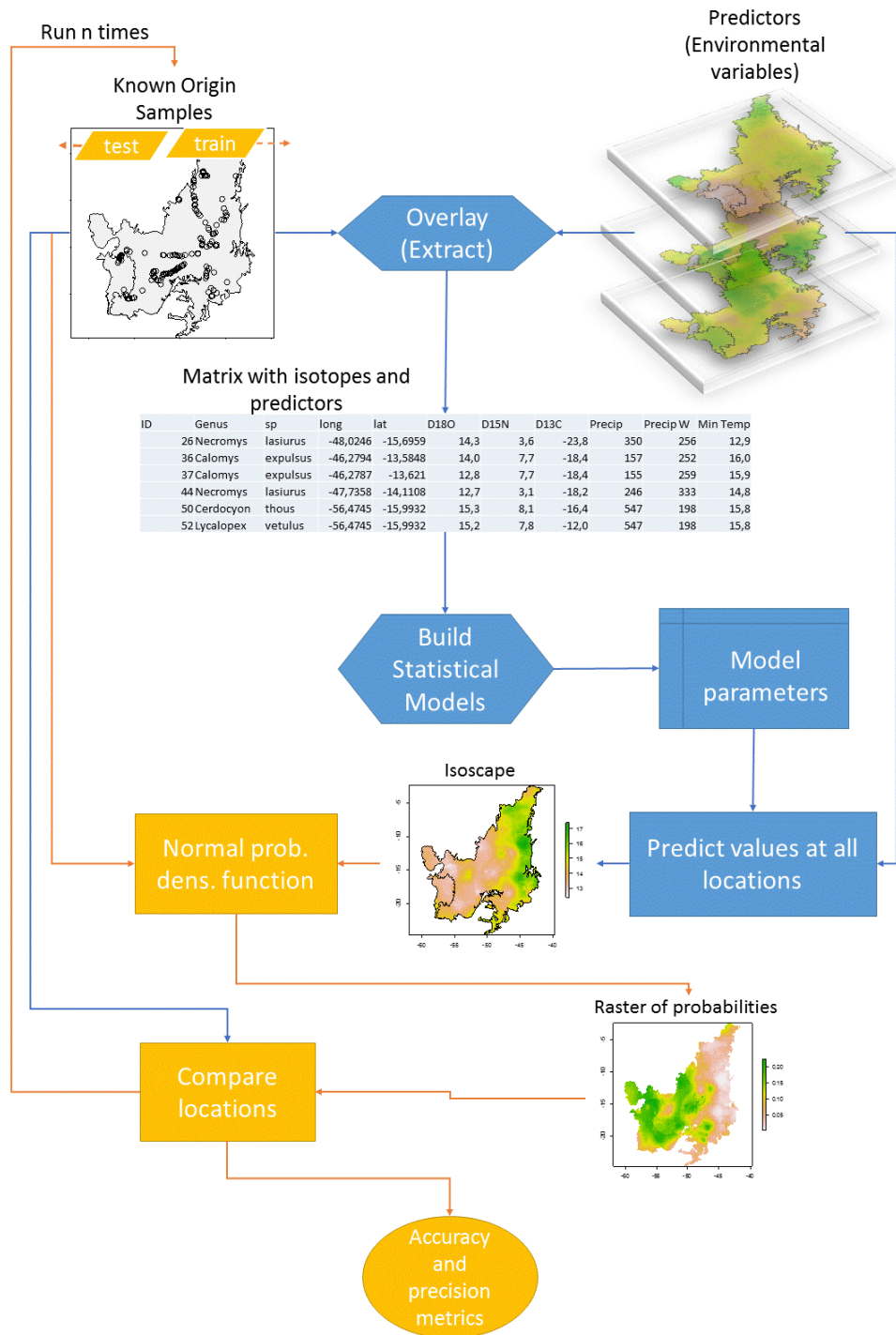


Figure 1 – Representative flow of the multi-modelling isotope method adapted from Hengl [1]. The orange boxes and arrows represent the added steps to Hengl [1] scheme. Arrows represent the step flows, boxes represent the procedures and maps represent the rasters outputs. The main text brings the details about the procedures steps.

Our method consists of the following steps:

- 1) Reading and standardizing environmental variables – environmental variables rasters must have same geographical extent, pixel size and coordinates system. We used the environmental variables (EV) from WorldClim [2], including mean annual precipitation, precipitation on the warmest quarter, precipitation on the wettest month, mean annual temperature and minimum temperature on the coldest month, and geographical models of isotopic distribution, isoscapes: $\delta^{18}\text{O}$ in precipitation [3], $\delta^{15}\text{N}$ in soil [4], and $\delta^{13}\text{C}$ in plant [5] as independent variables. The isoscapes will be treated as EV further in the text.
- 2) Extracting raster pixel information to dataset –The known origin geographical coordinates extracts pixel value for each EV.
- 3) Split train and test data – we split the data 50%/50%. The entire dataset consists of $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{15}\text{N}$, and $\delta^{13}\text{C}$ values analyzed for hair of mammals collected along Central region of Brazil. We used test data to cross-validate models, executing random splitting and entire protocol 500 times.
- 4) Building statistical models – we idealized nine multivariate linear models combining different sets of EVs. Each model uses different sets of EVs as independent variables and isotopic hair values from train dataset as dependent variables. Relative explanatory strength and weight of models was estimated by Akaike Information Criterion (AIC). We used the best model coefficients (from ΔAIC) to predict a best model (BM) hair isoscape (predict values at all locations). The resulting nine models were used to produce nine isoscapes, which were weighted using AIC weight results to produce a model weighted hair isoscape composite (WM).
- 5) Assignment tests – posterior probabilities of origin were calculated for each individual in test data using normal probability density functions (hereafter called “one isotope”) or multivariate normal probability functions (hereafter called “two isotopes” and “three isotopes”). We did univariate trials with $\delta^{18}\text{O}$, bivariate with $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{15}\text{N}$, and multi-variate with $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{15}\text{N}$, and $\delta^{13}\text{C}$.
- 6) Accuracy and distances metrics – accuracy in 5%, 25% and 50% precisions were calculated and plotted. Distance of known origin data point to assignment results pixel of maximum posterior probability were also computed (Figure 2).

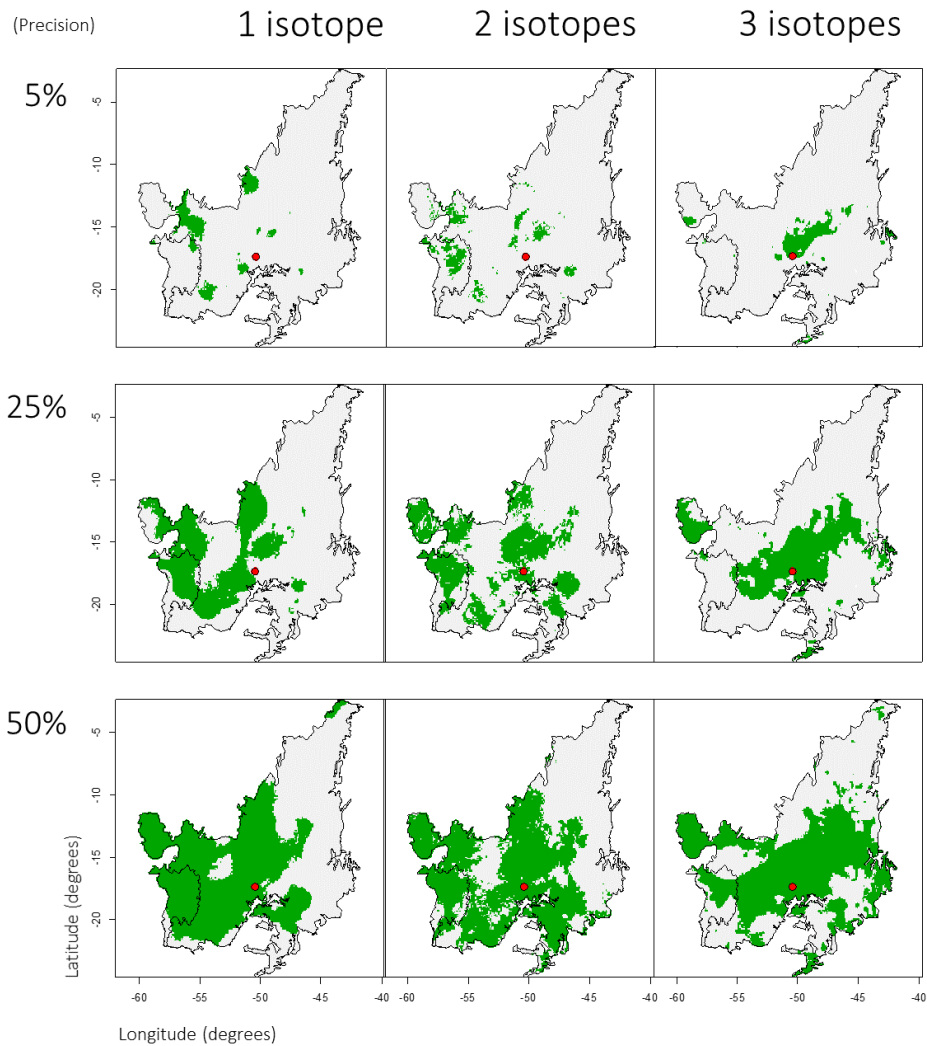


Figure 2 – Example of precision and accuracy results. On horizontal lines, the green areas on maps represent precision limits of 5%, 25% and 50% upper limits of probability, which excludes 95%, 75% and 50% of the entire studied area. The vertical lines show assignment results using one, two and three isotopes. If the red dot, which is the sample true location of origin, falls inside the green area, it is a correct assignment. If it falls outside the green area, it is an incorrect assignment. Results of accuracy are expressed as percentage of correct assignments for a set of test data, in the specified level of precision.

We base our method in assigning unknown origin samples as function of their stable isotope values to their likely region of origin [6], reviewed in [7], and in general geostatistical methods [1].

Vander Zanden et al. [7] review how to use stable isotopes for conservation and management, proposing statistical simulations with different isotopic datasets. These simulations allowed

highlighting strengths and limitations to the isotopic application. Assigning methods are done calibrating isotopic values from known origin samples with an environmental isoscape (spatial distribution of isotopic values across landscapes, [8]). This calibration process generalizes to a tissue isoscape by using regression fitting parameters. A raster of probabilities results from a normal probabilistic density, as functions of the sample isotopic value, its variance, and a baseline of the tissue isoscape. Some sources of variance in this calibration process, as well as, individual, species and laboratory variances can be accounted and incorporated in the assignment model.

Hengl [1] proposes a regression-kriging method, which consists of regressing field observational results using auxiliary environmental variables as predictors, followed by kriging of the residuals. Our method fuse these two approaches (Figure 1), as instead of using just one univariate regression fitting to the environmental isoscape, we use multivariate regression fitting including also environmental variables.

In Hengl [1] decision tree, if the residuals do not show spatial autocorrelation, he recommends using ordinary least square regression for predicting values to all area of interest (environmental correlation method). As our purpose was to perform an automated arrangement for testing the isotopic assignment method efficacy repeatedly, using just the deterministic component would be satisfactory. Moreover, we executed some preliminary environmental correlation trials, and results did not show spatial autocorrelation.

We incorporated multivariate regression models. Therefore, another adaption in the method is best model selection using Akaike Information Criterion (AIC). West et al. [9] also performed AIC model selection for selecting best models for building South African water isoscapes. We selected the best model and also built a weighting model assembling using AIC weights to produce two tissue isoscapes. These tissue isoscapes are used for assignment tests.

Calculating posterior probabilities of geographical origins is based on normal probabilities density function. According to the number of isotopes (stable isotope ratios of oxygen, nitrogen or carbon - $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{15}\text{N}$, or $\delta^{13}\text{C}$, respectively) considered, we assumed normal, bivariate normal, or multivariate normal distributions using the stationary variance of the calibrating models [6]).

Vander Zanden et al. [7] established accuracy and precision estimates for isotopic assignment. We also use a similar odds ratio approach delimiting boundaries for evaluating models. But, as our probabilistic results covered the entire studied area, we traduced odds ratio values direct to the proportion of the surface area, which has the same meaning as the level of precision of the assignment proposed by

Vander Zanden et al. [7]. We also used more restrictive areas. Vander Zanden et al. [7] use 1:1 to 1:19 odds, which is equivalent to 50% to 95% of probability and to about 40% - 80% of the studied area. We used 3 discrete sets of precision: 5%, 25% and 50% of the area. Metrics of accuracy measures if the known location is included in the area circumscribed in the determined precision (Figure 2), which end as the proportion of correct assignments in each trial in the level of precision. We also registered distance of known origin to the pixel of maximum posterior probability.

We performed the above sequence repeatedly, each time randomly splitting half of our dataset as train and test data. This should challenge the model both in its geographical structure and in data variance. Train data was used to build models and accuracy and precision metrics were applied to test data assignment. Metrics results were collected and saved in each trial to be plotted after finishing the pre-established number of cycles. Vander Zaden et al. [7] executed the protocol 100 times, but their procedure included 1,000 times repeating the isoscape preparation with different variance, which was not included in our method.

Method validation

After running predetermined number of trials (in this case 500), the registered accuracy at determined precision and distances are plotted together, so it is possible to compare levels of certainty for the assignments. Examples of plotting follow on figure 3.

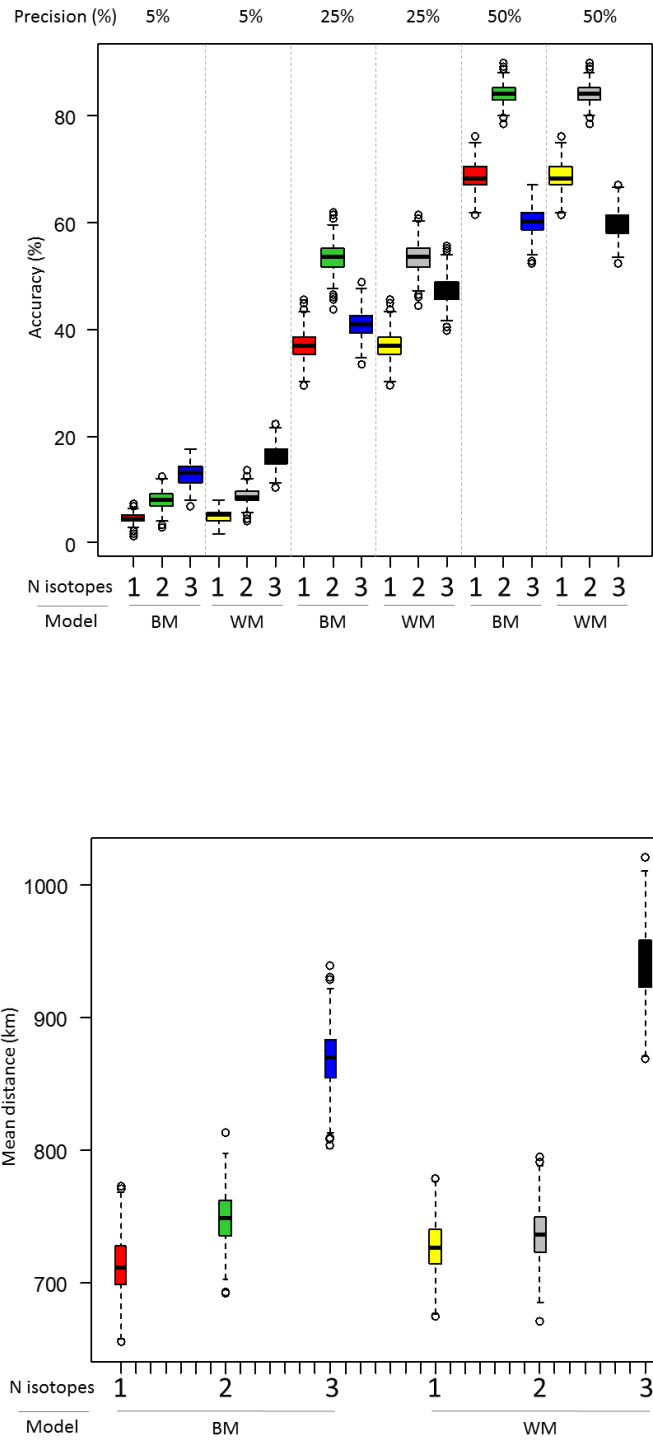


Figure 3 – Results of the method validation methodology. The upper boxplot shows the levels of accuracy (vertical axe) for 5%, 25% and 50% precision limits. The lower boxplot shows mean distance, in kilometers, from the known origin, which is given by the minimum distance between the pixel of maximum probability and the pixel of known origin. Different colors represent assignment using 1, 2 and 3 isotopes together. $\delta^{18}\text{O}$ was used in 1 isotope assignments; $\delta^{18}\text{O}$ and

$\delta^{15}\text{N}$ in 2 isotopes assignment, and $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{15}\text{N}$, and $\delta^{13}\text{C}$ in 3 isotopes assignment. The isoscapes generated by the best model (BM) and by the weighted model (WM) were tested.

Acknowledgements: This study was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and Edital Capes Pro-Forense/2014 (grant number 23038.006832/2014-11). We thank to the all volunteers that provided mammal hair from their particular collections. ICMBio for authorizing animal sampling (license number 8745-1).

References

- [1] T. Hengl, A Practical Guide to Geostatistical Mapping of Environmental Variables, n.d. <http://europa.eu> (accessed June 20, 2019).
- [2] R.J. Hijmans, S.E. Cameron, J.L. Parra, P.G. Jones, A. Jarvis, VERY HIGH RESOLUTION INTERPOLATED CLIMATE SURFACES FOR GLOBAL LAND AREAS, *Int. J. Climatol.* *Int. J. Clim.* 25 (2005) 1965–1978. doi:10.1002/joc.1276.
- [3] S. Terzer, L.I. Wassenaar, L.J. Araguás-Araguás, P.K. Aggarwal, Global isoscapes for δ H in precipitation: improved prediction using regionalized climatic regression models, *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 17 (2013) 4713–4728. doi:10.5194/hess-17-4713-2013.
- [4] G.B. Nardoto, J.P. Sena-Souza, L.A. Chesson, L.A. Martinelli, Tracking geographic patterns of contemporary human diet in Brazil using stable isotopes of nail keratin., in: *Forensic Sci. Humanit. Action Interact. with Dead Living.*, Wiley & Sons, New Jersey, 2019.
- [5] R.L. Powell, E.-H. Yoo, C.J. Still, Vegetation and soil carbon-13 isoscapes for South America: integrating remote sensing and ecosystem isotope measurements, *Ecosphere.* 3 (2012) art109. doi:10.1890/ES12-00162.1.
- [6] M.B. Wunder, C.L. Kester, F.L. Knopf, R.O. Rye, A test of geographic assignment using isotope tracers in feathers of known origin, *Oecologia.* 144 (2005) 607–617. doi:10.1007/s00442-005-0071-y.
- [7] H.B. Vander Zanden, D.M. Nelson, M.B. Wunder, T.J. Conkling, T. Katzner, Application of isoscapes to determine geographic origin of terrestrial wildlife for conservation and management, *Biol. Conserv.* 228 (2018) 268–280. doi:10.1016/j.biocon.2018.10.019.
- [8] P.K. West, J. B.; Bowen, G.J.; Dawson, T.E.; Tu, *Isoscapes Understanding movement, pattern and process on Earth through isotope mapping*, Springer, 2010. doi:10.1007/978-90-481-3354-3_7.

- [9] A.G. West, E.C. February, G.J. Bowen, Spatial analysis of hydrogen and oxygen stable isotopes (“isoscapes”) in ground water and tap water across South Africa, *J. Geochemical Explor.* 145 (2014) 213–222. doi:10.1016/j.gexplo.2014.06.009.

(se você chegou até aqui...)

Conversa de elevador

- Olá! Quanto tempo!

- Olá! Pois é, essa vida corrida...

- Trabalhando muito?

- Ando mais estudando...

- Estudando o quê?

- Doutorado...

- Sobre o quê?

- Sobre a utilização de marcadores químicos para saber de onde vem animais traficados que são confiscados pela polícia.

- Marcadores químicos? Como funciona?

- São isótopos estáveis... O mesmo elemento químico, como o oxigênio, tem uma forma mais leve e a mais pesada. Quando a água evapora do oceano, o oxigênio mais pesado da água vai chovendo mais e ficando para traz.... Isso forma um gradiente da quantidade do pesado e do leve, do litoral para o interior. Quando o animal bebe a água, guarda o sinal em suas penas e a gente analisa a pena e sabe de onde ele veio...

- Que bacana! Nunca tinha ouvido falar nisso...

- Sim, é bem recente aqui no Brasil.

(Elevador chega)

- Bem, boa sorte no seu doutorado!!

- Obrigado, depois você me conta daquela viagem, por que não deu nem tempo...

- Tranquilo, conto sim... foi maravilhosa! Tchau!

- Até mais...