



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Distinção entre duas espécies de felinos
neotropicais de pequeno porte (*Leopardus guttulus*
e *Leopardus geoffroyi*) por meio de análise
cromatográfica de sais biliares fecais**

Aluna: Ana Maria Obino Mastella

Orientador: José Cláudio Fonseca Moreira

Coorientador: Manoel Fontoura Rodrigues

Porto Alegre, Novembro de 2015.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço ao meu excelentíssimo coorientador, Manoel Fontoura Rodrigues, pela imensa ajuda, apoio (moral, psicológico, científico, acadêmico, etc) e paciência durante a elaboração deste trabalho de conclusão de curso (TCC). Agradeço muitíssimo também ao meu orientador, José Cláudio, por acolher-me como orientada de TCC, ajudar-me na execução do mesmo, possibilitar a concretização deste projeto, e apresentar-me à Vera Trindade. Aliás, agradeço-a deveras por abrir as portas de seu laboratório e ajudar-me nas cromatografias. Faço um agradecimento especial também aos Laboratórios da UFRGS – e aos componentes que lhe pertencem – 32 e ao 25 do Departamento de Bioquímica e ao de Mastozoologia e Ornitologia por ajudarem-me (e aturarem-me) na triagem das fezes. Agradeço muito também à professora Dra. Maria João Pereira, e ao professor Dr. Daniel Gelain por concordarem em ser componentes da minha Banca Examinadora. Secundariamente, mas não menos importante, sou muito grata aos meus excelentíssimos amigos e a minha família, os quais me forneceram suporte, apoio moral tanto nos bons, quanto nos maus momentos. Destes, agradeço especialmente a minha amiga Carolina Souza Diegues, com quem tive muitas discussões acerca do trabalho – e me ajudaram por demais-, além de muito ter me ajudado no decorrer do mesmo. Devo um agradecimento especial também ao meu pai, que gentil e prontamente ajudou-me nas coletas dos materiais nos zoológicos. Não posso deixar de agradecer também à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e à COMGRAD-BIO, por me possibilitarem a execução deste TCC. Para finalizar, agradeço muito pelo carinho, atenção e disponibilidade dos tratadores e responsáveis dos zoológicos de Gramado, Cachoeira do Sul, Canoas, Sapucaia do Sul e do Criadouro Brás de Santa Maria.

SUMÁRIO

RESUMO 4

PALAVRAS-CHAVE: *LEOPARDUS GUTTULUS*; *LEOPARDUS GEOFFROYI*; CROMATOGRAFIA EM CAMADA PLACA (TLC); SAIS BILIARES FECAIS. 4

I. INTRODUÇÃO 5

- I.1 AMOSTRAGEM: MÉTODO INVASIVO VERSUS MÉTODO NÃO INVASIVO 5
- I.2 MÉTODOS NÃO INVASIVOS: AMOSTRAS ESCATOLÓGICAS 7
- I.3 PERFIL DE SAIS BILIARES: UMA ALTERNATIVA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES 8
- I.4 SAIS BILIARES PARA A IDENTIFICAÇÃO DE FELINOS 9
- I.4 LEOPARDUS GEOFFROYI E LEOPARDUS GUTTULUS: DIFERENCIAÇÃO ENTRE ESPÉCIES SIMPÁTRICAS 10

II. JUSTIFICATIVA 11

III. OBJETIVOS 12

- GERAL 12
- ESPECÍFICOS 12

IV. MÉTODOS 12

- IV.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS ESCATOLÓGICAS 12
- IV.2 ARMAZENAMENTO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS 14
- IV.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS ESCATOLÓGICAS 14

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO 16

- V.1 RESULTADOS 16
 - V.1.1 *Sistemas de migração* 16
 - V.1.2 *Revelações* 18
 - V.1.3 *Análise de amostras fecais* 19
- V.2 DISCUSSÃO 21

VI. PERSPECTIVAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS 24

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 26

RESUMO

Identificar espécies é uma das tarefas mais primárias em estudos ambientais. Avanços tecnológicos na área da conservação de mamíferos permitem coletar amostras de modo não invasivo - fezes, por exemplo – equivalendo-se à captura do animal que as depositou sem lhe causar estresse ou qualquer outro tipo de perturbação ou malefício. Novas abordagens envolvendo a identificação de espécies através de amostras fecais têm sido propostas em estudos ecológicos, como protocolos mais eficientes e práticos de cromatografia em placa (*Thin Layer Chromatography*, ou TLC). Quase todas as espécies de felinos do mundo se encontram em perigo, ou estão ameaçadas. O Rio Grande do Sul é o estado brasileiro com maior número de espécies de felinos sendo que espécies como o gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*) e o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus guttulus*) apresentam sobreposição de tamanho, coloração e áreas de ocorrência, dificultando, pois, sua identificação. Com isso, o objetivo deste trabalho foi o de estabelecer um protocolo cromatográfico padrão e testar a viabilidade de se distinguir duas espécies de felinos neotropicais (*L. guttulus* e *L. geoffroyi*) por meio de TLC do perfil de sais biliares fecais. Amostras fecais de animais oriundas de zoológicos foram coletadas entre os meses de Agosto e Setembro de 2015. Estas foram armazenadas tanto em álcool 96°GL, quanto com esferas de sílica gel, sendo triadas a fim de fazerem-se as análises cromatográficas. Através de nossas análises foi possível estabelecer o protocolo cromatográfico ideal para nosso ambiente laboratorial – no caso, o protocolo estabelecido por Siegfried e Elliot (1968) – bem como visualizar perfis de sais biliares nas analisadas. Mais estudos, porém, serão necessários para um melhor visualização e quiçá distinção entre *L. guttulus* e *L. geoffroyi*.

PALAVRAS-CHAVE: *Leopardus guttulus*; *Leopardus geoffroyi*; cromatografia em camada placa (TLC); sais biliares fecais.

I. INTRODUÇÃO

A identificação de espécies é uma das tarefas mais básicas em estudos ambientais. Saber quais espécies ocorrem em uma determinada região é o ponto de partida para vários estudos, tais como levantamento de espécies, descrição da biodiversidade bem como para inúmeros estudos ecológicos. Tal identificação, contudo, pode ser bastante difícil para alguns grupos taxonômicos, especialmente os mais raros, como é o caso dos mamíferos. As espécies deste grupo são de suma importância para todos os ecossistemas da Terra, uma vez que apresentam inúmeros papéis ecológicos chave. Entre os mamíferos estão a grande maioria dos principais carnívoros, herbívoros, frugívoros e insetívoros que compõem os ecossistemas terrestres. Contudo, mamíferos são naturalmente raros, ocorrendo em densidades baixas, além de possuírem hábitos elusivos. Estas características dificultam o registro da sua ocorrência, bem como da sua amostragem estando esta atrelada a obtenção de dados genéticos, fisiológicos, bioquímicos, os quais são de suma importância em estudos evolutivos, taxonômicos, ecológicos, entre muitos outros.

I.1 AMOSTRAGEM: MÉTODO INVASIVO VERSUS MÉTODO NÃO INVASIVO

Dentro da área de estudo de mamíferos existem diversas possibilidades de identificação de espécies e de coleta de materiais biológicos. Baseando-se no nível de contato necessário com os espécimes no momento da amostragem, podemos classificar o modo de coleta destes materiais de duas formas: invasivo e não invasivo. Métodos de amostragem invasivos são aqueles nos quais a obtenção do material biológico é feita através de contato direto, manuseio e contensão do espécime, como exemplo, a coleta de órgãos, vísceras, sangue, músculo, fluidos, secreções, tegumentos de modo geral, partes do corpo (patas, dedos, orelha), etc oriundos de animais capturados.

A captura dos indivíduos pode ser via: busca ativa, que consiste na localização dos indivíduos e posterior captura dos mesmos via uso de dardos

anestésicos, arrebanhamento (perseguição) seguida de cercamento do indivíduo, ou redes; armadilhagem - de animais vivos (*live traps*), ou mortos (*Kill traps*) - que requer verificação regular (FELDHAMER *et al.*, 2013). Em contrapartida, são considerados métodos não invasivos aqueles nos quais se adquire o material biológico sem contato direto (observação, manuseio, ou marcação) do indivíduo (LONG *et al.*, 2008) . A coleta de amostras fecais, tricológicas, de urina, secreções, ou o registro de marcas (pegadas e arranhões, p.ex.) depositadas naturalmente – isto é, ao longo do dia-a-dia – pelo animal no ambiente onde habita são exemplos desse tipo de amostragem (CHARPENTIER *et al.*, 2012; HOFMANN; HAGEY; KRASOWSKI 2010; LONG *et al.*, 2008; SOINI *et al.*, 2012; SOSO *et al.*, 2014).

Por envolverem a captura dos espécimes, os métodos invasivos têm a vantagem de possibilitarem uma identificação direta da espécie à qual o indivíduo pertence, além de permitir uma coleta de material biológico de excelente qualidade, com baixos níveis de degradação e contaminação (LONG *et al.*, 2008; FELDHAMER *et al.*, 2013) . Contudo, são bastante dispendiosos, exigindo uma logística mais complexa em termos de esforço do coletor e custos durante a amostragem. A captura de mamíferos de vida livre envolve, frequentemente, um número grande de pesquisadores em campo, períodos longos de planejamento, preparação e execução, além de exigir equipamentos que são por vezes caros (FELDHAMER *et al.*, 2013). Por fim, a amostragem de natureza invasiva também causa um significativo estresse aos indivíduos capturados (LONG *et al.* 2008), sem contar a possibilidade de óbito destes animais por conta do seu manuseio (reação alérgica, má aplicação ou superdose anestésica, hipo ou hipertermia, ou mesmo o estresse decorrido da captura).

Amostragens não invasivas, por outro lado, envolvem baixo custo, menor tempo de planejamento e execução (em média), menor necessidade de pessoal e equipamento de campo, além de não causarem estresse aos indivíduos amostrados (WULTSCH *et al.*, 2014; LONG *et al.* 2008). Por outro lado, a qualidade do material coletado é consideravelmente menor, contendo níveis de degradação e contaminação maiores do que os encontrados em amostras invasivas, impondo, pois, maiores dificuldades no processamento e análise em laboratório do material coletado (BROQUET; PETIT, 2004; SMITH; WANG, 2014; TABERLET; WAITS,

1999). Outra dificuldade a ser levada em conta é a identificação da espécie a qual depositou o material no ambiente, porque muitas vezes há sobreposição tanto em formato, quanto em tamanho destas amostras entre diferentes espécies (por exemplo, em fezes de carnívoros com formato e calibre intestinais similares: fezes de puma (*Puma concolor*), por exemplo, excedem o diâmetro de 2,5cm, ao passo que as da raposa andina (*Pseudalopex culpaeus*) variam de 1,7 a 2,2 cm, e as de gato-palheiro (*Leopardus colocolo*), variam de 1,3 a 1,6cm (CHAME, 2003).

Dessa maneira, amostragens invasivas e não invasivas, devido às suas diferentes vantagens e desvantagens, se adequam a diferentes tipos de estudo, consoante a disponibilidade de recursos - usados em campo e também financeiros -, tempo hábil, pessoal disponível e aos objetivos específicos do projeto. Para a simples identificação de espécies, contudo, a amostragem não invasiva tem sido utilizada com uma frequência crescente, por conta de sua facilidade para a obtenção de amostras biológicas, sem contar a considerável melhoria nas técnicas de processamento e análise destas em laboratório.

1.2 MÉTODOS NÃO INVASIVOS: AMOSTRAS ESCATOLÓGICAS

Coletar amostras de modo não invasivo, como fezes, é equivalente a capturar o animal que as depositou sem lhe causar estresse ou qualquer outro tipo de perturbação ou malefício, o que muito ajuda na área da conservação (MATTE *et al.*, 2013). Além disso, modelos podem ser aplicados, com intuito de estimar parâmetros populacionais como abundância, sobrevivência, recrutamento, distribuição, entre outras informações ecológicas, antes apenas possíveis de modo invasivo (LONG *et al.*, 2008; MATTE *et al.*, 2013).

Recentemente, o monitoramento genético não invasivo de mamíferos tem ganhado importância no campo da conservação e no manejo da vida silvestre (WAITS & PAETKAU 2005; BEJA-PEREIRA *et al.*, 2009), provendo um ganho potencial e valioso em múltiplas espécies de ambientes fragmentados (WULTSCH *et al.*, 2014). Fezes, por exemplo, são comumente utilizadas em estudos ecológicos com o intuito de estimar tamanhos populacionais (KOHN *et al.*, 1999; WEBBON *et*

al., 2004), padrões de distribuição ou riqueza de espécies (DÁLEN *et al.*, 2004), por serem, na maioria dos casos, abundantes e de fácil acesso (SANZ *et al.*, 2007).

A maior parte das análises fecais que fornecem uma identificação fidedigna de espécies é baseada em ferramentas genéticas (HOSS *et al.*, 1992). Contudo, essa abordagem pode ser desfavorável em ambientes tropicais, onde o DNA degrada rapidamente (WULTSCH *et al.*, 2014). Além disso, nestes locais a qualidade fecal das amostras varia consideravelmente. (WULTSCH *et al.*, 2014). Com isso, técnicas de identificação individual através de amostras fecais necessitam de maior aperfeiçoamento, tanto em campo quanto em laboratório (MICHALSKI *et al.*, 2011).

Novas abordagens envolvendo a identificação de espécie em amostragem fecal têm sido propostas em estudos ecológicos, como técnicas de cromatografia de gás (BURNHAM *et al.*, 2008; SARAIVA *et al.*, 2014) e protocolos mais eficientes e práticos de cromatografia em placa (TLC) (SALAME-MÉNDEZ *et al.*, 2012). A utilização de moléculas orgânicas, como voláteis e sais biliares (perfil químico), para a distinção entre espécies apresenta como vantagens a rapidez na obtenção de resultados, baixa complexidade e tempo de processamento das amostras reduzido, além de aplicabilidade para praticamente qualquer espécie, requerendo apenas a adaptação do protocolo (SARAIVA *et al.*, 2014).

I.3 PERFIL DE SAIS BILIARES: UMA ALTERNATIVA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES

O reconhecimento de um animal dentro de seu grupo social particular – seja família, clã ou colônia – pode ser obtido por meio de seu perfil químico, também chamado de assinatura (ou, mais especificamente, “*signature mixture*”) (WYATT 2005). O perfil químico consiste em um conjunto de moléculas orgânicas que podem ser produzidas pelo próprio indivíduo (tais como feromônios e secreções odoríferas), adquiridas no ambiente (dieta, produtos intestinais), ou mesmo provenientes de outros organismos (micro-organismos de glândulas odoríferas ou da flora

bacteriana) (WYATT, 2010). Um dos tipos de perfil químico que podem ser obtidos facilmente em laboratório através de cromatografia é o perfil de sais biliares.

Os sais biliares são o conjunto de produtos resultantes de reações de conjugação de ácidos e álcoois biliares, ou seja: álcool-sulfatos biliares e ácidos biliares conjugados (HAGEY *et al.*, 2010; HOFMANN; HAGEY; KRASOWSKI, 2010). Ácidos e álcoois biliares, por sua vez, são os produtos finais anfipáticos e multifuncionais do metabolismo do colesterol em vertebrados (HAGEY *et al.*, 2010; HOFMANN; HAGEY; KRASOWSKI, 2010). Presentes nas fezes de animais, e com diversidade estrutural distinta entre as espécies, os sais biliares apresentam uma estrutura química única em termos de diversidade, de modo que nenhuma outra molécula possua a mesma diversidade entre os vertebrados (HOFMANN; HAGEY; KRASOWSKI, 2010).

1.4 SAIS BILIARES PARA A IDENTIFICAÇÃO DE FELINOS

Os felinos (Carnivora: Felidae) compõem um dos grupos mais familiares e fascinantes de mamíferos. A dieta de grande parte das espécies deste clado é estritamente carnívora, o que as torna predadoras topo em praticamente todos os biomas terrestres do mundo, à exceção da Austrália e Antártica (WANG; ZHANG; YU, 2012).

Com exceção de alguns pequenos felinos, praticamente todas as espécies de Felidae existentes no mundo são consideradas como em perigo ou ameaçadas, conforme organizações mundiais que monitoram espécies ameaçadas (IUCN, 2015; CITES, 2015).

Tendo em vista o aumento dos impactos humanos e da fragmentação de habitat, as populações de felídeos têm sido cada vez mais afetadas (WULTSCH *et al.*, 2014). Processos ecológicos como dispersão, competição entre espécies pertencentes à mesma guilda e impactos descendentes (“*top-down*”) de cascata trófica (LINELL; STRAND, 2000) são grandemente impactados, mas permanecem incompreendidos na maior parte das vezes. Existe uma grande urgência em desenvolver métodos eficientes que possam ser aplicados a múltiplas espécies

coocorrentes, a fim de avaliar comparativamente aspectos como o *status* populacional e dieta, bem como a evolução destes parâmetros ao longo do tempo. Desta maneira, seria possível caracterizar os impactos sofridos pelas espécies de uma determinada região, e assim sugerir medidas de conservação adequadas para cada situação.

1.4 Leopardus geoffroyi E Leopardus guttulus: DIFERENCIAÇÃO ENTRE ESPÉCIES SIMPÁTRICAS

O Rio Grande do Sul é o estado brasileiro com maior número de espécies de felinos. Devido à sua posição geográfica e diversidade de ambientes, podem ser encontradas em seu território tanto espécies associadas a ambientes campestres, como o Pampa, quanto a ambientes florestados, como a Mata Atlântica. Dentre estas oito espécies, algumas apresentam sobreposição de tamanho, coloração e áreas de ocorrência, o que dificulta a sua identificação. Um destes casos de sobreposição ocorre com o gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*) e do gato-do-mato-pequeno (*L. guttulus*).

Ambas as espécies possuem porte pequeno: *L. guttulus* medindo entre 60,4 a 91,1 cm de comprimento total e pesando de 1,75 a 3,5 Kg (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013); e *L. geoffroyi*, com um comprimento total variando de 69 a 125 cm, e o peso, de 2,2 a 7,8 kg (TRIGO *et al.*, 2008). Adicionalmente, a coloração de fundo amarelado com pintas negras, que, apesar de apresentarem um padrão geral distinto, são muitas vezes confundidas. Além disso, estas espécies são parcialmente simpátricas no Rio Grande do Sul (RS), aumentando ainda mais a potencial confusão na identificação de ambas.

A distribuição de *L. geoffroyi* é bastante associada aos Pampas, se estendendo por Argentina, Uruguai e metade sul do estado do RS. Já *L. guttulus* é uma espécie associada a áreas florestadas, estando presentes nos biomas de mata densa do Brasil, como a metade norte do RS. Devido à presença de uma vegetação de transição entre os campos dos Pampas e as florestas da Mata Atlântica, há uma zona de coocorrência destas espécies, aproximadamente na faixa central do estado.

Esta zona de simpatria parece, inclusive, a originar um processo de hibridação entre as duas espécies (TRIGO *et al.*, 2008). Esta situação pode ter efeitos negativos à conservação de ambas, que já se encontram em categorias preocupantes de ameaça (VU – Vulneráveis) em termos nacionais (BRASIL, 1996).

Segundo o relatório publicado pelo Instituto Chico Mendes (ICMBIO) durante a Oficina de Avaliação do Estado de Conservação dos Mamíferos Carnívoros do Brasil, estima-se que nos próximos 15 anos (três gerações) possa ocorrer o declínio de, pelo menos, 10% da população de *L. geoffroyi* em razão dos efeitos conjuntos da perda de habitat, abate por retaliação à predação de animais domésticos e atropelamentos, além dos possíveis efeitos negativos da hibridação (DE ALMEIDA *et al.*, 2011). É previsto um declínio de mesma percentagem da população de *L. guttulus* para o mesmo intervalo de tempo, devido principalmente à perda e fragmentação de habitat causadas pela expansão agrícola (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013).

II. JUSTIFICATIVA

Métodos não invasivos são particularmente apropriados para o estudo dos membros da ordem Carnivora, dado suas características ecológicas e comportamentais (LONG *et al.*, 2008). Felinos, em especial, possuem natureza bastante esquiva, sendo de difícil acesso e monitoramento (AZEVEDO; LEMOS, 2013). Somado a tais características que dificultam a amostragem, boa parte das espécies dos felinos existentes encontra-se ameaçada, ou em perigo de extinção (WANG; ZHANG; YU, 2012). Sendo assim, a amostragem não invasiva apresenta-se como uma boa alternativa.

Dentre as espécies de felinos neotropicais, tanto o gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*), quanto o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus guttulus*) são espécies ameaçadas e que apresentam sobreposição de distribuição e morfologia. Assim, métodos que possibilitem a correta identificação e distinção de ambas podem ajudar a caracterizar locais de ocorrência e também fornecer amostras confiáveis para a descrição mais precisa de seus hábitos alimentares, entre outros estudos ecológicos.

A identificação de espécies através do perfil de sais biliares fecais via cromatografia em placa (TLC) caracteriza-se por ser um método não invasivo, o qual é conveniente ao lidar-se com felinos. Além disso, trata-se de um método alternativo ante a convencional identificação genética, que é relativamente cara e demorada.

III. OBJETIVOS

GERAL

Estabelecer um protocolo padrão e testar a viabilidade de distinguir duas espécies de felídeos neotropicais (*Leopardus guttulus* e *Leopardus geoffroyi*) por meio de análise cromatográfica do perfil de sais biliares fecais.

ESPECÍFICOS

- Estabelecer um protocolo cromatográfico - isto é, de sistema de migração e revelação - adequado para nosso ambiente laboratorial;
- Elaborar um plano-piloto das análises via cromatografia de placa com ao menos uma amostra de um indivíduo de cada espécie.

IV. MÉTODOS

IV.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS ESCATOLÓGICAS

As amostras fecais foram obtidas a partir de animais cativos de cinco diferentes instituições: GramadoZoo, Zoológico Municipal de Canoas, Zoológico Municipal de Cachoeira do Sul, Zoológico de Sapucaia do Sul e o Criadouro Conservacionista de Santa Maria. Foram coletadas amostras das duas espécies-alvo (*L. geoffroyi* e *L. guttulus*), além de uma terceira, a onça-pintada (*Panthera onca*), utilizada como controle nas análises. As amostras foram separadas por sexo,

uma vez que podem existir diferenças entre as composições de sais biliares de machos e fêmeas (TAYLOR, 1977) (Tabela 1).

Tabela 1: Número de indivíduos para os quais foram obtidas amostras fecais em cada um dos locais de coleta, separados por espécie e sexo.

Local de Coleta	Número de indivíduos conforme a espécie					
	<i>Leopardus guttulus</i>		<i>Leopardus geoffroyi</i>		<i>Panthera onca</i>	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
GramadoZoo	1	2	0	0	2	2
Zoológico Municipal de Canoas	1	3	0	0	0	0
Zoológico Municipal de Cachoeira do Sul	1	0	1	0	0	2
Criadouro Conservacionista São Braz de Santa Maria	0	0	1	0	0	1
Zoológico de Sapucaia do Sul	0	0	0	0	2	0
Total de Indivíduos	3	5	2	0	4	5

Do autor.

Para cada indivíduo, foram coletadas duas amostras escatológicas, uma conservada a seco e outra em meio líquido. Os animais que proveram as amostras receberam dietas similares dentro de cada espécie, sendo cada uma delas de acordo com especificações nutricionais recomendadas. As coletas foram realizadas preferencialmente no turno da manhã, com um intervalo de, no máximo, dois dias entre a visita a cada local, a fim de obter amostras evacuadas em períodos de tempo semelhantes. As visitas às instituições mencionadas foram realizadas entre os dias 27 de Agosto e 25 de Setembro de 2015.

As coletas seguiram o protocolo sugerido por Hunter (2010). As amostras fecais recolhidas foram expelidas entre o período da noite anterior ao dia da coleta e da madrugada em que a mesma foi feita. Sempre que possível, procurou-se coletar ao menos dois bolos fecais de cada indivíduo, de modo a gerar duplicatas das amostras. Cada amostra foi coletada com o uso de luvas descartáveis, utilizando-se um par para cada amostra recolhida e minimizando, assim, a contaminação entre diferentes fezes. Colheres de plástico pequenas foram utilizadas na coleta para auxiliar na deposição da amostra fecal dentro do frasco de coleta, os quais

consistiam em tubos Falcon de 50mL contendo cerca de 2g de esferas de sílica na proporção de 1:4 de sílica para a quantidade de amostra respectivamente, ou álcool 96% GL, na proporção de 1:1.

IV.2 ARMAZENAMENTO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

A conservação das amostras fecais foi feita de dois modos: a seco, nos tubos com esferas de sílica gel, conforme sugerido por Hunter (2010), e também em meio líquido, nos tubos com álcool 96 °GL, conforme Salame-Méndez *et al.* (2012). Ambos os métodos foram feitos somente para amostras de indivíduos do sexo masculino, de modo que para as fêmeas o armazenamento das amostras foi somente a seco.

Após a coleta, as amostras foram transportadas dentro de uma caixa de isopor (isolante térmico) e nela mantidas até o momento do processamento das mesmas (realização das cromatografias do tipo TLC). A fim de evitar a exposição das amostras a possíveis flutuações térmicas, a mesma caixa de isopor foi mantida em ambiente refrigerado com temperatura constante (4°C).

IV.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS ESCATOLÓGICAS

IV.3.1 TRIAGEM DAS AMOSTRAS

Ao todo, 50 mg de cada porção fecal foram transferidas para tubos Eppendorf® de 1,5mL. No caso das amostras armazenadas em álcool 96° GL, foram utilizadas 50mg tanto da parte sólida contida na amostra original, quanto 50mg do sobrenadante líquido da mesma amostra, separadamente. Neste último caso, conforme proposto por Salame-Méndez (2012), tem-se a vantagem de não haver necessidade de mistura de extração podendo, pois, ser aplicada diretamente sobre a cromatoplaça.

IV.3.2 CROMATOGRAFIA EM PLACA (CAMADA DELGADA)

A metodologia adotada para o presente estudo seguiu Salame-Méndez *et al.* (2012) em seu trabalho com ácidos biliares de amostras escatológicas de

carnívoros silvestres, com algumas modificações. Como exemplo, utilizou-se cromatofolhas de cromatografia de alto desempenho (HPTLC) com sílicagel 60, além das de TLC alumínio com sílicagel 60 utilizadas por Salame-Méndez (2012). Outras modificações e métodos adicionais serão descritos a seguir.

IV.3.3 PADRÕES DE ÁCIDOS BILIARES E COLESTEROL

Os padrões de ácidos biliares e colesterol foram realizados a partir de padrões da marca Sigma dos ácidos biliares deidrocolíco, litocolíco, colíco e glicólico, através da dissolução destes em etanol absoluto (Merck) na concentração de 0,1% (Salame-Méndez *et al.*, 2012). Para o colesterol, a solução padrão utilizada foi oriunda do Kit Colesterol-liquiform (Labtest).

IV.3.4 ESCOLHA DO REVELADOR

Conforme recomendado por Salame-Méndez (2012), utilizou-se m-anisaldeído - mistura composta de solução de anisaldeído (Sigma), ácido acético glacial (Merck) e ácido sulfúrico concentrado (Merck) na proporção 0,5 : 50:1 v/v (KRTICHEVSKY; MARTAK; ROTHBLAT, 1963)- como revelador cromatográfico. A mesma foi borrifada sobre a cromatoplaça e, *a posteriori*, colocada em estufa a 150°C durante 20 minutos.

Para fins de teste, foram utilizados outros dois tipos de reveladores, comumente empregados em TLC, além do anisaldeído: o iodo metálico e o ácido fosfomolibdico. No caso do iodo, uma quantidade suficiente para que o mesmo sublime e forme um vapor âmbar rosado, foi colocada em cuba de vidro durante 5 minutos, de modo que sublimasse e saturasse a cuba cromatográfica. Já para o ácido fosfomolibdico, utilizou-se a solução de fosfomolibdico da marca Sigma. A mesma, tal como a solução de anisaldeído, foi borrifada sobre a cromatoplaça com posterior aquecimento em estufa a 150°C por 20 minutos.

IV.3.5 ESCOLHA DO SISTEMA DE MIGRAÇÃO

Ao todo, foram testados dois sistemas de migração. Inicialmente, testou-se a metodologia descritas por Salame-Méndez *et al.*(2012), a qual consiste de duas migrações sequenciais: na primeira migração, a mistura é composta de clorofórmio : metanol : ácido acético (80 : 12 : 0,5 v/v); na segunda migração – feita

no mesmo sentido de migração da primeira - utilizou-se uma mistura de clorofórmio : etanol : ácido acético (80 : 45 : 3). Tal migração foi feita em cromatofolhas de TLC.

Secundariamente, testou-se também o método descrito por Siegfried e Elliot (1968), o qual utiliza como mistura de solventes clorofórmio: metanol : ácido acético (80:12:3 v/v). Nesse houve o diferencial de ter sido executado com cromatofolhas de HPTLC, ativadas em banho-seco (estufa) 30 minutos a 100°C.

IV.3.6 CROMATOGRAFIA DAS AMOSTRAS ESCATOLÓGICAS

Em cada tubo Eppendorf® com a amostra foram adicionados 0,5 mL da mistura extração (D: M) com posterior agitação em vortex, e finalmente centrifugação a 2000-3000 rpm durante 1-2 minutos à temperatura ambiente.

No caso das amostras armazenadas em álcool 96° GL, após devida separação de 50mg e colocação da amostra em um tubo Eppendorf®, evaporou-se o etanol que continham, à temperatura ambiente ou em banho-maria, antes da adição de 0,5 mL da mistura de extração (D: M). No caso das amostras em Eppendorf® contendo apenas o sobrenadante líquido, as mesmas não necessitaram passar pela fase de extração (colocação de 0,5mL de mistura de extração (D:M)). Na sequência, para ambos os tipos de amostras preservadas em meio líquido, foram adicionados 100 µL de D:M com posterior agitação. De cada uma das amostras com D: M foram retirados 5 ou 10 µL para aplicação em uma cromatoplaca .

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1 RESULTADOS

V.1.1 SISTEMAS DE MIGRAÇÃO

No ensaio em que foi empregado o método de Salame-Mendez *et al.* (2012), o tempo decorrido para a execução da dupla migração sequencial foi de aproximadamente 1h30. A revelação foi realizada com solução de anisaldeído – considerado o melhor revelador no trabalho de Salame-Mendez *et al.* (2012).

Nos pontos nos quais se aplicou solução padrão de ácido deidrocolico e ácido litocolico, houve coloração apenas para a aplicação de 10 µL. Nos pontos onde se aplicou a combinação de todos os padrões, juntos, não houve revelação para nenhuma das duas quantidades. Já para ácido colico e ácido glicocolico houve coloração apenas nos pontos de aplicação de 10 µL. Por fim, para o colesterol (col) houve coloração apenas no ponto de aplicação de 5 µL. Apesar de a revelação ter sido efetiva, o sistema de migração não foi, uma vez que as soluções padrões não ultrapassaram o ponto de partida da cromatografia (Figura 1).



Figura 1: Teste da Cromatografia em TLC das soluções padrões com o sistema de dupla migração sequencial de Salame-Méndez (2012). Nos pontos 1 e 1' aplicou-se o ácido deidrocolico; 2 e 2', ácido litocolico; 3 e 3', ácido colico; 4 e 4' glicocolico; col e col', colesterol; e, por fim, a mistura de todas as soluções padrões em S e S'. Para os pontos 1, 2, 3, 4, col e S foi aplicada um volume de 5µL e, para 1', 2', 3', 4', S' e col', de 10µL. A linha representa o ponto de partida da corrida.

No ensaio baseado no método de Siegfried & Elliot (1968), o tempo decorrido para a execução da migração foi de 2 horas. A revelação com ambos os reveladores foi efetiva, como também a migração dos padrões de ácidos colico, glicocolico e de colesterol (Figura 2).

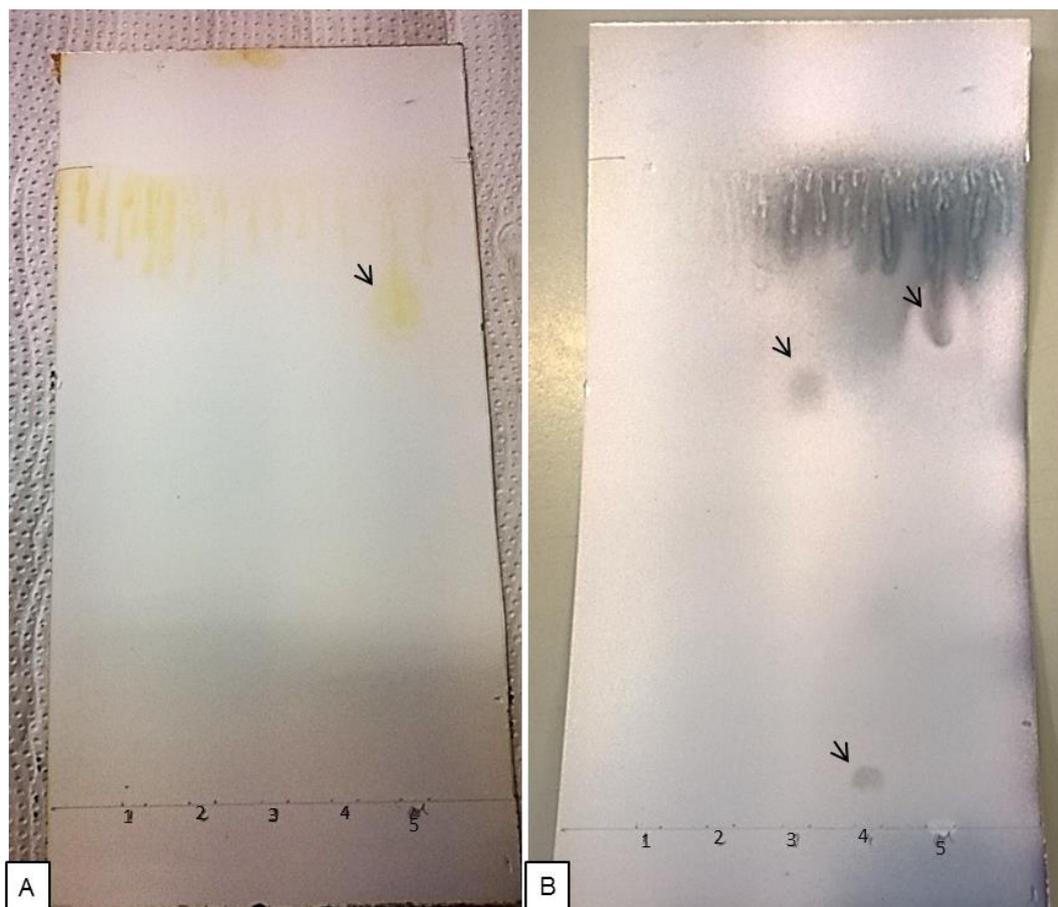


Figura 2(A e B): Teste com cromatoplaça de HPTLC conforme o protocolo utilizado por Siegfried & Elliot (1968). Em A, utilizou-se o iodo metálico para a revelação, enquanto que em B, anisaldeído. No ponto: 1, aplicou-se o ácido deidrocolíco; 2, ácido litocólico; 3, ácido cólico; 4, glicocólico; e 5, colesterol. Para todos os pontos, aplicou-se um volume de 10 μ L.

V.1.2 REVELAÇÕES

O iodo metálico revelou, após permanecer 10 minutos na cuba, de forma tênue e não permanente, todos os padrões, com exceção do colesterol (Fig. 3A). Já as soluções de anisaldeído (Fig. 3B) e de ácido fosfomolibídico (Fig. 3C) revelaram, com cor azulada e permanente, todos (ácido fosfomolibídico) e quase todos (anisaldeído) os padrões. Ademais, nos pontos onde se aplicou 10 μ L, de modo geral, foram obtidas melhores visualizações em relação àqueles com aplicação de 5 μ L. É importante constatar, também, que, dentre os reveladores, o ácido fosfomolibídico foi o mais efetivo, inclusive para os pontos nos quais 5 μ L de solução padrão foram aplicados.



Figura 3(A, B e C): Teste de revelação dos padrões com Iodo metálico, anisaldeído e ácido fosfomolibdico, respectivamente. Nos pontos 1 e 1' aplicou-se o ácido deidrocolico; 2 e 2', ácido litocólico; 3 e 3', ácido cólico; 4 e 4' glicocólico; e 5, colesterol; e, por fim, a mistura de todas as soluções padrões em S e S'. Para os pontos: 1, 2, 3, 4 e 5 foi aplicado um volume de 5 μ L ; para 1', 2', 3', 4', e 5', 10 μ L; Tanto para S, quanto para S',aplicou-se uma alíquota de mesma quantia de cada uma das 5 soluções padrão, sendo que para S, foi de 5 μ L de cada (no total, 10 μ L), e S', 10 μ L (total de 50 (total de 10 μ L) .

V.1.3 ANÁLISE DE AMOSTRAS FECAIS

Os melhores resultados foram obtidos através da cromatografia com HPTLC, com utilização do método de migração de Siegfried e Elliott (1963). Com emprego deste protocolo, foi possível visualizar parte do perfil de sais biliares das espécies analisadas, bem como identificar alguns dos ácidos biliares presentes nas fezes. Foram realizados dois ensaios cromatográficos independentes: uma utilizando o anisaldeído como revelador (Figura 4) e, outra com ácido fosfomolibdico (Figura 5).

Na cromatografia em que se utilizou o anisaldeído como revelador (Figura 4), foi possível identificar quatro componentes diferentes: "a", "b", "c" e "d". Os componentes "a" e "d", por migrarem de mesmo modo como os padrões, correspondem ao ácido glicocólico e ao ácido cólico respectivamente. Já os

componentes “b” e “c” correspondem a ácidos biliares diferentes dos padrões disponíveis, e assim não puderam ser identificados. Os padrões de ácido deidrocolico e ácido litocolico não foram detectados, mas conforme demonstrado por Salame-Méndez *et al.* (2012), usando-se a mistura de solventes de Siegfried e Elliot (1968), tais ácidos biliares migram proximamente ao colesterol. Das amostras avaliadas nesta cromatografia, foi possível identificar os ácidos cólico e glicocolico em *L. geoffroyi*. Além de, outros dois ácidos não identificados (b e c)

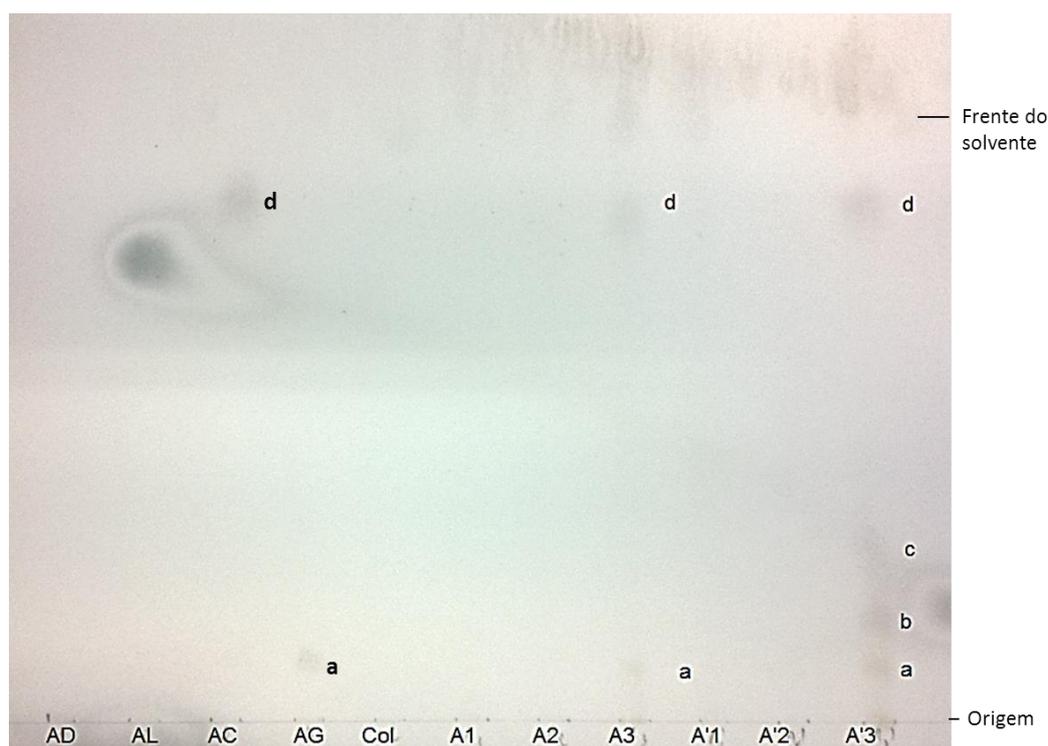
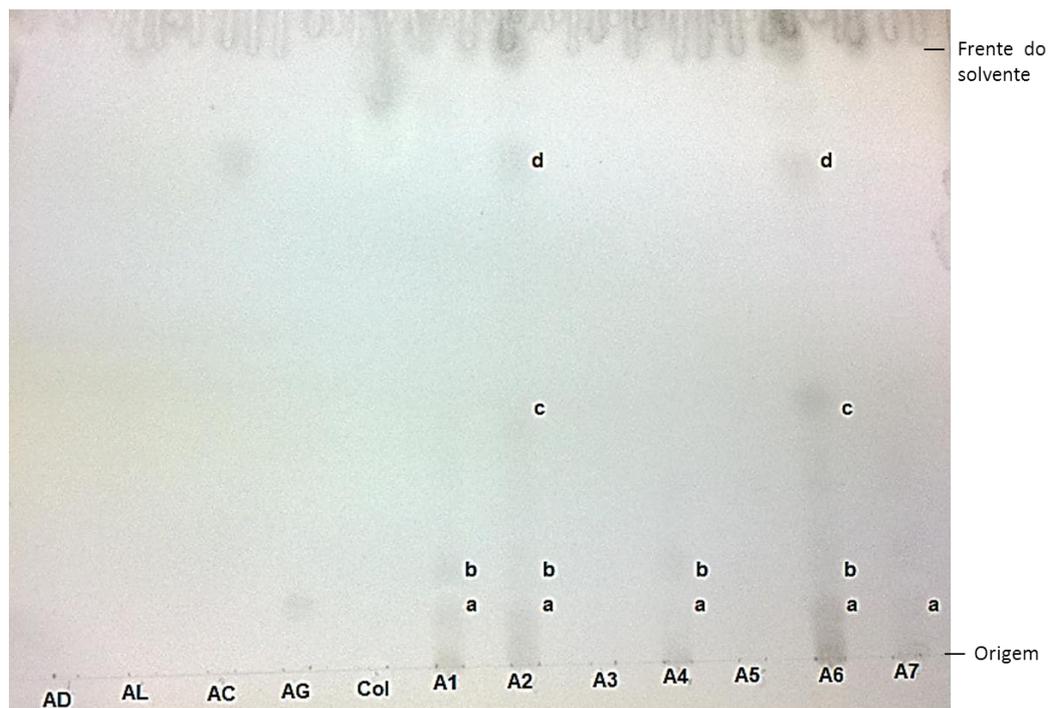


Figura 4: Cromatograma com três amostras fecais diferentes (uma de cada espécie) usando-se anisaldeído como revelador. Volumes de uma mesma amostra, 5µL- sigla sem linha(´) - e 10µL – sigla com linha- foram aplicados em dois pontos diferentes. A amostra de: *Panthera onca* corresponde tanto ao ponto A1 (5µL), quanto ao A'1 (10µL); *Leopardus guttulus*, A2, e A'2; e, por fim, *Leopardus geoffroyi*, A3 e A'3. Legenda – ácido deidrocolico (AD); ácido litocolico (AL); ácido cólico (AC) e “d”; ácido glicocolico (AG) e “a”; colesterol (Col.); ácidos biliares desconhecidos (b e c).

Já na cromatografia onde se utilizou o ácido fosfomolibdico (Figura. 5), foram identificados os mesmos quatro componentes detectados na cromatografia anterior. Novamente, os padrões de ácidos deidrocolico e litocolico não foram detectados. Adicionalmente, foi possível identificar novamente os ácidos cólico e glicocolico, além de outros dois ácidos não identificados (b e c) em *L. geoffroyi* e agora também em *L. guttulus*. em *P. onca*, foi possível identificar o ácido glicocolico e um ácido biliar desconhecido.



Do autor.

Figura 5: Cromatograma com amostras fecais diferentes de sete indivíduos diferentes (dois indivíduos de *L. geoffroyi* e *L. guttulus* e três de *P. onca*) usando-se ácido fosfomolibdico como revelador. De todas as amostras, bem como padrões, aplicaram-se volumes iguais de 10µL na cromatoplaça. As amostras de: *P. onca* correspondem aos pontos A1, A4 e A7; *L. guttulus*, A2 e A5; e, por fim, *L. geoffroyi*, A3 e A6. Legenda – ácido dehidrocólico (AD); ácido litocólico (AL); ácido cólico (AC) e “d”; ácido glicocólico (AG) e “a”; colesterol (Col); ácidos biliares desconhecidos (b e c).

V.2 DISCUSSÃO

Nas condições sob as quais foram realizados os experimentos, até o presente momento, verificou-se que o sistema com apenas uma migração proposto por Siegfried e Elliott (1968), juntamente do uso de cromatofolhas de HPTLC, foi mais adequado para a detecção de ácidos biliares fecais do que o uso de cromatofolhas de TLC e do sistema de dupla migração sequencial de Salame-Méndez (2012). Este tipo de variação de resultados, referentes a diferentes tipos de placa adotadas na cromatografia, já foi relatado por Jiménez *et al.* (1996), por exemplo, em seu estudo para distinção de espécies de carnívoros no Chile. Temperatura e umidade do ar, tanto na coleta da amostra quanto no momento do ensaio, também podem afetar consideravelmente os resultados obtidos através de cromatografia de placa. Ácidos biliares podem ser estáveis, mas são hidrossolúveis (CAPURRO *et al.*, 1997), de modo que em áreas não áridas a chuva pode afetar a

concentração e a persistência dos mesmos (JOHNSON; BELDEN; ALDRED, 1984). Com isso, cromatografias em placa de ácidos biliares serão mais bem sucedidas com amostras provenientes de habitats secos (TARBER *et al.* 1997).

Outro ponto que deve ser salientado é o baixo desempenho das aplicações de 5 μ L, tanto dos padrões quanto das amostras, nas cromatofolhas, quando houve pouca ou nenhuma coloração. A visibilidade das bandas foi consideravelmente maior quando da aplicação de 10 μ L (Figuras 3A, 3B e 3C), o que difere grandemente de 1 a 2 μ L sugeridos por Salame-Méndez (2012). Isso pode ser devido ao fato de a técnica empregada ser qualitativa e não quantitativa, ou seja: peca na padronização das quantidades de sais biliares presentes em cada alíquota retirada das amostras. Tal problemática já fora abordada por Jiménez *et al.*(1996), que aponta que a concentração da amostra a ser usada é, muitas vezes, não especificada, sendo que a presença de tal informação é de suma importância quando se quer padronizar um método para aplicação em estudos individuais sobre o tema.

Alguns fatores adicionais podem estar influenciando nos perfis obtidos, como o meio de conservação utilizado para as amostras, bem como o de extração dos ácidos biliares. Em relação ao primeiro, tanto Stábelli *et al.* (2012), quanto Hunter (2010) utilizam-se de protocolos, e recomendam o armazenamento de fezes a seco (com sílica gel) de modo tirar toda umidade que porventura venha junto da amostra. A presença de umidade pode alterar consideravelmente os resultados obtidos, uma vez que ácidos biliares, apesar de bastante estáveis, são bastante hidrossolúveis. Além disso, o álcool apesar de bom conservante, pode vir a modificar alguma estrutura, influenciando também na obtenção de resultados (HUNTER, 2010). Quanto ao segundo, utilizou-se apenas um dos métodos utilizados por Salame-Méndez (2012), o qual na extração sendo obtida diretamente do meio de conservação das amostras – no caso, álcool 96^oGL. Os demais métodos recomendados – via D:M, ou Benzeno:M (v/v) – ainda não puderam ser testados para a extração, mas deverão em estudos futuros.

Analisando-se amostras escatológicas de *P. onca*, *L. guttulus* e *L. geoffroyi* (Figuras 4 e 5), utilizando-se tanto o anisaldeído quanto o ácido fosfomolibdico como reveladores, foi possível detectar quatro ácidos biliares

diferentes: ácido glicocólico (AG), ácido cólico (AC) e outros dois ácidos biliares desconhecidos (denominados “b” e “c”). Consoante o trabalho de Salame-Méndez *et al.*(2012), os ácidos cólico, deidrocolico e glicocólico apareceram no perfil de *P. onca* assim como os ácidos quenodeoxicólico e taurodeoxicólico (que não foram utilizados neste experimento). Já para *Puma concolor*, os ácidos deidrocolico, deoxicólico, quenodeoxicólico e cólico foram os mais representativos. Assim, os sais biliares detectados neste estudo, mas não identificados, podem ser algum daqueles já detectados no estudo mencionado, e tais padrões bioquímicos devem, assim, ser incorporados a futuros ensaios.

A detecção de um perfil parcial de sais biliares foi possível para todas as espécies quando aplicada uma alíquota de 10 µL na cromatoplaça (Fig. 4 e 5) e utilizando o ácido fosfomolibdico como revelador (Fig. 4). Com o uso do anisaldeído, contudo, apenas o perfil *L. geoffroyi* teve resultados visíveis. Fatores individuais podem ter influenciado no resultado obtido, como diferenças sutis de idade, estado de saúde e alimentação, sem contar nas diferenças intrínsecas e individuais na mesma espécie (FERNÁNDEZ; CORLEY; CAPURRO, 1997; QUINN; JACKMAN, 1994; SALAME-MÉNDEZ *et al.*, 2012). Contudo, ao menos preliminarmente, os resultados indicam que a combinação destas técnicas de corrida e revelação produzem os melhores resultados para as condições locais de coleta e laboratoriais. Assim, é possível se aproximar de um protocolo inicial para detecção de perfis de sais biliares para felinos, o que será de extrema importância em futuros estudos que empreguem esta técnica para descrição e comparação de padrões bioquímicos dentro deste grupo taxonômico. É importante salientar, contudo, que este protocolo ainda deve ser aprimorado, uma vez que alguns ácidos biliares não puderam ser identificados, e outros, provavelmente, não puderam ser detectados através das presentes técnicas.

Através dos resultados obtidos até o momento, é possível visualizar que o perfil observado para *L. guttulus* e *L. geoffroyi* é consideravelmente distinto daquele observado para *P. onca*. Entre *L. guttulus* e *L. geoffroyi*, no entanto, o perfil é bastante similar, diferenciando-se apenas pela intensidade das bandas. Este resultado está em acordo com a filogenia atualmente aceita para a família Felidae (JOHNSON *et al.*, 2006) já que a linhagem *Panthera* é consideravelmente distante

de *Leopardus*. Enquanto isso, *L. guttulus* e *L. geoffroyi* se encontram no mesmo gênero, e assim é esperado que seus perfis bioquímicos fossem mais semelhantes entre si do que a um gênero distinto. Este resultado, mesmo que ainda muito inicial, demonstra o potencial de aplicabilidade desta técnica para distinção de espécies de felinos, embora seja importante salientar que mais indivíduos de cada uma das espécies devem ser incluídos na análise para que se isole o fator individual nas análises. Ao mesmo tempo, o protocolo de detecção deve ser aprimorado para que mais ácidos biliares sejam detectados e identificados, buscando encontrar padrões distintos mesmo em espécies filogeneticamente próximas, como *L. guttulus* e *L. geoffroyi*.

Outro ponto que deve ser mencionado é a possível interferência da hibridação reportada entre *L. guttulus* e *L. geoffroyi* (TRIGO *et al.* 2008) no perfil bioquímico de ambas as espécies. Tal processo parece estar acontecendo no centro do estado do RS, mas é possível encontrar indivíduos híbridos mesmo em pontos distantes da potencial zona de contato entre as espécies. Como os indivíduos coletados para este estudo são provenientes do RS, é possível que apresentem algum grau de hibridação, o que pode levar a um maior compartilhamento de material genético e, por consequência, do nível de similaridade entre seus perfis de sais biliares. Para contornar esta situação deve-se buscar coletar material fecal de indivíduos mais distantes da zona de contato (ou seja, de fora do estado). Outra possibilidade é incluir outras espécies de *Leopardus* na análise, como *L. wiedii*, que, apesar de ser filogeneticamente próxima e morfologicamente semelhante a *L. guttulus* e *L. geoffroyi*, não possui casos de hibridação reportados com nenhuma outra espécie.

VI. PERSPECTIVAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste trabalho fazer parte de um estudo em andamento, sendo assim bastante iniciais. Ainda assim, é importante salientar que, embora preliminarmente, foi possível identificar um protocolo inicial de trabalho para

descrição de perfis de sais biliares para felinos, que será bastante útil para continuidade dos estudos e busca dos objetivos propostos. Ao mesmo tempo, é possível identificar potencialidade de distinção entre diferentes espécies utilizando a metodologia proposta. Este fator é bastante relevante para estudos que busquem empregar coleta não invasiva de mamíferos silvestres, como os felinos, já que ensaios cromatográficos são mais rápidos e consideravelmente mais baratos que os genéticos, atualmente os mais utilizados para o mesmo fim. Se for possível identificar padrões bioquímicos únicos para diferentes espécies, será possível reduzir o custo da identificação de fezes, abrindo interessantes possibilidades de realização de estudos ecológicos, como áreas de ocorrência e dieta, a baixo custo.

Quanto às limitações metodológicas enfrentadas, fatores que puderam afetar os resultados deverão ser considerados em experimentos futuros. O método de extração dos ácidos biliares, por exemplo, é um passo do protocolo que pode vir a ser melhorado, tendo em vista uma maior padronização das quantidades de sais biliares presentes em cada amostra. A obtenção de amostras de indivíduos de *L. geoffroyi* procedentes de regiões distantes da zona de hibridação com *L. guttulus* também poderão auxiliar na visualização e estabelecimento dos perfis de ambas as espécies. Por fim, amostras de mais indivíduos de cada espécie e, quem sabe, de indivíduos de ao menos alguma outra espécie de felino do mesmo gênero – como *L. wiedii* – também ajudariam nesta investigação.

Ademais, tais resultados são apenas uma prévia das análises cromatográfica das amostras fecais dos felinos em andamento. Ficam, pois, algumas pendências, tais como: analisar a possibilidade de estabelecimento de um perfil de sais biliares para cada espécie (i.e., *Leopardus guttulus* e *Leopardus geoffroyi*); analisar se há diferença na visualização do perfil cromatográfico para amostras na forma de duplicatas de um mesmo indivíduo conservadas uma, em meio líquido, e outra, a seco; analisar se existe diferença significativa entre o perfil de sais biliares de machos e fêmeas da mesma espécie; analisar se existem diferenças significativas entre indivíduos da mesma espécie e do mesmo sexo. Apesar do grande número de problemáticas envolvidas no desenvolvimento de um protocolo final e funcional, o potencial benefício do estabelecimento desta metodologia tem ótimas perspectivas de aplicação, justificando futuros e continuados esforços nesta área.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, F. C.; LEMOS, F.G.; ALMEIDA, L.B.; CAMPOS, C.B.; BEISIEGEL, B. M.; PAULA, R. C.; CRAWSHAW JR, P. G.; FERRAZ, K.M.P.M.B.; OLIVEIRA, T.G.. Avaliação do risco de extinção da onça-parda, *Puma Concolor* (Linnaeus, 1771) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, vol. 3, n. 1, p. 107-121, 2013.
- BEJA-PEREIRA, A.; OLIVEIRA, R.; ALVES, P.C.; SCHWARTZ, M.K.; LUIKART, G.. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. **Molecular Ecology Resources**, vol. 9, p.1279-1301, 2009.
- BURNHAM, E.; BENDER, L. C.; EICEMAN, G. A.; PIERCE, K.M.; PRASAD, S.. Use of volatiles organic components in scat to identify canids species. **Journal of Wildlife Management**, vol. 72, p. 792-797, 2008..
- BRASIL.Portaria MMA nº 444, de 17 de dezembro de 2014 . Disponível em: < <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/60-fauna-brasileira/2741-lista-de-especies-ameacadas-saiba-mais.html>>. Acesso em: 10 nov. 2015.
- BROQUET, T.; PETIT, E. Quantifying genotyping errors in noninvasive population genetics. **Molecular ecology**, vol. 13, n. 11, p. 3601–8, 2004.
- CAPURRO, A. F. *et al.* Improved Bile-Acid Thin-Layer Chromatography to Identify Feces of Neotropical Carnivores. **The Journal of Wildlife Management**, vol. 61, n. 4, p. 1424–1427, 1997.
- CHAME, M. Terrestrial Mammal Feces : a Morphometric Summary and Description. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 98, p. 71–94, 2003.
- CHARPENTIER, M. J. E. *et al.* Critical thinking in the chemical ecology of mammalian communication: Roadmap for future studies. **Functional Ecology**, 2012.
- CITES. **Convention of International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora**. 2015. Disponível em: < <https://www.cites.org/eng/app/appendices.php>> . Acesso em: 08 nov. 2015.
- DÁLEN, L.; GOTHERSTROM, A.; ANGERBJORN, A.. Identifying species from pieces of faeces. **Conservation Genetics**, vol. 5, p. 109-111, 2004.
- DE ALMEIDA, L.B; QUEIROLO, D.; DE OLIVEIRA, T.G. & BEISIEGER, B. M..**Avaliação do risco de extinção do Gato-do-mato *Leopardus geoffroyi* (d’Orbigny & Gervais, 1844) no Brasil**. In: Oficina de Avaliação do Estado de Conservação dos Mamíferos Carnívoros do Brasil, 2011, Iperó, SP. Iperó: ICMBIO, 2011, p.84-90
- DE OLIVEIRA, T.G.; TORTATO, M. A.; DE ALMEIDA, L.B.; DE CAMPOS, C. B. & BEISIEGEL, B. M.. **Avaliação do risco de extinção do Gato-do-mato *Leopardus tigrinus* (Schreber, 1775) no Brasil**. In: Oficina de Avaliação do Estado de Conservação dos Mamíferos Carnívoros do Brasil, 2011, Iperó, SP. Biodiversidade Brasileira, n. 3, vol 1, Iperó: ICMBIO, 2013, p.56-65.

FELDHAMER, George A. *et al.* **Mammalogy**: Adaptation, Diversity, Ecology. 3rd Ed. Baltimore, Johns Hopkins University Press, 2013. 768p..

FERNÁNDEZ, G. J.; CORLEY, J. C.; CAPURRO, A. F. Identification of Cougar and Jaguar Feces through Bile Acid Chromatography. **The Journal of Wildlife Management**, vol. 61, n. 2, p. 506–510, 1997.

HAGEY, L. R. *et al.* Evolutionary diversity of bile salts in reptiles and mammals, including analysis of ancient human and extinct giant ground sloth coprolites. **BMC evolutionary biology**, 2010.

HOFFMANN, A.F; HAGEY, L. R. & KRASOWSKI, M.D.. Bile salts of vertebrates: structural variation and possible evolutionary significance. **Journal of Lipid Research**, n. 51, vol. 2, p.p. 226-246, 2010.

HOSS, N.; KOHN, M.; PAABO, S.; KNAUR, F.; SCHRODER, W.. Excrement analysis by PCR.. **Natura**, vol. 359, p. 199, 1992.

HUNTER, L. **Biomaterial Sampling for Genetic Studies**. p. 1–20, 2010.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. 2015. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org/search?page=1>>. Acesso em: 08 nov. 2015.

JIMENEZ, J. E.; YANEZ, J. L.; JAKSI, F. M. Inability of thin-layer chromatography to distinguish feces from congeneric foxes by their bile acid contents. **Acta Theriologica**, 1996.

JOHNSON, M. K.; BELDEN, R. C.; ALDRED, D. R. Allen Press Differentiating Mountain Lion and Bobcat Scats. **The Journal of Wildlife Management**, v. 48, n. 1, p. 239–244, 1984.

JOHNSON, W. E. *et al.* The Late Miocene Radiation of Modern Felidae: A Genetic Assessment. **Nature**, vol. 311, January, 2006.

KOHN, M. H.; YORK, E. C.; KAMRADT, D. A.; HAUGT, G.; SAUVAJOT, R. M.; WAYNE, R. K.. Estimating population size by genotyping faeces. **Proceedures of the Royal Society of London**, Series B., vol. 266, p. 657-663, 1999.

KRTICHEVSKY, D.; MARTAK, D. S.; ROTHBLAT, G. H. Detection of Bile Acids in Thin-Layer Chromatography. **Analytical Biochemistry**, vol. 5, p. 388–392, 1963.

LINELL, J.D.C. & STRAND, O.. Interference interactions, co-existence and conservation of mammalian carnivores. **Diversity and Distributions**, vol. 6, p. 169-176, 2000.

LONG, Robert A. *et al.* **Noninvasive Survey Methods for Carnivores**. Washington, Island Press, 2008. 400p..

MATTE, E. M. et al. Molecular evidence for a recent demographic expansion in the puma (*Puma concolor*) (Mammalia, Felidae). **Genetics and Molecular Biology**, 2013.

MICHALSKI F., VALDEZ F.P., NORRIS D. *et al.*. Successful carnivore identification with faecal DNA across a fragmented Amazonian landscape. **Molecular Ecology Resources**, vol. 11, p. 862-871, 2011.

QUINN, T.; JACKMAN, W. R. Influence of Diet on Detection of Fecal Bile Acids by Thin-Layer Chromatography. **The Journal of Wildlife Management**, vol. 58, n. 2, p. 295–299, 1994.

SALAME-MÉNDEZ, A.; ANDRADE-HERRERA, M.; ZAMORA-TORRES, L.; SERRANO, H.; SOTO-MENDOZA, S.; CASTRO-CAMPILLO, A.; RAMÍREZ-PULIDO, J. & HARO-CASTELLANOS, J. . Método optimizado para evaluar ácidos biliares de muestras fecales secas o preservadas em etanol como herramienta para identificar carnívoros silvestres. **Acta Zoológica Mexicana**, n. 28, vol.2, p 305-320, 2012.

SANZ, B.; TURÔN, J.V.; BALLMORÍ, A. **Huellas y rastros de los mamíferos ibéricos**. Zaragoza: Ediciones Muskari, 2ª Ed., 2007.

SARAIVA, M.J.; SALVADOR, A.C.; FERNANDES, T.; FERREIRA, J.P.; BARROS, A. S.; ROCHA, S.M.; FONSECA, C.. Three mammal species distinction through the analysis of scats chemical composition provided by comprehensive two-dimensional gás chromatography. **Biochemical Systematics and Ecology**, vol. 55, p. 46-52, 2014.

SIEGFRIED, M.; ELLIOTT, H. Separation of bile acids of rat bile by thin-layer chromatography. **Journal of Lipid Research**, vol. 9, n. 3, p. 394–395, 1968.

SMITH, O.; WANG, J. When can noninvasive samples provide sufficient information in conservation genetics studies? **Molecular Ecology Resources**, 2014.

SOINI, H. A. et al. Investigation of Scents on Cheeks and Foreheads of Large Felines in Connection to the Facial Marking Behavior. **Journal of Chemical Ecology**, 2012.

SOSO, S. B. et al. Analytical methods for chemical and sensory characterization of scent-markings in large wild mammals: A review. **Sensors** , Switzerland, 2014.

STÁBELI, R. G. *et al.* **Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis**. first ed.[s.l.] InTech, 2012.

TABER, A. A.; NERIS, N. *et al.* The food habits of sympatric jaguar and puma in the paraguayan chaco. **Biotropica**, vol. 29, p. 204-213, 1997.

TABERLET, P.; WAITS, L. P. Noninvasive genetic sampling : look before you leap. **Molecular Ecology**, vol. 14, n. 8, p. 323–327, 1999.

TAYLOR, W. The bile acid composition of rabbit and cat gall-bladder bile. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 8, p. 1077–1084, 1977.

TRIGO, T.C.; FREITAS T.R.O.; KUNZLER G.; CARDOSO L.; SILVA J.C.R.; JOHNSON W.E.; O'BRIEN S.J.; BONATTO S.L. & EIZIRIK E. Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. **Molecular Ecology**, vol. 17, p. 4317-4333, 2008.

WAITS, L.P.; PAETKAU, D.. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. **Journal of Wildlife Management**, vol. 69, p.1419–1433, 2005.

WANG, J.-F.; ZHANG, Y.-P.; YU, L. Summary of phylogeny in family Felidae of Carnivora. **Hereditas** , Beijing, vol. 34, n. 11, p. 1365–1378, 2012.

WEBBON, C. C.; BAKER, P.J.; HARRIS, S.. Faecal density counts for monitoring changes in red foxes numbers in rural Britain. **Journal of Applied Ecology**, vol. 41, p. 768-779, 2004.

WULTSCH, C.; WAITS, L.P.; KELLY, M. J.. Noninvasive individual and species identification of jaguars (*Panthera onca*), pumas (*Puma concolor*) and ocelots (*Leopardus pardalis*) in Belize, Central America using cross-species microsatellites and faecal DNA. **Molecular Ecology Resources**, 2014.

WYATT T.D.. Pheromones and signature mixtures: defining species-wide signals and variables cues for identity in both invertebrates and vertebrates. **Journal of Comparative Physiology**, vol 196, p. 685-700, 2010.

WYATT T.D.. **Pheromones: convergence and contrasts in insects and vertebrates**. In: MASON R.T., LEMASTER M.P., MÜLLER-SCHWARZE S. (Eds.). Chemical signals in vertebrates. New York, Springer, vol 10, p. 7-20, 2005.