



Lana Resende de Almeida

Mustelídeos neotropicais: Das moléculas à Conservação

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biologia Animal.

Área de concentração: Biodiversidade.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria João Ramos Pereira.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

PORTO ALEGRE

2022

Lana Resende de Almeida

Mustelídeos Neotropicais: Das moléculas à Conservação

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do grau de
Doutora em Biologia Animal.

Aprovada em 11 de Abril de 2022.

Dr^a Maria João Ramos Pereira – Orientadora.

Dr^a Caroline Leuchtenberger – Instituto Federal Farroupilha/ Projeto Ariranhas.

Dr Márcio Borges Martins – PPGBAN/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dr^a Tatiana Lemos Bisi – Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

*Dedico este trabalho a todes cientistas
brasileires que compartilharam comigo
a resistênciã e a agonia de ser luz em
novos tempos de escuridão.*

*“É só na escuridão que se
percebe os vagalumes .”*

(Emicida – É tudo pra ontem)

AGRADECIMENTOS

À minha família, sou imensamente grata por tudo e especialmente ao legado da Educação - que (trans)forma pessoas e estas são capazes de mudar o mundo. Para germinar grandes sonhos, a Educação é raiz, mas sem vocês eu não manteria nada em pé. Amo vocês.

À minha orientadora a Professora Maria João sou muito grata pela oportunidade de poder desenvolver uma pesquisa com os mustelídeos sob sua orientação ao longo desses anos. Muito obrigada por acreditar em meu potencial como pesquisadora e me guiar mesmo quando os caminhos pareceram mais sombrios. Seguimos na luta! Muito obrigada!

Aos meus amigos do BiMaLab, eu desejo que nossas flores sejam cada vez mais bonitas e nossos frutos duradouros! Somos resilientes por natureza, muito obrigada por serem minha família todo esse tempo. Que as nossas aventuras nunca sejam esquecidas e nossa amizade permaneça atemporal.

Ao meu companheiro Guilherme Oyarzabal, muito obrigada por me cuidar, cultivar amor e transformar os momentos mais difíceis em primavera. Por trazer flores roubadas da vizinhança nos meus dias mais cinzas e torcer por meus frutos acadêmicos e pessoais. Ainda bem que eu te encontrei. Te amo 3000.

À minha família gaúcha, muito obrigada pelo acolhimento e afeto, estamos juntos! Às duas irmãs que o RS me deu, Danielle Franco e Tiele Machado, obrigada serem quem são, me ensinarem tanto e estarem em todos os momentos dessa longa jornada ao meu lado. Vocês são as flores mais valiosas desse meu jardim “cariucho”.

Agradeço aos profissionais de psicologia e psiquiatria que me acompanham e acompanharam durante a devastação que os últimos tempos causaram no caminho em me tornar uma pesquisadora competente e feliz, minha gratidão pela gentileza e empatia, continuo seguindo em frente.

À Rede Kunhã Asé de Mulheres na Ciência, muito obrigada por segurarem todas minhas pontas, galhos, folhas e tudo que apareceu durante esse Doutorado. Vocês me restauram de esperança a cada dia.

Por fim, agradeço imensamente à todos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo apoio e carinho. Bem como, a CAPES pela concessão da minha bolsa de Doutorado.

Thank you, The Rufford Foundation for financial support.

“Agora é hora de ser refloresta.” - Gilberto Gil

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
SUMÁRIO.....	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS.....	10
RESUMO	11
ABSTRACT	13
ESTRUTURA DA TESE	15
CAPÍTULO 1 – Introdução Geral	17
JUSTIFICATIVA	20
OBJETIVOS.....	20
LITERATURA CITADA	21
CAPÍTULO 2 – A química dos Mustelídeos Neotropicais.	24
2.1. Neotropical mustelids: fecal metabolome diversity and its potential for taxonomic discrimination	25
2.2. Do faecal bile acid analyses allow taxonomic discrimination between neotropical mustelids?	54
2.3. Landscape marks on the chemical profiles of the neotropical otter	56
CAPÍTULO 3 – Ecologia de populações e desafios de monitoramento.	58
3.1. Do modified landscapes affect spatiotemporal patterns of tayras and lesser grisons?	59
CAPÍTULO 4 - Caminhos da popularização da Ciência para a Conservação.....	62
4.1. Clube da Lontra – Divulgação Científica	62
4.2. Relatório técnico – Mustelídeos do Rio Grande do Sul	64
CAPÍTULO 5 – Conclusão Geral.....	104
MATERIAL SUPLEMENTAR 1.	105

LISTA DE FIGURAS

Figure 1 Chemical profiles of the most representative chemical classes of compounds found in the fecal samples of the five species of mustelids – Giant otter (GO), Neotropical otters (NO), Greater grisons (GG), Lesser grisons (LG) and Tayra (TA). The classes represented are equivalent to at least 94% of the profiles of each species. 37

Figure 2 Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) of the chemical profiles from fecal samples of the analyzed mustelids. PLS-DA discriminated three groups corresponding to the three analyzed species: Tayras (TA), Lesser grison (LG), and Neotropical otter (NO). TA – Tayra (orange lines); LG – Lesser grison (green lozenges); and NO – Neotropical otter (purple triangles) 38

Figure 3 Resumo dos principais resultados encontrados ao longo deste projeto de pesquisa.....104

LISTA DE TABELAS

Table 1 Similarity percentage (SIMPER) analysis revealed a top 10 of compounds in composition that contribute to dissimilarity among mustelids species (> 50% cumulative contribution). Details of all compound contributions at Supplementary Material 2- DS2.	39
---	----

RESUMO

Ações antrópicas têm causado a degradação ambiental, a perturbação dos ecossistemas e o crescimento de ameaças à biodiversidade planetária. Mamíferos têm sido amplamente afetados não só pela perda de habitats, mas também diretamente pela caça e a disseminação de zoonoses. Os mustelídeos – mamíferos da Ordem Carnívora - possuem particular relevância para a conservação da biodiversidade por ocuparem diferentes níveis tróficos e habitarem em uma variedade de habitats. No entanto, pouco se sabe sobre a ecologia de espécies neotropicais e suas respostas frente a distúrbios antrópicos. Nesta Tese, questões de ecologia química e ecologia de populações de espécies de mustelídeos neotropicais foram investigadas, visando desvendar aspectos biológicos relevantes para conservação das espécies e avaliar metodologias de monitoramento de suas populações. Além disso, iniciativas de popularização da Ciência para subsidiar a conservação do grupo foram desenvolvidas. Em âmbito da ecologia química, a partir de amostras fecais oriundas de animais de cativeiro a diversidade de compostos químicos que frequentemente estão relacionados com a fisiologia, a reprodução e a comunicação dos mustelídeos, foi descrita para *Galictis cuja*, *Galictis vittata*, *Eira barbara*, *Lontra longicaudis* e *Pteronura brasiliensis*. Diferenças interespecíficas nos perfis químicos foram detectadas, revelando o potencial da metodologia desenvolvida para discriminação taxonômica. Variações químicas mais sutis parecem ser associadas a mudanças ambientais e contaminação nos perfis químicos de *L. longicaudis* oriundos de amostras fecais coletadas em cursos d'água de duas diferentes bacias hidrográficas do sul do Brasil – a Bacia do Rio dos Sinos e do Rio Camisas. Ademais, através de armadilhagem fotográfica em cinco áreas no limite sul da Mata Atlântica, os padrões espaciotemporais das populações de *E. barbara* e *G. cuja* foram investigados, entre os anos de 2017 e 2019. Os resultados apontam para uma plasticidade ambiental na ocupação de diferentes

paisagens pelas duas espécies. Entretanto, os padrões de atividade de *E. barbara* encontrados foram mais crepusculares que diurnos em regiões com grande densidade humana revelando um possível ajuste à atividade humana de modo a reduzir encontros. A atividade de *G. cuja* parece responder à presença de predadores do que a distúrbios antrópicos. A experiência de divulgação científica deste projeto alcançou mais de 500 pessoas dentre cientistas e não-cientistas sendo também uma promissora conexão com outros projetos e pesquisadores que investigam os mustelídeos. O conhecimento técnico-científico adquirido nesse projeto foi sistematizado e simplificado em um relatório técnico de linguagem acessível. Este relatório está disponível para gestores e tomadores de decisão da área ambiental, servindo como base futura para novas iniciativas de conservação e manejo das espécies de mustelídeos que ocorrem no sul da Mata Atlântica. No futuro, estudos de ecologia química poderão revelar compostos intimamente associados à comunicação dos mustelídeos. Para além disso, outras variáveis biológicas como interações com outras espécies e a fisiologia devem ser considerados para explicar os padrões espaciotemporais dos mustelídeos em ambientes antropizados, no sentido de contribuir, de forma mais abrangente, para a definição de medidas para a conservação do grupo.

Palavras-chave: Conservação, ecologia, Mata Atlântica, Mustelidae.

ABSTRACT

The anthropogenic impact has been causing environmental degradation, disturbance of ecosystems, and the growth of threats to planetary biodiversity. Mammals have been affected not only by the loss of their habitats but directly by hunting and dissemination of zoonoses. Mustelids - mammals of the Carnivora order - have particular relevance for the conservation of biodiversity since they occupy different trophic levels and inhabit a variety of habitats. However, little is known about the ecology of Neotropical species and their responses to anthropogenic disturbances. Here, the chemical ecology and population ecology of Neotropical mustelids were investigated, to uncover biological aspects relevant to the conservation of species and to evaluate methodologies for monitoring their populations. In addition, the scientific dissemination of project was realized to sensitize people for conservation of the group. In the field of chemical ecology, from fecal samples from captive animals, the diversity of chemical compounds that are often related to physiology, reproduction and communication of mustelids was described for *Galictis cuja*, *Galictis vittata*, *Eira barbara*, *Lontra longicaudis* e *Pteronura brasiliensis*. Interspecific differences in chemical profiles were also detected, revealing the potential of the methodology developed for taxonomic discrimination. More subtle chemical variations seem to be associated with environmental changes and contamination in the chemical profiles of *L. longicaudis* from fecal samples collected from watercourses in two different river basins in southern Brazil – the Rio dos Sinos and Rio Camisas basins. Moreover, through camera-trapping in five areas on the southern edge of the Atlantic Forest, the spatiotemporal patterns of the populations of *E. barbara* and *G. cuja* were evaluated, between the years 2017 and 2019. The results point to the environmental plasticity of these species across different landscapes. However, the activity patterns of *E. barbara* were more crepuscular than diurnal in regions with high human density,

revealing a possible adjustment to human activity close to the sampled areas. While the activity of *G. cuja* seems to be more closely related to the presence of predators or physiology of the species than to anthropic disturbances. The social media pages reached almost five hundred people among scientists and non-scientists, being also a promising connection with other projects and researchers that investigate mustelids. The technical-scientific knowledge obtained in this project was systematized and simplified into a technical report. This report is accessible to managers and decision-makers that work with environmental issues, serving as a future basis for new conservation initiatives and management of mustelid species that occur in the south of the Atlantic Forest. In the future, chemical ecology studies may reveal compounds closely associated with mustelid communication. In addition, other biological variables such as interactions with other species and physiology should be considered to explain the spatiotemporal patterns of mustelids in anthropic environments. This can contribute to more comprehensive actions for the Mustelids conservation.

Keywords: Atlantic Forest, Conservation, Ecology, Mustelidae.

ESTRUTURA DA TESE

Esta Tese de Doutorado é composta por uma Introdução Geral (Capítulo 1) que visa contextualizar as temáticas desenvolvidas na presente pesquisa científica, a biologia de seus organismos modelo e as questões centrais do projeto desenvolvido.

Três eixos norteadores compõe a presente Tese: Capítulo 2 – Perfis químicos dos mustelídeos neotropicais, Capítulo 3- Ecologia de populações e desafios de monitoramento. Cada eixo é composto uma breve introdução e um ou mais artigos científicos que representam o desenvolvimento deste Projeto de Doutorado. Capítulo 4 é composto por um relato de como se estabeleceu a Divulgação Científica deste projeto, bem como de um relatório técnico. O objetivo foi tornar os achados desta pesquisa uma base científica acessível para novas tomadas de decisão em prol da conservação de mustelídeos neotropicais e estudos futuros. Por fim, é apresentada uma conclusão geral da Tese (Capítulo 5).

CAPÍTULO 1 – Introdução Geral

A família Mustelidae é a mais diversa dentre os mamíferos da Ordem Carnivora. Os primeiros mustelídeos surgiram no Oligoceno (33.9-29 milhões de anos) na Eurásia (Koepfli et al. 2017) e atualmente a família inclui cerca de 65 espécies através oito subfamílias: **Guloninae** –que inclui as martas (gênero *Martes*), os carcajus (*Gulo gulo*) e as iraras (*Eira barbara*); **Ictonychinae** – furões sulamericanos (*Galictis* sp. e *Lycondon patagonicus*), doninhas listradas (*Ictonyx* sp.), as doninha-de-nuca-branca (*Poecilogale albinucha*) e as doninhasmarmoreadas (*Vormela peregusna*); **Lutrinae** – que abrange todas as espécies de lontras (*Aonyx* sp., *Enhydra lutris*, *Hydrictis maculicollis*, *Lontra* sp., *Lutra* sp., *Lutrogale perspicillata*, e *Pteronura brasiliensis*); **Mellinae** – de texugos-europeus (*Meles* sp.) e texugos-porco (*Arctonyx* sp.); a mais numerosa Mustelinae – que inclui arminhos, furões, tourões, vison europeus e doninhas (*Mustela* sp.) e doninhas neotropicais (*Neogale* sp.). Além disso, a Mustelidae abrange a subfamília **Hectidinae** – representada pelos texugos-furões (*Melogale* sp.), e ainda, as monoespecificas subfamílias **Mellivorinae** – dos ratéis (*Mellivora capensis*) e **Taxidiinae** – representada pelos texugos americanos (*Taxidea taxus*) (Koepfli et al. 2017).

Os mustelídeos são predadores de corpo alongado e partas curtas que ocorrem em quase todos os continentes do planeta com exceção da Antártida, ocorrendo naturalmente numa grande diversidade de ambientes desde áreas nevadas, desertos, florestas tropicais até ambientes antropizados (Macdonald et al. 2017). Além disso, algumas espécies deste grupo, se adaptaram a viver na interface entre diferentes habitats, como as iraras e as doninhas, consideradas semi-arborícolas e a maioria das espécies de lontras e visons, que são espécies semiaquáticas. Mustelidae estão em praticamente em todos os ambientes terrestres e aquáticos do planeta, sendo também bem-sucedidos

quando introduzidos para controle populacional de pragas agrícolas (Macdonald et al. 2017; Wright et al. 2022). Algumas espécies podem também ser adquiridas como animais domésticos (Macdonald et al. 2017; Wright et al. 2022).

Os mustelídeos atuam em diferentes níveis nas redes tróficas onde estão inseridos, seja como predadores de topo, carnívoros e onívoros. Com inúmeras estratégias de forrageio como fossoriais, arborícolas ou aquáticos, a maioria das espécies são onívoras ou carnívoras generalistas, se alimentando inclusive de carcaças e resto de presas de outros predadores, o que revela seu oportunismo e suas diferentes facetas na manutenção das teias alimentares (Macdonald et al. 2017). Além disso, podem ser reservatórios de zoonoses (Boklund et al. 2021; Díaz et al. 2021).

A comunicação vocal e química são as mais conhecidas dentre as espécies de mustelídeos suportando interações intra e interespecíficas desde reconhecimento social e comportamento reprodutivo até delimitação de territórios, defesa e comportamentos agonísticos (Davies 2009; Buesching and Stankowich 2017).

Apesar da plasticidade ambiental evidente, mais de 40% estão com suas populações em declínio ou em situação desconhecida (IUCN 2022). Dentre as principais ameaças estão a caça e o tráfico ilegal, bem como a perda, a degradação e a fragmentação ambiental o, que por sua vez contribuem para o aumento dos conflitos com humanos, por usarem ambientes antropizados, caçando animais domésticos, ou sofrendo colisões por atropelamento (Wright et al. 2022).

Na região Neotropical ocorrem doze espécies de mustelídeos, sendo que nove apresentam populações em decréscimo ou são insuficientemente conhecidas (Nagy-Reis

et al. 2020; IUCN 2022). No Brasil, ocorrem: a doninha-amazônica (*Neogale africana*) (Patterson et al. 2021), duas espécies de furão (o furão-pequeno e o furão-grande, *Galictis cuja* e *Galictis vittata*), duas espécies de lontras de rio – a ariranha (*Pteronura brasiliensis*) e a lontra neotropical (*Lontra longicaudis*) e ainda a irara (*Eira barbara*) (Reis et al. 2006).

Os status de conservação da doninha, das espécies de furões e da irara são considerados “Menos Preocupante”, no entanto suas populações estão em declínio ou possuem tendências desconhecidas (IUCN 2022). A lontra neotropical é uma espécie “Quase Ameaçada” enquanto a ariranha está classificada como “Em perigo” estando as populações de ambas as espécies em declínio (IUCN 2022). Apesar de todas estas espécies estarem distribuídas amplamente no território brasileiro ainda existem muitas lacunas de conhecimento acerca dos mustelídeos que inviabilizam iniciativas efetivas para o seu monitoramento e a sua conservação (Almeida et al. 2017).

Inúmeras técnicas conhecidas têm sido aplicadas ao estudo da ecologia e monitoramento de mustelídeos ao redor do mundo (Kean et al. 2011; Massara et al. 2016; Noonan et al. 2019; Bianchi et al. 2021). Metodologias menos invasivas como a coleta de vestígios têm servido de base para aumentar o conhecimento ecológico das espécies – como ocorrência, uso do habitat e dieta – bem como sobre aspectos genéticos e evolutivos (Zapata et al. 2005; Rheingantz et al. 2011; Trinca et al. 2013; Latorre-Cardenas et al. 2021).

Em particular para os mustelídeos, que possuem glândula anal bem desenvolvida, a comunicação por pistas químicas depositadas juntos aos incrementos parecem ter um

relevante papel ecológico na delimitação territorial e de uso de recursos (Kean et al. 2011). No entanto, pouco se sabe sobre a diversidade compostos químicos que atuam nas interações dos mustelídeos neotropicais e ainda, se os padrões desses compostos podem oferecer uma potencial ferramenta de monitoramento dessas espécies a partir de amostras fecais não-invasivas.

Aspectos como distribuição e sobreposição de nicho de espécies de mustelídeos também têm sido investigados a partir de amostragens com armadilhas fotográficas, subsidiando iniciativas de conservação para o grupo (Rheingantz et al. 2016; Villafañe-Trujillo et al. 2021). No entanto, por serem animais esquivos e de difícil identificação individual, parâmetros demográficos, comunicação, respostas à ação antrópica e à degradação dos habitats ainda permanecem omissos para espécies que ocorrem em ambientes complexos. Dessa forma, a conservação dos mustelídeos neotropicais ainda enfrenta barreiras não só pela escassez de conhecimento da biologia das espécies, mas também por falta de metodologias eficientes e adequadas para o seu monitoramento.

Nesta Tese abordamos as espécies de mustelídeos neotropicais que ocorrem no Brasil, com exceção da doninha-amazônica. Ao passo que nossa pesquisa em campo focaram em investigar o furão-pequeno (*Galictis cuja*), a irara (*Eira barbara*) e a lontra neotropical (*Lontra longicaudis*) por estas espécies ocorrerem no Estado do Rio Grande do Sul.

JUSTIFICATIVA

O presente estudo é justificado, primeiramente, pelo status de conservação das espécies e suas tendências populacionais dos mustelídeos neotropicais e pela necessidade de estudos de ecologia, comportamento e aplicações de metodologias para o monitoramento de mustelídeos no Brasil contribuindo para futuros planos de gestão e conservação deste grupo e de outros mesopredadores.

OBJETIVOS

Nessa Tese objetivamos:

- Investigar o potencial de duas metodologias não-invasivas para monitoramento de mustelídeos neotropicais, visando a implementação de técnicas mais adequadas para a conservação dessas espécies no futuro.
- Conhecer a ecologia química, os padrões espaciotemporais e as respostas dos mustelídeos às mudanças ambientais causadas pelos humanos.
- Relatar nossa experiência na divulgação científica e sensibilização da sociedade para conservação dos mustelídeos neotropicais,
- Disponibilizar materiais mais acessíveis sobre os principais achados da pesquisa científica desenvolvida neste projeto.

LITERATURA CITADA

Bianchi, R. et al. 2021. Tayra (*Eira barbara*) landscape use as a function of cover types, forest protection, and the presence of puma and free-ranging dogs. *Biotropica* 53(6), pp. 1569–1581. doi: 10.1111/btp.13005.

Boklund, A. et al. 2021. Monitoring of SARS-CoV-2 infection in mustelids. *EFSA Journal* 19(3). doi: 10.2903/j.efsa.2021.6459.

Buesching, C.D. and Stankowich, T. 2017. Communication amongst the musteloids: signs, signals, and cues. In: Macdonald, D. W., Newman, C., and Harrington, L. A. eds. *Biology and Conservation of Musteloids*. First Edit. New York: Oxford University Press, pp. 149–166. doi: 10.1093/oso/9780198759805.003.005.

Davies, M.J. 2009. The chemical ecology of mustelids. In: Hardege, J. D. ed. *Chemical ecology: encyclopedia of life support systems*. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organisation. Eolss Publishers Co. Ltd, Oxford, pp. 438–449. doi: 10.1002/9780470034590.emrstm1341.

Díaz, A. V., Walker, M. and Webster, J.P. 2021. Surveillance and control of SARS-CoV-2 in mustelids: An evolutionary perspective. *Evolutionary Applications* 14(12), pp. 2715–2725. doi: 10.1111/eva.13310.

IUCN 2022. The IUCN Red List of Threatened Species. [Cited 15 Feb 2022] Available from URL: <http://www.iucnredlist.org>

Kean, E.F., Müller, C.T. and Chadwick, E.A. 2011. Otter scent signals age, sex, and reproductive status. *Chemical Senses* 36(6), pp. 555–564. doi:

10.1093/chemse/bjr025.

Koepfli, K., Dragoo, J.W. and Wang, X. 2017. The evolutionary history and molecular systematics of the Musteloidea. In: Macdonald, D. W., Newman, C., and Harrington, L. A. eds. *Biology and Conservation of Musteloids*. First Edit. New York: Oxford University Press, pp. 75–91. doi: 10.1093/oso/9780198759805.003.0002.

Latorre-Cardenas, M.C., Gutiérrez-Rodríguez, C., Rico, Y. and Martínez-Meyer, E. 2021. Do landscape and riverscape shape genetic patterns of the Neotropical otter, *Lontra longicaudis*, in eastern Mexico? *Landscape Ecology* 36(1), pp. 69–87. doi: 10.1007/s10980-020-01114-5.

Macdonald, D.W., Newman, C. and Harrington, L.A. eds. 2017. *Biology and conservation of musteloids*. First Edit. New York: Oxford University Press. doi: 10.1093/oso/9780198759805.003.001.

Massara, R.L., Paschoal, A.M.O., Bailey, L.L., Doherty, P.F. and Chiarello, A.G. 2016. Ecological interactions between ocelots and sympatric mesocarnivores in protected areas of the Atlantic Forest, southeastern Brazil. *Journal of Mammalogy* 97(6), pp. 1634–1644. doi: 10.1093/jmammal/gyw129.

Nagy-Reis, M. et al. 2020. Neotropical Carnivores: a data set on carnivore distribution in the Neotropics. *Ecology* 101(11), pp. 1–5. doi: 10.1002/ecy.3128.

- Noonan, M.J., Tinnesand, H. V., Müller, C.T., Rosell, F., Macdonald, D.W. and Buesching, C.D. 2019. Knowing Me, Knowing You: Anal Gland Secretion of European Badgers (*Meles meles*) Codes for Individuality, Sex and Social Group Membership. *Journal of Chemical Ecology* . doi: 10.1007/s10886-019-01113-0.
- Patterson, B.D., Ramírez-Chaves, H.E., Vilela, J.F., Soares, A.E.R. and Grewe, F. 2021. On the nomenclature of the American clade of weasels (Carnivora: Mustelidae). *Journal of Animal Diversity* 3(2), pp. 1–8. Available at: <http://jad.lu.ac.ir/article-1-132-en.html>.
- Reis, N.R., Peracchi, A.L., Pedro, W.A. and Lima, I.P. eds. 2006. *Mamíferos do Brasil*. Londrina.
- Rheingantz, M.L., Leuchtenberger, C., Zucco, C.A. and Fernandez, F. a. S. 2016. Differences in activity patterns of the Neotropical otter *Lontra longicaudis* between rivers of two Brazilian ecoregions. *Journal of Tropical Ecology* 32(May), pp. 170–174. Available at: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0266467416000079.
- Rheingantz, M.L., Waldemarin, H.F., Rodrigues, L. and Moulton, T.P. 2011. Seasonal and spatial differences in feeding habits of the Neotropical otter *Lontra longicaudis* (Carnivora : Mustelidae) in a coastal catchment of southeastern Brazil. 28(1), pp. 37–44. doi: 10.1590/S1984-46702011000100006.
- Trinca, C.S., Jaeger, C.F. and Eizirik, E. 2013. Molecular ecology of the Neotropical otter (*Lontra longicaudis*): non-invasive sampling yields insights into local population

dynamics. *Biological Journal of the Linnean Society* 109, pp. 932–948. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bij.12077/pdf>.

Villafañe-Trujillo, Á.J. et al. 2021. Activity patterns of tayra (*Eira barbara*) across their distribution. *Journal of Mammalogy* 102(3), pp. 772–788. doi: 10.1093/jmammal/gyaa159.

Wilson, D. and Mittermeier, A. eds. 2009. Carnivores. In: *Handbook of the mammals of the world*. Lynx Editions

Wright, P.G.R., Croose, E. and Macpherson, J.L. 2022. A global review of the conservation threats and status of mustelids. *Mammal Review* , pp. 1–15. doi: 10.1111/mam.12288.

Zapata, S.C., Travaini, A., Delibes, M. and Martínez-peck, R. 2005. Annual food habits of the lesser grison (*Galictis cuja*) at the southern limit of its range. *Mammalia* 69(1), pp. 85–88. doi: 10.1515/mamm.2005.008.

CAPÍTULO 2 – Os perfis químicos dos Mustelídeos Neotropicais

A comunicação é um fator fundamental nas interações sociais e tem sido definida como a transferência de sinais através de um canal entre emissor e receptor. Nos mustelídeos, devido aos seus sistemas olfativos desenvolvidos, a transmissão destes sinais ocorre principalmente através de sinais de cheiro (comunicação química) e sinais acústicos através de vocalizações. Em ambas as estratégias são de suma importância para o reconhecimento social e interações relacionadas a dinâmica territorial e o particionamento de recursos. Nesse capítulo, exploramos a diversidade química encontrada em amostras fecais dos mustelídeos neotropicais e o potencial de perfis químicos na discriminação das espécies. Além disso, verificamos se perfis químicos de lontra neotropical podem refletir as mudanças da paisagem e da qualidade da água causadas pela ação antrópica.

2.1. Neotropical mustelids: fecal metabolome diversity and its potential for taxonomic discrimination

Lana Resende de Almeida ^{1,2} *, Marina Amaral Alves ³, Ana Maria Obino Mastella ¹, Rafael Garrett ³, Maria João Ramos Pereira^{1,2}.

¹Bird and Mammal Evolution, Systematics and Ecology Lab, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

³Federal University of Rio de Janeiro, Chemistry Institute, Metabolomics Laboratory (LabMeta – LADETEC/IQ – UFRJ), Avenida Horácio Macedo, 1281 – Pólo de Química – Cidade Universitária, Ilha do Fundão, ZIP CODE: 21941-598, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

* **Corresponding author:** Lana Resende de Almeida - lanaresende.bio@gmail.com

Acknowledgments: We are grateful to the staff from all the zoos that collaborated with us, especially Igor Morais from Zoológico de Brasília and Vanessa Souza from Zoológico de Sapucaia do Sul. Our thanks go to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel.

Short title: Metabolomics of Neotropical Mustelids

Original published paper available in <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12645>.

Abstract

Chemical profiles of non-invasive biological material, such as feces, have great potential to study elusive animals or those with low population densities. Here, we use a metabolomic approach to evaluate Neotropical mustelids as a biological model to describe the diversity of the metabolites present in fecal samples, as well as to evaluate the potential of chemical profiles for taxonomic discrimination. We collected fecal samples from captive individuals of five species of mustelids occurring in Brazil and analyzed them by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS). Over 200 compounds have been annotated; “bile acids, alcohols and derivatives” was the most expressive class in the metabolome of all the species. We successfully discriminated three taxonomic groups: 1 – Tayra (*Eira barbara*); 2 – otters (*Lontra longicaudis* and *Pteronura brasiliensis*; 1); and 3 – grisons (*Galictis vittata* and *Galictis cuja*). Several compounds seemed to be associated with food intake and the digestive process, while others were found for the first time in Neotropical mustelids. We concluded that mustelids show high metabolome diversity and that species-specific identification through metabolomic profiles is possible, thus contributing to the development and implementation of additional non-invasive approaches in the study of mustelids.

Keywords: Chemical Profiles, Ecology, LC-HRMS, Metabolomics, Mustelidae.

Introduction

Chemical interactions between organisms are mediated by different organic molecules, such as signature mixtures, pheromones and allelochemicals (Burger 2005; Wyatt 2014). These signals act on a wide range of intra and interspecific interactions (Wyatt 2014; Birkemeyer *et al.* 2016), from individual recognition to territorial marking, assuring group cohesion for social species (Buesching *et al.* 2002; Osada *et al.* 2008; Banks *et al.* 2016; Birkemeyer *et al.* 2016), avoidance of potential agonistic encounters in solitary species (Hutchings & White 2000), as well as in signaling social and reproductive status in sexual interactions (Brennan & Kendrick 2006; Osada *et al.* 2008; Kean *et al.* 2011). Chemical signals are also relevant for resource use delimitation and in predator-prey relationships (Linklater *et al.* 2013; Banks *et al.* 2016; Coombes *et al.* 2018; Dzieciół *et al.* 2018; Parsons *et al.* 2018).

In mammals, chemical signals come mostly from secondary metabolites and, to a lesser extent, from primary metabolites; primary metabolites such as primary bile acids and bile alcohols from the cholesterol metabolism result from endogenous chemical synthesis (Hofmann *et al.* 2010). While secondary metabolites result from the four main biosynthetic pathways: i) the acetate pathway responsible to produce the fatty acids precursors; ii) the shikimate pathway responsible for the production of some aromatic hydrocarbons; iii) the amino acid pathway that biosynthesizes most nitrogenous heterocyclic compounds and; iv) the mevalonate pathway acting in the synthesis of isoprenoids (Charpentier *et al.* 2012). These pathways are sustained by metabolized nutrients, through chemical synthesis of ingested nutrients or through metabolic production from microorganisms as gut microbiome (Charpentier *et al.* 2012). These signals are often expressed in a mixture of volatile and non-volatile organic compounds

present in urine, feces, sweat, saliva, tears, genital secretions, milk, and even in the amniotic fluid (Alberts 1992; Drea *et al.* 2013; Hurst *et al.* 2018).

The detection of chemical compounds in fecal samples is a potentially effective and non-invasive method to investigate the presence of medium and large mammal species in natural environments, species identification (Araujo *et al.* 2010; Saraiva *et al.* 2014) and chemical communication between individuals (Weiß *et al.* 2017). These alternative tools are relevant because many medium to large-bodied mammals, particularly of the Carnivora, are often difficult to observe and capture in the wild. Non-invasive methods that do not involve the capture and management of individuals are especially interesting for investigating carnivorans because they correspond to almost 10% of the diversity of mammals threatened with extinction (IUCN 2021). Avoiding stress and even the loss of individuals is certainly relevant both for animal welfare, and for population equilibrium in the wild.

If carnivorans are often difficult to observe, their feces are frequently observed and abundant in the environment; acting as a communication pathway between conspecifics, contributing to the socio-spatial organization and, often, avoiding fatal agonistic interactions between individuals of highly territorial species (Tinnesand *et al.* 2015; Noonan *et al.* 2019). Indeed, the anal glands present in most species are responsible for secreting complex scent markings in fecal deposits (Noonan *et al.* 2019).

A significant chemical diversity of volatile compounds has already been identified in carnivore fecal samples; these include heterocyclic aromatic organic compounds, carboxylic acid, steroids and pheromones (Martín *et al.* 2010; Kean *et al.* 2011; Miyazaki *et al.* 2018). The diversity and specificity of those chemical profiles have allowed for interspecific, intersexual and individual discrimination in several taxa (Zhang *et al.* 2003;

Saraiva *et al.* 2014). However, is still unexplored the diversity, potential species discrimination and ecological functions of other metabolites in the Carnivora, particularly non-volatile compounds, which are more stable to environmental adversity (Alberts 1992). Previous works have shown that the chemical profile of bile acids (mostly presence/absence and concentration patterns) may allow taxonomic discrimination (Capurro *et al.* 1997; Guerrero *et al.* 2006; Khorozyan *et al.* 2007; Nasini *et al.* 2013). Thus, it is possible that other compounds with similar stability also allow accurate discrimination of taxa, populations and individuals.

The discovery of new compounds in the field of chemical ecology is closely related to the development of new approaches and techniques, particularly those that allow molecular separation and identification. Metabolomics, defined as the comprehensive analysis of metabolites in a biological system, is an emerging ecological approach. The potential to analyze hundreds of thousands of metabolites from almost any biological sample allows for the detailed characterization of metabolic phenotypes, eventually enabling for specific, population, sex and individual discrimination.

Metabolomic chemical profiles of fecal samples have already been used to discriminate the health status in control/treatment samples in humans, rats and mice, including gastrointestinal and liver condition (Cao *et al.* 2011), to determine ontogenetic chemical variations (Calvani *et al.* 2014), and to evaluate body responses to external stimuli, such as diet and exercise (Saric *et al.* 2008). As a highly sensitive and comprehensive approach, metabolomics shows great potential in revealing a wide diversity of compounds from other mammals, and eventually from other vertebrates, as well as in detecting subtle differences in chemical profiles. In this context, mass spectrometry has been the main technique used to characterize the metabolome. When coupled to chromatography, including liquid chromatography (LC) – mostly used for the

detection of non-volatile or less volatile compounds (NVOCs) - or gas chromatography (GC) – mostly used to detect volatile compounds (VOCs), the ability to detect metabolites at very low concentrations in complex samples is increased (Alves *et al.* 2021; Cesbron *et al.* 2017; Riekeberg & Powers 2017).

Within the Carnivora, the Mustelidae seem to be a good ecological model to investigate chemical profiles and the chemical diversity in fecal samples through the metabolomics approach; indeed, mustelids may be solitary or highly social, occupying diverse habitats and trophic levels (Davies 2009; Wilson & Mittermeier 2009; Macdonald *et al.* 2017). So, this ecological diversity is probably reflected at the level of the metabolome. Although the wide feeding habits of the Mustelid species seem to be an impasse for defining strictly endogenous chemical profiles, different food strategies may reveal unknown compounds in these organisms, as well as more information about the associated microbiota diversity.

Here, we use an untargeted metabolomics strategy: (i) to determine the chemical composition and diversity of compounds found in fecal samples of Neotropical Mustelidae (Carnivora, Mammalia) by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) and (ii) to investigate the potential of fecal chemical profiles for species discrimination.

Material and Methods

Species and collection sites

We selected five mustelids with Neotropical occurrence as target species: the Giant otter (*Pteronura brasiliensis* Zimmermann, 1780), the Neotropical otter (*Lontra longicaudis* Olfers 1818), the Tayra (*Eira barbara* Linnaeus, 1758) and two species of

grisons — the Lesser grison (*Galictis cuja* Molina, 1782) and the Greater grison (*Galictis vittata* Schreber, 1776).

The fecal samples were obtained from ten Brazilian zoos between April 2018 and January 2019: (i) Parque Ecológico de Americana, (ii) Parque Ecológico de São Carlos, (iii) Parque Zoobotânico Vale, (iv) Parque Zoológico de Sapucaia do Sul, (v) Zoológico de Brasília, (vi) Zoológico de Pomerode, (vii) Zoológico Municipal de Canoas, (viii) Zoológico Municipal de Curitiba, (ix) Zoológico Municipal de Uberaba, and (x) Zoológico da Universidade de Caxias do Sul (detailed information in Table S1, Supplementary Material 1). All samples were from healthy (non-diarrheal) adult individuals. All individuals were on a known diet: carnivorous diet (including fish) in Neotropical and Giant otters; mostly omnivorous diet in grisons (with meat in larger proportion than fruits); and omnivorous diet in Tayras (meat and fruits in the same proportion). Seventy-six fecal samples were obtained from forty-one individuals: one female Giant otter; 12 Neotropical otters (seven females and five males); 10 Tayras (four females and six males); 14 individuals of Lesser grisons (six females and eight males); and two Greater grisons (one female and one male). Two to three fecal samples were collected from each individual on different sampling days, except for the female Greater grison for which only one sample was obtained.

Sample collection and preparation

Fecal samples were collected by the respective staff at each zoo using disposable gloves, and then stored in 50 ml falcon tubes at 4°C, for no more than two weeks, until were sent to our lab. Upon arrival, to minimize any degradation of non-volatile compounds, samples were stored for no more than a week in the same conditions, prior to processing. Sample processing followed 4 to 5 cycles of the following major steps: 1)

four hours in an oven at 60°C; 2) one hour in the hood; 3) determination of the weight to the nearest 0.1 mg per cycle (Hinnant & Kothmann 1988; Mastella *et al.* 2021). We repeated all steps until the samples reached constant mass. We detected an average weight loss of 7g on the drying process of fecal samples. After drying the samples, they were milled with mortar and pestle and then sieved (diameter 180 mm; mesh size 0.09 mm) until we obtained a very thin and homogeneous powder.

Extraction procedure

For the extraction of fecal metabolites, 150 mg of each sample were added to a 2.0 mL microtube containing 1.485 µl of acetonitrile (ACN): water solution 1:1 (v/v) and 15 µl of internal standard (IS, Triamcinolone, final concentration of 0.05 µg·mL⁻¹). Samples were vortexed for 20 sec, sonicated at 35°C for 15 min, and centrifuged at 9,000 x g for 15 min. Then, 700 µl of the supernatant were transferred to new microtubes and incubated at -20°C during 15 min for protein precipitation followed by centrifugation at 9,000 x g for 15 min and transference of the supernatant to 2.0 mL LC vials for LC-HRMS analysis. A pooled quality control (QC) sample created by mixing an equal amount of each sample after the extraction procedure was prepared and analyzed periodically.

Liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry (LC-HRMS) analysis

Liquid chromatography (LC) analysis was performed on a Dionex UltiMate 3000 UHPLC system using a Thermo Synchronis RP C₁₈ column (50 × 2.1 mm; 1.7 µm particle size) at 350 µL min⁻¹ maintained at 40 °C. The mobile phase consisted of (A) 0.1% formic acid in H₂O:ACN (95:5, v/v) and (B) 0.1% formic acid in H₂O:ACN (5:95, v/v) in gradient elution mode (0–0.5 min 5% B; 0.5–4.0 min 60% B; 4.0–9.0 min, 100% B;

9.0–12.0 min 100% B; 12.0–12.1 min 5% B; 12.1–16.0 min 5% B). Injection volume was 2 μ L. The LC was coupled to a hybrid Quadrupole-Orbitrap high-resolution mass spectrometer (QExactive Plus, Thermo Scientific) equipped with an electrospray ion source (ESI) operating in negative ionization mode. Source ionization parameters were spray voltage -3.1 kV; capillary temperature 320°C; S-Lens RF level 60, sheath and auxiliary gases 45 and 15 (arbitrary units), respectively. Samples were analyzed in the scan range of m/z 120 to 1000 at a resolution of 70,000 followed by data-dependent MS/MS (ddMS2 Top8 experiments) using a resolution of 17,500 and normalized collision energy (NCE) stepped 15–50%. Sample processing occurred between May 2018 and February 2019.

Data processing, compound annotation and classification

LC-HRMS data processing, such as peak picking, deconvolution, alignment and MS/MS compound annotation were performed in MS-Dial software (RIKEN, version 3.98) (Tsugawa *et al.* 2015). The parameters used were MS1 and MS2 tolerances 0.005 and 0.05, respectively; minimum peak height of 500,000; mass slice width of 0.05 Da; linear-weighted moving average as the smoothing method using 3 scans and peak width of 5 scans; sigma window value for deconvolution of 0.4; 0.1 min and 0.005 Da tolerance for peak alignment. Compound annotation (Metabolomics Standards Initiative level 2) was performed comparing the aligned m/z ions with a mass error below 8 ppm and their MS/MS spectra with a similarity score \geq 80% to those available at the MassBank of North America (<http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>), NIST 2014 MS/MS library, and the Fecal Metabolome database (<http://www.fecalmetabolome.ca/>).

To prevent false positive/negative peak identification, data were manually inspected to verify spectral matches with the database. Annotations followed compounds

present in the database, but we could not discriminate most isomers, even using MS/MS data. The resulting annotated compound list was classified according to their chemical ontology (ChemOnt) and a Chemical Classification Dictionary using the chemical hierarchy classification system ClassyFire (<http://classyfire.wishartlab.com/>) (Djoumbou Feunang *et al.* 2016). This web platform allows chemical classification and description tools from known chemical compounds up to 11 distinct levels (Kingdom, SuperClass, Class, SubClass, etc.). Based on the characteristic common structural properties of the compounds, they were classified within categories and levels. Compounds that contributed less than 1% to the chemical composition of each species were grouped into the same category. ClassyFire requires Simplified Molecular - Input Line-Entry System (SMILES) as input, which can be obtained using the Chemical Translation Service (Wohlgemuth *et al.* 2010).

Statistical analysis

A peak alignment data table containing the retention time (t_R)- m/z variable vs. sample peak height normalized by the TIC (total ion current) was exported as .txt from the MS-Dial software, edited and converted to .csv, and submitted to multivariate analyses in the Unscrambler X software (Camo Analytics). Data were mean-centered and range scaled to reduce the differences between large and small peak values (Van den Berget *al.* 2006) and submitted to the unsupervised principal component analysis (PCA) to check for sample patterns without defining species a priori, to hierarchical cluster analysis (HCA) to verify the similarity of samples of the same species, and to the supervised partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) for sample classes discrimination. Internal validation was performed by leave-one-out cross-validation (LOOCV) to prevent overfitting and estimate the quality of the model. External validation was performed by building the PLS-DA model with 80% of the random samples in the dataset and by

predicting sample classes using the remaining 20% of the dataset. For PLS-DA analysis, QC samples were removed, as well as those of the Greater grison and the Giant otter due to the low number of replicates available ($n < 3$). To detect compounds with the highest discrimination power among the Lesser grison, the Neotropical otter and the Tayra we applied a similarity percentage (SIMPER) analysis, using the Bray-Curtis dissimilarity matrix, done in RStudio (Version 1.3.1093)

Results

Compound diversity in Mustelidae fecal samples

A total of 218 compounds were annotated in the mustelids fecal samples and classified among the 20 classes. The 19 main classes represented between 94 and 98% of each species chemical composition profiles (Figure 1). Supplementary Material 2 -DS1, shows the annotated compounds detailed list with their average retention times (t_R), m/z values, molecular formulas, experimental MS/MS spectrum, InChiKeys, SMILES, and Subclass data. Taxon profiles are clearly diverse (Figure 1), showing that “bile acids, alcohols and derivatives” was the most representative class in all profiles, followed by “amino acids, peptides and analogs” (between 5% and 12%). “Bile acids, alcohols and derivatives” represented 85% of the chemical profile of the Giant otter (GO, Figure 1), 53% of the Neotropical otter, 47% of the Greater grison, 76% of the Lesser grison, and finally 39% of the Tayra. “Fatty acids and conjugates” was more representative in the profiles of the Greater grison and the Tayra than in those of the other mustelids ($> 15\%$). Eicosands were not annotated in the profile of Lesser grison, while sulfated steroids were only present in the chemical profile of the Neotropical otter.

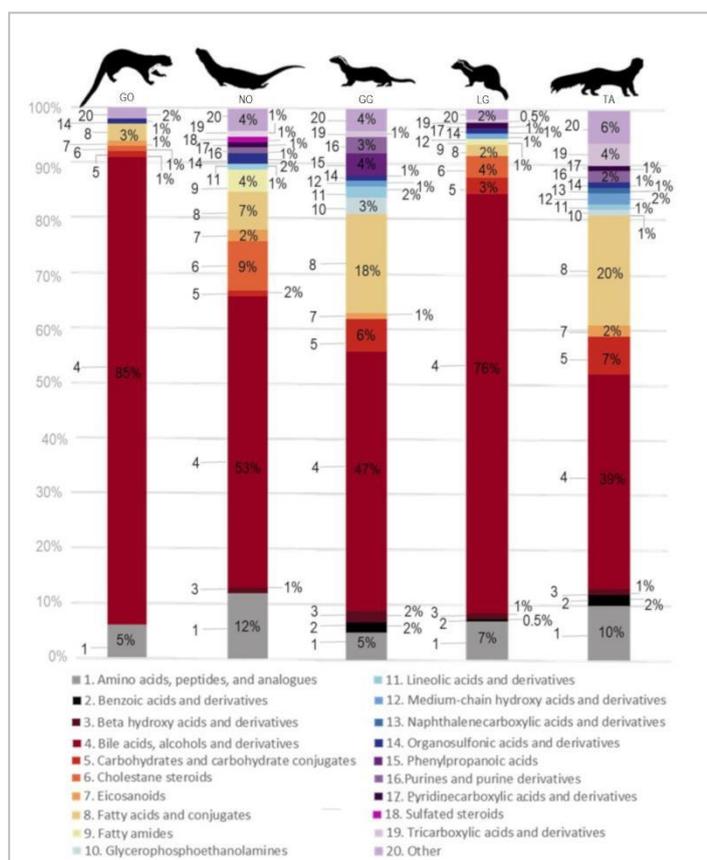


Figure 1 Chemical profiles of the most representative chemical classes of compounds found in the fecal samples of the five species of mustelids – Giant otter (GO), Neotropical otters (NO), Greater grisons (GG), Lesser grisons (LG) and Tayra (TA). The classes represented are equivalent to at least 94% of the profiles of each species.

Multivariate statistical analysis

A principal component analysis (PCA) on these data clearly showed three major clusters: 1– Tayra, 2– otters (Giant otter and Neotropical otter), and 3– grisons (Greater grison and Lesser grison) (Figure S1, Supplementary Material 1). The hierarchical cluster analysis (HCA) grouped all samples correctly into a priori recognized species. This result is in accordance with the PCA and consistent with the latest phylogenetic hypothesis for the Mustelidae (Koepfli *et al.* 2017). Chemical profiles of the Neotropical otter and the Giant otter, as well as of the Greater grison and the Lesser grison are more similar, while

the chemical profiles of otters and grisons shown more similarity with each other than with those of the Tayras (Figure S2, Supplementary Material 1).

Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) successfully discriminated the samples of Tayras, Neotropical otters and Lesser grisons (Figure 2). The pooled quality control samples were not used in this analysis since its function was to monitor the LC-HRMS stability and reproducibility. The Greater grison and Giant otter samples were not used as well due to the low number of replicates available to build the model. All samples were within the 95% Hotelling's T-squared ellipse; the root mean square errors of calibration (RMSEC) and cross-validation (RMSECV) corresponded to 0.15 and 0.28, respectively; R² for the calibration and internal validation were 0.975 and 0.924, respectively. In the external calibration group prediction, all samples were correctly assigned to the corresponding species.

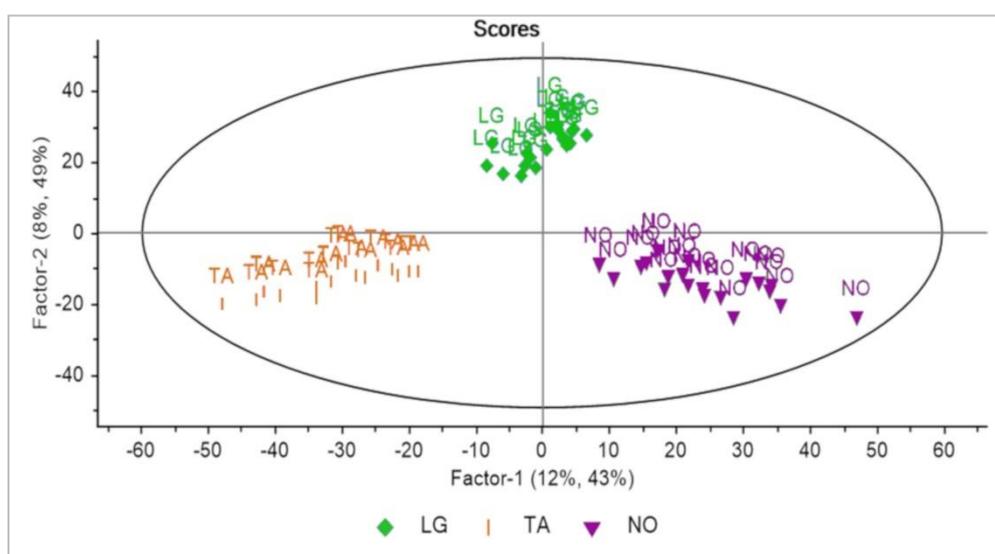


Figure 2 Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) of the chemical profiles from fecal samples of the analyzed mustelids. PLS-DA discriminated three groups corresponding to the three analyzed species: Tayras (TA), Lesser grison (LG), and

Neotropical otter (NO). TA – Tayra (orange lines); LG – Lesser grison (green lozenges); and NO – Neotropical otter (purple triangles).

According to SIMPER analysis, the compounds contributing the most for taxon discrimination were: chenodeoxycholic acid, cholic acid, cholesterol 3-sulfate, deoxycholic acid, isodeoxycholic acid, sulfocholic acid, taurocholic acid - all bile acids and, to a lesser extent, citric acid, *N*-stearoyltaurine, ricinoleic acid and (9Z)-12,13-Dihydroxyoctadec-9-enoic acid (12,13-DiHOME). Cumulatively, the top 10 of compounds contributed to 65% of the dissimilarity between the Lesser grison and the Neotropical otter; 65 % between the Lesser grison and the Tayra; and 56% between the Neotropical otter and the Tayra (Table 1).

Table 1 Similarity percentage (SIMPER) analysis revealed a top 10 of compounds in composition that contribute to dissimilarity among mustelids species (> 50% cumulative contribution). Details of all compound contributions at Supplementary Material 2- DS2.

Pairwise						
	Lesser grison – Tayra	Lesser grison - Neotropical otter	Neotropical otter – Tayra			
Compounds	Average dissimilarity / Contribution (%)					
12,13-DiHOME	1.34/1.96	-	1.49/2.22			
Chenodeoxycholic acid	3.09/4.52	2.89/4.55	4.39/6.56			
Cholesterol 3-sulfate	2.12/3.10	3.35/5.26	3.66/5.47			
Cholic acid	1.85/2.70	1.82/2.86	1.97/2.94			
Citric acid	3.39/4.96	0.81/1.28	3.67/5.48			
Deoxycholic acid	3.08/4.50	2.91/4.58	4.40/6.56			
Isodeoxycholic acid	1.17/1.71	1.08/1.71	1.73/2.58			

N-Stearoyltaurine	-	1.07/1.69	1.32/1.97
Ricinoleic acid	2.77/4.04	1.36/2.14	3.31/4.95
Sulfocholic acid	6.23/9.10	5.87/9.23	-
Taurocholic acid	19.6/28.6	20.23/31.81	11.79/17.59
Cumulative contribution (%)	65.24	65.09	56.31

Taurocholic acid was the most relevant compound in all paired discriminations of chemical profiles, contributing alone with 29% of the dissimilarity between the Lesser grison and the Tayra, 32% between the Lesser grison and the Neotropical otter, and 18% between the Neotropical otter and the Tayra. Chenodeoxycholic acid was relevant in distinguishing the Neotropical otter from that of the Tayra and of the Lesser grison (6% and 5%, respectively). Deoxycholic acid contributed with 7% towards the dissimilarity between the Lesser grison and the Neotropical otter, and with 5% in distinguishing the Neotropical otter from the Tayra.

Sulfocholic acid contributed with 9% to the chemical dissimilarity between the Lesser grison, the Neotropical otter and Tayra, but did not contribute significantly towards distinguishing the two latter taxa. All the remaining compounds contributed with 5% or less towards the dissimilarity between species pairs. However, 12,13-DiHOME, an endogenous fatty acid, contributed 2% towards the dissimilarity between Tayras and two other species.

Discussion

The untargeted metabolomic strategy allowed a comprehensive characterization of the fecal metabolite profiles of the Neotropical Mustelidae. Also, this approach seems to have good potential for taxonomic discrimination, at least at the genus level in free-

ranging mustelids, although all specimens used in our analyses were captive animals and the identification corresponding to each fecal sample was known a priori.

The investigation of chemical profiles for the mustelid fecal samples revealed compounds reported for the first time in this mammalian group. Mono and polyunsaturated fatty acids (except trans monounsaturated) such as oleic acid and eicosanoic acid, as well as steroids such as cholesterol, seem to be a good starting point for deepening the knowledge in the identification of endogenous compounds in the metabolomic profiles of mustelids, mainly for its possible mammalian origin (Charpentier *et al.* 2012); so, their presence in the chemical profiles of the analyzed specimens may have resulted from their diet (mice and cattle meat) or from endogenous metabolic activity. By controlling what is given as food to specimens in captivity, there may be a possibility, in the near future, to discriminate species-specific fatty acids and steroids that will support the taxonomic discrimination of fecal samples collected in the wild.

From a molecular point of view, all Metazoa are superorganisms due to the intrinsic and diverse metabolic interactions with their microbiota (Goodacre 2007). Thus, even if we were unable to perform an in-depth approach to the mustelid microbiota, we believe for some of the compounds found, as phytochemicals and eicosapentaenoic acids, to be derived from the metabolization of the diet by this microbiota, potentially revealing an influence of the diet on the metabolome. However, we emphasize that dietary variations and their metabolic responses in mustelids should not reduce the potential for taxonomic discrimination by the approach we propose here.

Indeed, data collection was designed to detect these variations, including individuals of different origin, sex, age, and under reasonably distinct dietary regimes. Overall, despite these distinct origins, different ordination analyses were congruent and

able to distinguish different taxonomic entities. Nevertheless, the biomolecular organization of organisms, the regulation of gene expression and metabolite diversity and abundance are all influenced by the environment and the ecological interactions in which organisms are (Nicholson *et al.* 2007). So, future approaches should also consider these potential confounding factors.

PCA and PLS-DA analyses showed that metabolite profiles of non-invasive fecal samples allow for consistent discrimination at least between Tayras, grisons and otters. Although the discrimination between the species of grisons (Lesser and Greater) and between the species of otters (Neotropical and Giant) was not attained, this may have resulted from the small sample size for some of these species in our study (Kapoore & Vaidyanathan 2016; *et al.* 2017). A larger number of replicates to ensure more power in the statistical analyses is certainly necessary. Still, chemically those species may be truly difficult to distinguish, as they are sister species, adapted to similar habitats and diets.

Bile acids expressively compose the five species chemical composition. Taurocholic acid intensities clearly discriminate Lesser grison, Neotropical otter and Tayras species, while the intensity of sulfocholic acid also discriminate Lesser grison and the other two taxa. However, not all bile acids could discriminate all species. For instance, dehydrocholic acid, previously described in Lesser grisons (Guerrero *et al.* 2006), seems to occur in similar abundance in all analyzed species.

In fact, several of the bile acids found are shared with other mammals, including cholic acid, found in canids, felids, and procyonids (Guerrero *et al.* 2006; Cazón *et al.* 2009; Salame-Méndez *et al.* 2012; Mastella *et al.* 2021); glycocholic acid, found in pumas and jaguars (Cazón *et al.* 2009; Salame-Méndez *et al.* 2012; Nasini *et al.* 2013); and taurocholic acid, found in anteaters and armadillos (Araujo *et al.* 2010). So, multi-taxon

studies are necessary to stipulate peak intensity patterns for terrestrial mammals, to understand which bile acids have discriminatory power and at which taxonomic level. Taxonomic discrimination is mostly based on primary bile acids derived from cholic acid, but - additionally and still undescribed- secondary bile acids may also be relevant towards species discrimination. Still, several studies have successfully used qualitative analyzes (presence/absence) in bile acids for taxonomic discrimination (Guerrero *et al.* 2006; Araujo *et al.* 2010; Nasini *et al.* 2013).

However, as the analysis of the diversity of compounds revealed a similar chemical composition among closely related taxonomic entities, we opted for semi- quantitative analysis to search for subtle discrepancies in the chemical profiles of those taxa. In addition, taxonomic discrimination based solely on strict quantitative analysis of bile acids is still controversial, as quantities may change with age, changes in diet, etc (Saric *et al.* 2008; Matysik *et al.* 2016). It is unknown whether these variations can alter the bile acids composition and abundance in organisms throughout their lives. So, more comprehensive chemical profiles, such as the metabolome, may be more accurate for taxonomic discrimination from non-invasive biological samples.

In addition, other compounds from possible mammalian origin seem to be relevant to discrimination between species of the Mustelidae. 12,13-DiHOME – useful in discriminating the Tayra from the other taxa - is an endogenously synthesized linoleic acid derivative associated with the thermogenic pathway in adipose tissue (Lynes *et al.* 2019). Although changes in the concentrations of 12,13-DiHOME have been found in hibernating mammals from the temperate region (Lynes *et al.* 2019), its ecological function is not clear in Neotropical mustelids. Its clear detection in the Tayra may reflect a strong phylogenetic signal, as tayras derive from an independent colonization of the Neotropics by a Neartic ancestor of the marten mustelid lineage (Eizirik 2012), and are

thus more closely related to temperate mustelids, including martens (*Martes* sp.) and the Wolverine (*Gulo gulo*) (Koepfli *et al.* 2017).

Furthermore, chemical compounds associated with *N*-acyl amines, of the same subclass of the *N*-stearoyltaurine, relevant in discriminating the Neotropical otter, were found in placental tissues of humans and other primates, suggesting a true mammalian origin (Elshenawy *et al.* 2020). As the sampled individuals were not fed with mammals, this may indeed result from endogenous production, and seems to be relevant for chemically discriminating the Neotropical otter.

Although this represents the first study using captivity specimens maintained in somewhat controlled conditions, we have assumed that feces exposed to environmental or stored in local conditions would retain most of the chemical compounds, even though, obviously, fresh samples are more ideal in molecular analysis. Even so, chemical profiles of non-volatile compounds seem to be more stable and advantageous when sample storage is adverse, which is the case of field research. It is possible that, with adjustments, the proposed method can contribute to research using old or slightly degraded samples under unpredictable environmental conditions.

Overall, our results show consistent chemical discrimination between fecal samples of terrestrial mustelids – the Tayra and the two species of grisons. The results from the PCA and the HCA also suggest potential discrimination between the semi-aquatic mustelids, but the single sample of the Giant otter does not allow further speculation. Indeed, we recognize our limited sample, particularly that of the Giant otter, but we still find our results valid, as they represent the first description of its chemical diversity and of the potential candidates for discriminating this species from other mustelids, which may help design future studies.

Fecal samples seem, thus, to be an adequate source for chemical profile studies; indeed, samples from different specimens of the same species were, overall, correctly grouped, even though they were obtained at different times and collection sites. This is extremely relevant and useful for future ecological studies because these species' pairs are sympatric in wide areas of their distribution, also spatially overlapping for fecal deposition (and with other Carnivora for that matter), presenting morphologically similar feces, often difficult to discriminate in the field (Chame 2003; Cazón *et al.* 2009).

The unambiguous identification of mustelids solely using morphological analysis of fecal samples is quite difficult, or even impossible task. To verify that, despite those morphological similarities, the metabolomes of non-invasive fecal samples may be distinct enough to discriminate mammalian taxa is excellent news, especially for answering biological questions about endangered species that are elusive, rare or difficult to detect or capture, as is the case of many mammals (Long *et al.* 2012). Metabolomic analysis may surpass DNA-based approaches, especially those obtained from fecal samples, once DNA extraction of those may be difficult, time-consuming and costly.

The knowledge generated by describing the diversity of the metabolome present in the fecal samples of these mustelids may contribute towards a better understanding of their chemical communication, and how they interact in their native habitats. Metabolomic approaches should thus be increasingly incorporated by animal ecologists in their research. Increasing sample size and taxonomic coverage is certainly important, but the simplicity, swiftness, and sensitivity of the metabolomics approach (laboratory and analytical) reinforce its potential applicability and replication in future studies with mustelids, carnivores and, eventually, all mammalian taxa.

References

- Alberts AC (1992). Constraints on the design of chemical communication systems in terrestrial vertebrates. *American Naturalist*, 139. <https://doi.org/10.1086/285305>
- Alves MA, Silva ACRD, Torres CL et al. (2021). A Systematic Pipeline to Enhance the Fecal Metabolome Coverage by LC-HRMS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 32, 1435-1446. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20210042>
- Araujo MS, Ciuccio M, Cazón AV, Casanave, EB (2010). Diferenciación de especies de *Xenarthra* (Mammalia) a través de la identificación de sus patrones de ácidos biliares fecales: Una herramienta ecológica. *Revista Chilena de Historia Natural*, 83, 557–566. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2010000400009>
- Banks PB, Daly A, Bytheway JP (2016). Predator odours attract other predators, creating an olfactory web of information. *Biology Letters*, 12, 1–4. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.1053>
- Birkemeyer CS, Thomsen R., Jänig S, Kücklich M, Slama A, Weiß BM, Widdig A (2016). Sampling the body odor of primates: Cotton swabs sample semivolatiles rather than volatiles. *Chemical Senses*, 41, 525–535. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjw056>
- Brennan PA, Kendrick K.M. (2006). Mammalian social odours: Attraction and individual recognition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361, 2061–2078. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1931>
- Buesching CD, Waterhouse JS, Macdonald DW (2002). Gas-chromatographic analyses of the subcaudal gland secretion of the European badger (*Meles meles*). Part II:

- Time-related variation in the individual specific composition. *Journal of Chemical Ecology*, 28, 57–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1013558718057>
- Burger BV (2005). Mammalian Semiochemicals. *Topics in Current Chemistry*, 240, 231–278. <https://doi.org/10.1007/b98318>
- Calvani R, Brasili E, Praticò G et al. (2014). Fecal and urinary NMR-based metabolomics unveil an aging signature in mice. *Experimental Gerontology*, 49, 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.10.010>
- Cao H, Huang H, Xu W et al. (2011). Fecal metabolome profiling of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma patients by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 691, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.038>
- Capurro AF, Novaro AJ, Travaini A, Romero MS (1997). Improved Bile-Acid Thin-Layer Chromatography to Identify Feces of Neotropical Carnivores. *The Journal of Wildlife Management*, 61, 1424. <https://doi.org/10.2307/3802146>
- Cazón A, Juárez V, Monjeau JA, Lilienfeld M (2009). Discriminación de heces de puma (*Puma concolor*) y jaguar (*Panthera onca*) por identificación de sus ácidos biliares: una técnica para el monitoreo de carnívoros silvestres. *Mastozoología Neotropical*, 16, 449–453
- Cesbron N, Royer AL, Guitton Y, Sydor A, Le Bizec B, Dervilly-Pinel G (2017). Optimization of fecal sample preparation for untargeted LC-HRMS based metabolomics. *Metabolomics*, 13, 1–6. [https://doi.org/10.1007/s11306-017-1233-](https://doi.org/10.1007/s11306-017-1233-8)

- Chame M (2003). Terrestrial Mammal Feces: a Morphometric Summary and Description. *Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 71–94.
- Charpentier MJE, Barthes N, Proffit M, Bessièrè JM, Grison C (2012). Critical thinking in the chemical ecology of mammalian communication: Roadmap for future studies. *Functional Ecology*, 26, 769–774. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.01998.x>
- Coombes HA, Stockley P, Hurst JL (2018). Female Chemical Signalling Underlying Reproduction in Mammals. *Journal of Chemical Ecology*, 44, 851–873. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0981-x>
- Davies MJ (2009). The Chemical Ecology of Mustelids. In: Hardege JD, ed. *Chemical ecology: encyclopedia of life support systems*. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organisation. Eolss Publishers Co. Ltd, Oxford: pp. 438–449.
- Djombou Feunang Y, Eisner R, Knox C et al. (2016). ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. *Journal of Cheminformatics*, 8, 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0174-y>
- Drea CM, Boulet M, Delbarco-Trillo J et al. (2013). The ‘secret’ in secretions: Methodological considerations in deciphering primate olfactory communication. *American Journal of Primatology*, 75, 621–642. <https://doi.org/10.1002/ajp.22143>
- Dzięcioł M, Woszczyło M, Szumny A et al. (2018). Identification of putative volatile sex pheromones in female domestic dogs (*Canis familiaris*). *Animal Reproduction Science*, 197, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.016>

- Eizirik E (2012). A molecular view on the evolutionary history and biogeography of Neotropical carnivores (Mammalia, Carnivora). In: Patterson BD, Costa LP eds. *Bones, Clones, and Biomes: The History and Geography of Recent Neotropical Mammals*. University of Chicago Press. pp. 123–142.
- Elshenawy S, Pinney SE, Stuart T et al. (2020). The metabolomic signature of the placenta in spontaneous preterm birth. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms21031043>
- Goodacre R (2007). Metabolomics of a Superorganism. *The Journal of Nutrition*, 137, 259S-266S. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jn/137.1.259S>
- Guerrero C, Espinoza L, Niemeyer HM, Simonetti JA (2006). Using fecal profiles of bile acids to assess habitat use by threatened carnivores in the Maulino Forest of Central Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 79, 89–95. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2006000100008>
- Hinnant RT, Kothmann MM (1988). Collecting, Drying, and Preserving Feces for Chemical and Microhistological Analysis. *Journal of Range Management*, 41, 168. <https://doi.org/10.2307/3898957>
- Hofmann AF, Hagey LR, Krasowski MD (2010). Bile salts of Vertebrates: structural variation and possible evolutionary significance. *Journal of Lipid Research*, 51, 226–246. <https://doi.org/10.1194/jlr.R000042>
- Hurst JL, Payne CE, Nevison CE et al. (2018). The importance of chemical communication studies to mammalian conservation biology: A review. *Journal of Chemical Ecology*, 28, 231–278. <https://doi.org/10.1179/isr.1986.11.2.153>

Hutchings MR, White PCL (2000). Mustelid scent-marking in managed ecosystems: Implications for population management. *Mammal Review*, 30, 157–169. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2907.2000.00065.x>

IUCN 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. [Cited 15 Feb 2021] Available from URL: <http://www.iucnredlist.org>

Kapoor RV, Vaidyanathan S (2016). Towards quantitative mass spectrometry-based metabolomics in microbial and mammalian systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0363>

Kean EF, Müller CT, Chadwick EA (2011). Otter scent signals age, sex, and reproductive status. *Chemical Senses*, 36, 555–564. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjr025>

Khorozyan IG, Cazon A, Malkhasyan AG, Abramov AV (2007). Using thin-layer chromatography of fecal bile acids to study the leopard (*Panthera pardus ciscaucasica*) population. *Biology Bulletin*, 34, 361–366. <https://doi.org/10.1134/S1062359007040085>

Koepfli K, Dragoo JW, Wang X (2017). The evolutionary history and molecular systematics of the Musteloidea. In: Macdonald DW, Newman C, Harrington LA eds. *Biology and Conservation of Musteloids*. First Edit New York, Oxford University Press, pp. 75–91.

Linklater WL, Mayer K, Swaisgood RR (2013). Chemical signals of age, sex and identity in black rhinoceros. *Animal Behaviour*, 85, 671–677. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.12.034>

- Long RA, MacKay P, Ray J, Zielinski W (2012). Noninvasive survey methods for carnivores. 1st edn. Island Press.
- Macdonald DW, Newman C, Harrington LA (2017). Biology and conservation of musteloids. First Edit New York, Oxford University Press.
- Martín J, Barja I, López P (2010). Chemical scent constituents in feces of wild Iberian wolves (*Canis lupus signatus*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 38, 1096–1102. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.10.014>
- Mastella, AMO, Rodrigues CE, Kist TBL, Pereira MJR (2021). Take a good catch at the scat: carboxylic and sulfonic acid profiles as a non-invasive tool for species identification and sex determination in neotropical carnivores. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. <https://doi.org/10.1080/01650521.2021.1994786>
- Matysik S, Le Roy CI, Liebisch G, Claus SP (2016). Metabolomics of fecal samples: A practical consideration. *Trends in Food Science and Technology*, 57, 244–255. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.05.011>
- Miyazaki M, Miyazaki T, Nishimura T, Hojo W, Yamashita T (2018). The Chemical Basis of Species, Sex, and Individual Recognition Using Feces in the Domestic Cat. *Journal of Chemical Ecology*, 44, 364–373. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0951-3>
- Nasini UB, Peddi N, Ramidi P, Gartia Y, Ghosh A, Shaikh AU (2013). Determination of bile acid profiles in scat samples of wild animals by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Analytical Methods*, 5, 6319–6324. <https://doi.org/10.1039/c3ay41048j>

- Nicholson JK, Holmes E, Lindon JC (2007). *Metabonomics and Metabolomics Techniques and Their Applications in Mammalian Systems. The handbook of metabonomics and metabolomics.* s.l.: s.e.: pp. 1–34.
- Noonan MJ, Tinnesand HV, Müller CT, Rosell F, Macdonald DW, Buesching CD (2019). Knowing Me, Knowing You: Anal Gland secretion of European Badgers (*Meles meles*) codes for individuality, sex and social group membership. *Journal of Chemical Ecology*, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10886-019-01113-0>
- Osada K, Tashiro T, Mori K, Izumi H (2008). The identification of attractive volatiles in aged male mouse urine. *Chemical Senses*, 33, 815–823. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjn045>
- Parsons MH, Apfelbach R, Banks PB et al. (2018). Biologically meaningful scents: a framework for understanding predator–prey research across disciplines. *Biological Reviews*, 93, 98–114. <https://doi.org/10.1111/brv.12334>
- Riekeberg E, Powers R (2017). New frontiers in metabolomics: from measurement to insight. *F1000Research*, 6, 1148. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11495.1>
- RStudio (2020). *RStudio: Integrated Development Environment for R.* RStudio, Version 1.3.1093, PBC, Boston, MA. [Cited 15 Feb 2021] Available from URL: <http://www.rstudio.com/>
- Salame-Méndez A, Andrade-Herrera M, Zamora-Torres L et al. (2012). Método optimizado para evaluar ácidos biliares de muestras fecales secas o preservadas en etanol como herramienta para identificar carnívoros silvestres. *Acta Zoológica Mexicana (N.S.)*, 28, 305–320. <https://doi.org/10.21829/azm.2012.282835>

- Saraiva MJ, Salvador ÂC, Fernandes T et al. (2014). Three mammal species distinction through the analysis of scats chemical composition provided by comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Biochemical Systematics and Ecology*, 55, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.02.025>
- Saric J, Wang Y, Li J et al. (2008). Species variation in the fecal metabolome gives insight into differential gastrointestinal function. *Journal of Proteome Research*, 7, 352–360. <https://doi.org/10.1021/pr070340k>
- Tinnesand HV, Buesching CD, Noonan MJ et al. (2015). Will trespassers be prosecuted or assessed according to their merits? A consilient interpretation of territoriality in a group-living carnivore, the European badger (*Meles meles*). *PLoS ONE*, 10, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132432>
- Tsugawa H, Cajka T, Kind T et al. (2015). MS-DIAL: Data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature Methods*, 12, 523–526. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3393>
- Weiß BM, Marcillo A, Manser M, Holland R, Birkemeyer C, Widdig A (2017). A non-invasive method for sampling the body odour of mammals. *Methods in Ecology and Evolution*, 9, 420–429. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12888>
- Wilson D, Mittermeier A (2009). *Carnivores. Handbook of the mammals of the world.* Lynx Editions.
- Wohlgemuth G, Haldiya PK, Willighagen E, Kind T, Fiehn O (2010). The chemical translation service—a web-based tool to improve standardization of metabolomic reports. *Bioinformatics*, 26, 2647–2648. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq476>

Wyatt TD (2014). Pheromones and animal behavior: Chemical signals and signatures, second edition. Second Edi New York: Cambridge University Press.

Van den Berg RA, Hoefsloot HCJ, Westerhuis JA, Smilde AK, Van der Werf MJ (2006). Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*, 7, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-142>.

Zhang JX, Zhang ZB, Wang ZW, Ni J, Ren XJ, Sun L (2003). Possible coding for recognition of sexes, individuals and species in anal gland volatiles of *Mustela eversmanni* and *Mustela sibirica*. *Chemical Senses*, 28, 381–388.

2.2. Do fecal bile acid analyses allow taxonomic discrimination between Neotropical mustelids?

Lana Resende de Almeida ^{1,2*}, Ana Maria Obino Mastella ¹, Marina Amaral Alves ^{3,4}, Rafael Garrett ³, Maria João Ramos Pereira ^{1,2}.

¹Bird and Mammal Evolution, Systematics and Ecology Lab, Programa de Pós- Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Universidade Federal do Rio de Janeiro, Metabolomics Laboratory (LabMeta – LADETEC/IQ – UFRJ), Chemistry Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁴Universidade Federal do Rio de Janeiro, Walter Mors Institute of Research on Natural Products, 21941-599, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

*Corresponding author: Lana Resende de Almeida - lanaresende.bio@gmail.com

Short title: Bile acids of neotropical mustelids.

Abstract

Studies showing the use of fecal samples analysis to differentiate species are becoming more frequent in recent years. Here, we performed a semi-quantitative fecal bile acid analysis from five neotropical mustelids to access bile acids diversity and evaluating their taxonomic discriminatory potential. Were collected 75 fecal samples from captive specimens and analyzed through liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). We found significant differences between the analyzed species in five fecal bile acids, supporting our method as a promising and powerful tool for taxonomic discrimination among mammals. Bile acids are majority endogenous compound fundamental to maintenance of life. So, the monitoring of them can be useful to detect response of mustelids to environmental changes, their monitoring and conservation.

Keywords: chemical profiles, Mustelidae, taxonomy, fecal bile acids.

2.3. Landscape marks on the chemical profiles of the Neotropical otter

Lana Resende de Almeida ^{1,2}, Marina Amaral Alves ^{3,4}, Ana Maria Obino Mastella ¹, Rafael Garrett ³, Maria João Ramos Pereira^{1,2}.

¹Bird and Mammal Evolution, Systematics and Ecology Lab, Programa de Pós- Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

³Federal University of Rio de Janeiro, Chemistry Institute, Metabolomics Laboratory (LabMeta – LADETEC/IQ – UFRJ), Avenida Horácio Macedo, 1281 – Pólo de Química – Cidade Universitária, Ilha do Fundão, ZIP CODE: 21941-598, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁴Universidade Federal do Rio de Janeiro, Walter Mors Institute of Research on Natural Products, 21941-599, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

***Corresponding author:** Lana Resende de Almeida – lanaresende.bio@gmail.com

To be submitted to Environmental Research.

Abstract

Anthropogenic effects in the landscape have been caused by habitats fragmentation and chemical pollution of watercourses, affecting the aquatic and semiaquatic species, such as river otters. Here, we investigated how the land use and water quality – a proxy for environmental preservation across landscapes at Atlantic Forest, are reflected in fecal chemical profiles of the Neotropical otter. We found that the chemical profiles from the most preserved regions differ from anthropized regions, revealing a great/strong correspondence between the chemical composition of Neotropical otter's profiles and environmental conditions. Chemical compounds associated with microbiota and urine of otters were found, while we also detected an industrial contaminant considered a warning substance. In addition, compounds of interest are provided for future identifications, aiming to be useful for monitoring of the Neotropical otter – from its physiology to its conservation, as well as for monitoring freshwater ecosystems. Lastly, our results reinforce the Neotropical otter as a potential sentinel species in Neotropical freshwater ecosystems.

Keywords: Neotropical otter, chemical pollution, land use, conservation.

CAPÍTULO 3 – Ecologia de populações e desafios de monitoramento

A análise de padrões espaciotemporais tem sido importante para revelar como distúrbios antrópicos estão afetando a conservação e a viabilidade populacional de mamíferos em todo o mundo. Neste capítulo avaliamos como aspectos da paisagem afetam a ocupação e a detecção de furões pequenos e iraras no limite sul da Mata Atlântica. Ainda, investigamos se distúrbios antrópicos estão conduzindo a alterações nos padrões de atividade das populações.

3.1. Do modified landscapes affect spatiotemporal patterns of tayras and lesser grisons?

Lana Resende de Almeida^{1,2}, Guilherme Oyarzabal da Silva², Carlos Fonseca³ & Maria João Ramos Pereira^{1,2,3}

¹Bird and Mammal Evolution, Systematics and Ecology Lab, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

³ Center for Environmental and Marine Studies, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, PT-3810-193 Aveiro, Portugal.

Shot title: Spatial-temporal patterns of Neotropical mustelids.

***Corresponding author:** Lana Resende de Almeida – lanaresende.bio@gmail.com

Future submission to Mastozoologia Neotropical.

Abstract

The study of spatiotemporal patterns is useful to reveal the role of anthropogenic effects on the management and conservation of mammals throughout the world. Here, we investigate how land use variables and human density affects the spatiotemporal patterns of two terrestrial mustelids – *Eira barbara* and *Galictis cuja* in the southern limit of the Atlantic Forest. Camera trapping were installed among mosaic of the landscapes that represents a gradient of environmental preservation. Changes in the landscape did not seem to lead to changes in the probability of occupancy patterns by the two species. Diurnal activity patterns were predominant in the two species, though in landscapes with higher human density there was an increase of activities at crepuscular period for tayras, as well as tendency to concentrate the activity within short periods for both species. However, the environmental plasticity found for neotropical mustelids found must be viewed with reservations due tayras and lesser grisons populations be in imminent decline through their distributions.

Keywords: Conservation, ecology, Mustelidae, occupancy.

Resumo

O estudo de padrões espaciotemporais tem revelado o papel dos efeitos antrópicos no manejo e conservação de mamíferos em todo o mundo. Aqui, investigamos padrões espaciotemporais duas espécies de mustelídeos neotropicais – *Eira barbara* e *Galictis cuja*. Armadilhas fotográficas foram instaladas em diferentes paisagens no limite sul da Mata Atlântica. Incluímos variáveis de uso do solo e de sub-bosque como preditoras em nossos modelos de ocupação. Além disso, descrevemos e comparamos os padrões de atividade das espécies nesses diferentes contextos ambientais. No geral, mudanças na paisagem não parecem ter efeito na probabilidade de ocupação das duas espécies. Os padrões de atividade diurna foram predominantes nas duas espécies, porém em paisagens com maior densidade humana houve aumento das atividades no período crepuscular em iraras, bem como tendência de concentração da atividade em períodos curtos para ambas. A plasticidade ambiental encontrada para os mustelídeos Neotropicais analisadas deve ser vista com ressalvas, visto que ainda são espécie pouco conhecidas ecologicamente, suas populações de estão em declínio iminente através de suas distribuições e ainda, a degradação ambiental desenfreada pode, em breve, extrapolar a capacidade de resiliência das espécies.

Palavras-chave: ecologia, Mustelidae, Neotrópicos, conservação.

CAPÍTULO 4 - Caminhos da popularização da Ciência para a Conservação

A Divulgação Científica, também chamada de Popularização da Ciência, busca a difusão do conhecimento científico para o público em geral de maneira acessível, buscando mostrar o que se produz no dia a dia dos Laboratórios de Pesquisa. Neste capítulo, relatamos duas iniciativas adotadas neste projeto para divulgação acessível de nossos resultados e que fomente a inclusão das espécies foco em tomadas de decisão futuras.

4.1. Clube da Lontra – Divulgação Científica

O Clube da Lontra – Divulgação Científica é inspirado em duas frases norteadoras, a primeira é “Conservação envolve as pessoas” e a segunda é “Toda criança nasce cientista”. Esse projeto de divulgação teve sua ideia inicial em 2018, durante uma viagem de avião.

A estrutura inicial do Clube da Lontra envolvia duas metodologias de sensibilização marcantes: a exposição sensorial e a dinâmica do “faça você mesmo”. Assim, o Clube abrangeria uma exposição dinâmica e itinerante à todas as Unidades de Conservação e municípios do Estado do Rio Grande do Sul em que estivemos durante nossas campanhas de campo. E mais especificamente, realizaria oficinas de produção de histórias em quadrinhos junto ao público infanto-juvenil de escolas públicas locais.

Com objetivo fundamental reportar os avanços da pesquisa científica, bem como informar e sensibilizar sobre a biologia e conservação dos mustelídeos e a importância da preservação ambiental. O Clube da Lontra também seria palco para outras questões transversais que envolve o imaginário do ser cientista para crianças, como a representatividade de mulheres em trabalhos de campo e monitoramento de animais selvagens. Visto que esta pesquisa foi majoritariamente apoiada por cientistas mulheres, para além da sua coordenação e de sua supervisão.

Infelizmente, com a chegada da pandemia do COVID-19 e ineficiência das autoridades brasileiras em amenizar os danos causados à nossa população, as atividades presenciais deste projeto foram adiadas por tempo indeterminado e impossibilitadas dentro do prazo previsto para conclusão do curso. Alternativamente, o Clube da Lontra transformou-se em uma página de Divulgação Científica nas principais redes sociais e atualmente abrangemos cerca de 500 seguidores entre Facebook, Instagram e Twitter.

Apesar da abrangência ainda tímida e frequência de publicações atreladas às demandas de execução de outras frentes de trabalho do presente projeto de Doutorado, o Clube da Lontra tem sido procurado por cientistas e não-cientistas, bem como tem se tornado ponte entre este e outros projetos que visam a investigação e a conservação de Mustelídeos Neotropicais.

A experiência de transpor conhecimentos técnico-científicos de forma informativa, lúdica e criativa deste projeto em simultâneo a onda de negacionismo científico contemporânea é provocativa quanto às facetas da atuação de uma pessoa cientista. Bem como nos revela a necessidade de cientistas ocuparem espaços cada vez mais populares para uma efetiva popularização da Ciência e expansão do pensamento científico na base das tomadas de decisão de nossa sociedade no futuro. Mas ainda é preciso muito trabalho, criatividade e perseverança para que o Brasil, seu povo e sua biodiversidade trilhem caminhos ecologicamente equilibrados e mais socialmente justos.

Acesse o Clube da Lontra através do link: linktr.ee/clubedalontra

Acompanhe nossas postagens!

4.2. Relatório técnico – Mustelídeos do Rio Grande do Sul

As figuras, as tabelas e os anexos deste documento foram organizados e nomeados separadamente do documento da Tese no intuito de tornar a reprodução deste relatório mais coesa e facilitada.



**MUSTELÍDEOS DO
RIO GRANDE DO SUL**

RELATÓRIO TÉCNICO

PORTO ALEGRE | 2022

LANA RESENDE DE ALMEIDA
MARIA JOÃO RAMOS PEREIRA

Este Relatório Técnico é um subproduto da Tese de Doutorado intitulada "Mustelídeos Neotropicais: Das moléculas à Conservação" executada por Lana Resende de Almeida sob a supervisão da Professora Doutora Maria João Ramos Pereira no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Ano 2022

Citação Sugerida

Almeida, L.R e Ramos Pereira, M.J. 2022 Mustelídeos do Rio Grande do Sul. Relatório Técnico. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil- 37 pp.

Autoras

Lana Resende de Almeida

Bióloga | Mestre em Biologia Animal – UFRGS | lanaresende.bio@gmail.com

Maria João Ramos Pereira

Bióloga | Doutora em Ecologia | Professora Adjunta – Departamento de Zoologia – UFRGS | mjrayka@gmail.com

Apoio





AGRADECIMENTOS

Este documento é uma forma de expressar toda a gratidão ao esforço e parceria de toda a equipe de técnicos, tratadores, guarda-parques, analistas ambientais e gestores que apoiaram esta pesquisa científica nos Zoológicos e Unidades de Conservação que abrangeram as fronteiras deste imenso projeto. Além, de carinhosamente agradecer aos proprietários e famílias residentes do município de Teutônia/ RS e arredores, que nos receberam gentilmente em suas propriedades para desenvolvimento de parte da pesquisa em campo.

SUMÁRIO

Introdução	5
Métodos de trabalho	9
Resultados alcançados e avaliação das ferramentas de trabalho	13
Sumário executivo	17
Eira barbara Irara	18
Galictis cuja Furão-pequeno	21
Lontra longicaudis Lontra neotropical.....	24
Considerações finais.....	28
Referências.....	30
Anexo I Protocolo de coleta de amostras fecais em cativeiro.....	34
Anexo II Cartilha de divulgação científica para público infanto-juvenil.....	36



QUEM SÃO OS MUSTELÍDEOS?

A família Mustelidae é a mais diversa dentre os mamíferos da Ordem Carnivora – que incluem felinos, canídeos, procionídeos e ursídeos, entre outros (1). Atualmente, a família abrange cerca de 65 espécies que ocorrem em quase todos os continentes do planeta, com exceção da Antártida (2).

Os mustelídeos são mesopredadores de corpo alongado e patas curtas, que se adaptaram a uma ampla variedade de ambientes, como áreas nevadas e desertos, florestas temperadas e tropicais. Sendo também avistados em ambientes antropizados, onde podem estar em conflitos com os humanos (2).

Os mustelídeos podem ser predadores de topo, onívoros ou carnívoros generalistas, se alimentando inclusive de carcaças e restos de presas de outros predadores. Podem apresentar hábitos fossoriais, arborícolas ou aquáticos. Existem ainda espécies que exploram habitats de interface com hábitos semi-arborícolas e semiaquáticos (2).

Assim, os mustelídeos ocupam diferentes níveis tróficos sendo parte importante de inúmeras comunidades bióticas. No Brasil, ocorrem seis espécies de mustelídeos: a doninha-amazônica (*Neogale africana*) (3), o furão-grande (*Galictis vittata*), o Furão-pequeno (*Galictis cuja*), a ariranha (*Pteronura brasiliensis*), a lontra neotropical





Furão-pequeno (*Galictis cuja*)

© Pablo Alejandro Pla

(*Lontra longicaudis*) e a Irara (*Eira barbara*) (4).

Historicamente, as quatro últimas espécies ocorriam no Estado do Rio Grande do Sul; no entanto, devido à pressão de caça no passado e à perda de habitat e conflitos com pescadores persistentes até à atualidade, a Ariranha sofreu perdas populacionais drásticas sendo considerada extinta no Estado (5).

Dessa forma, três espécies de mustelídeos ainda permanecem distribuídas em solo gaúcho – o furão pequeno, a lontra Neotropical e a irara - ocorrendo em simpatria em todo o território estadual pertencente ao bioma Mata Atlântica (4).

CONSERVAÇÃO

Status de Conservação das Espécies.

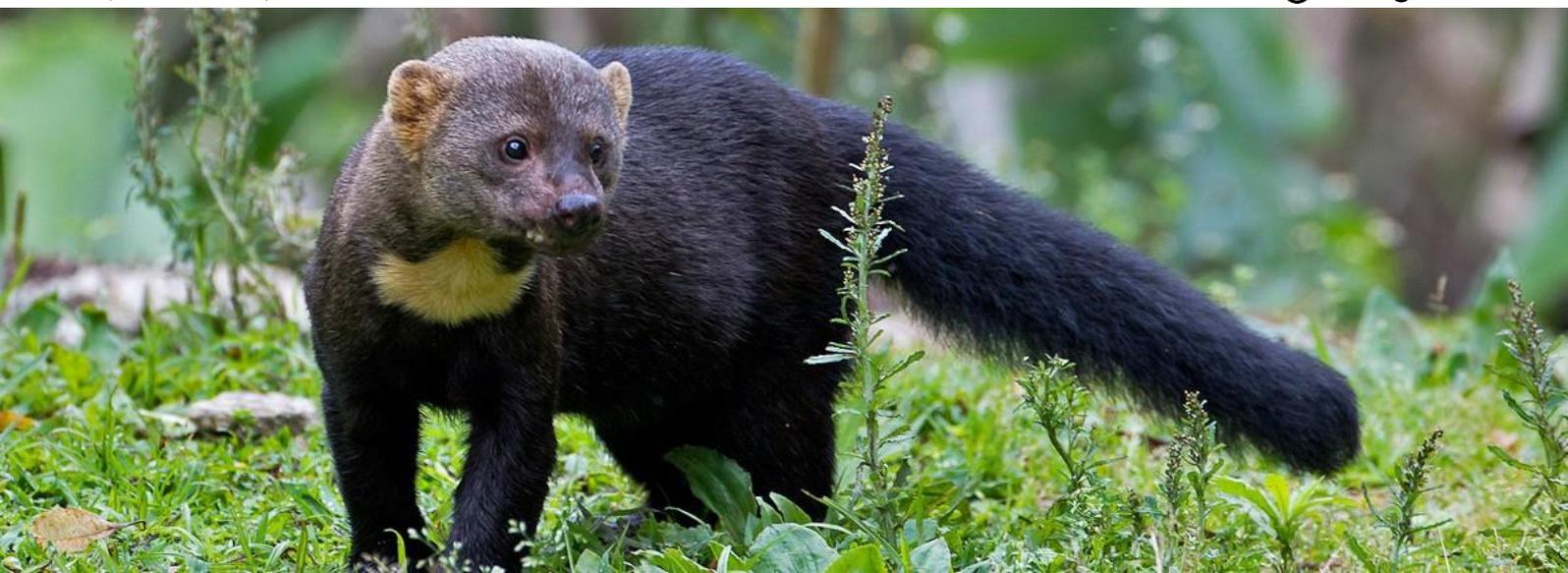
Mundialmente, grande parte dos mustelídeos está sob algum grau de ameaça de extinção; a lontra Neotropical, por exemplo, é considerada uma espécie "Quase Ameaçada", enquanto a irara e o furão-pequeno são classificadas como espécies de "Menos Preocupante" em sua avaliação global pela IUCN. No entanto, as populações de lontras e iraras encontram-se em declínio e a tendência populacional dos furões pequenos ainda é desconhecida (6).

Apesar dessas três espécies não estarem incluídas na última edição do Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, no Rio Grande

do Sul, a lontra Neotropical também está "Quase Ameaçada". Ao passo que, a irara é considerada uma espécie "Vulnerável" e não há ainda dados suficientes para estimar o status de conservação do furão-pequeno (7).

Dessa forma, estudos sobre aspectos ecológicos que subsidiem avaliações do risco de extinção mais atualizadas são necessários, visando um panorama mais consistente da situação atual de conservação.

O presente documento tem como objetivo principal fornecer um panorama geral dos avanços de estudos monitoramento e ecologia das espécies de mustelídeos no ter-





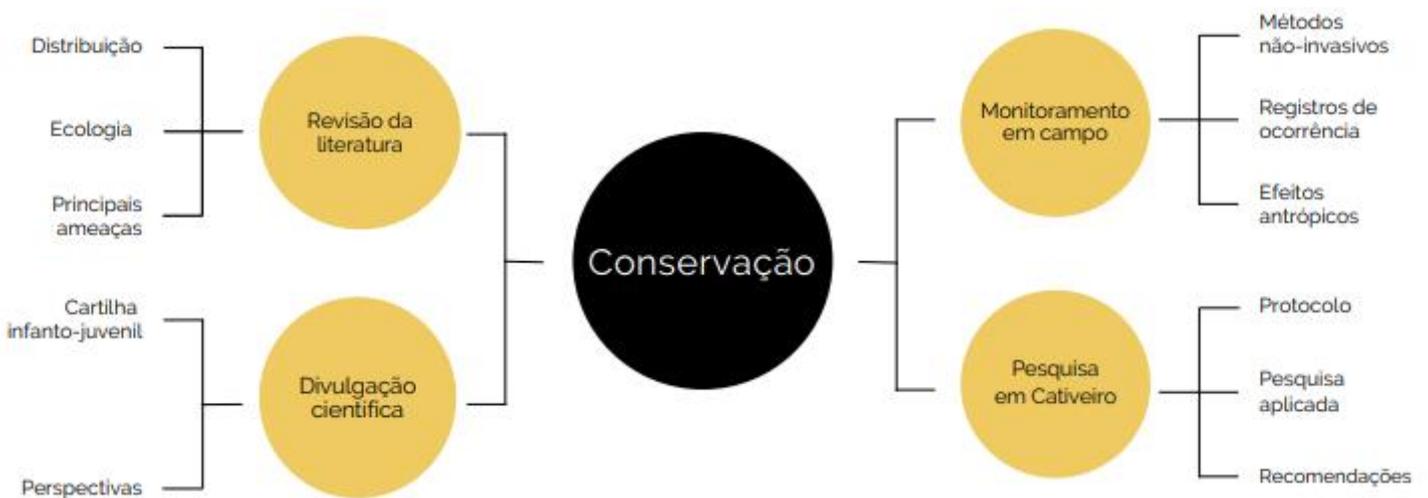
Lontra Neotropical (***Lontra longicaudis***)

© João Quental

-ritório do Estado do Rio Grande do Sul, bem como apresenta os principais resultados do projeto "Mustelídeos do Rio Grande do Sul: desvendando seu papel ecológico na conservação dos ecossistemas", no intuito de sintetizar e tornar acessível a pesquisa científica para tomadores de decisão e corpos técnicos das principais autoridades ambientais do Estado, e do Brasil.

MÉTODOS DE TRABALHO

Abordagens metodológicas para implementação de estratégias de monitoramento e conservação dos mustelídeos.



Revisão da literatura



Realizamos uma revisão da literatura considerando o período entre os anos de 2017 e 2022 através das plataformas de pesquisa de publicações: Google Scholar, Periódicos Capes e Dimensions. Sob o recorte da região Sul do Brasil, utilizamos as palavras chaves: “nome científico”, “nome vulgar”, “Rio Grande do Sul”, “Sul da Mata Atlântica”, “Pampa” e “Brasil” em suas versões em inglês e português, quando aplicável.

Artigos científicos, teses, dissertações e trabalhos de conclusão de curso foram considerados neste levantamento bibliográfico, bem como trabalhos desenvolvidos em Santa Catarina e Paraná.

Incluímos ainda, as revisões mais atualizadas sobre o conhecimento ecológico das espécies, e ainda, trabalhos que abrangem novidades taxonômicas e as últimas avaliações de risco de extinção publicadas pelo ICMBio em 2013, revelando avanços do conhecimento a partir deste documento.



Monitoramento de campo



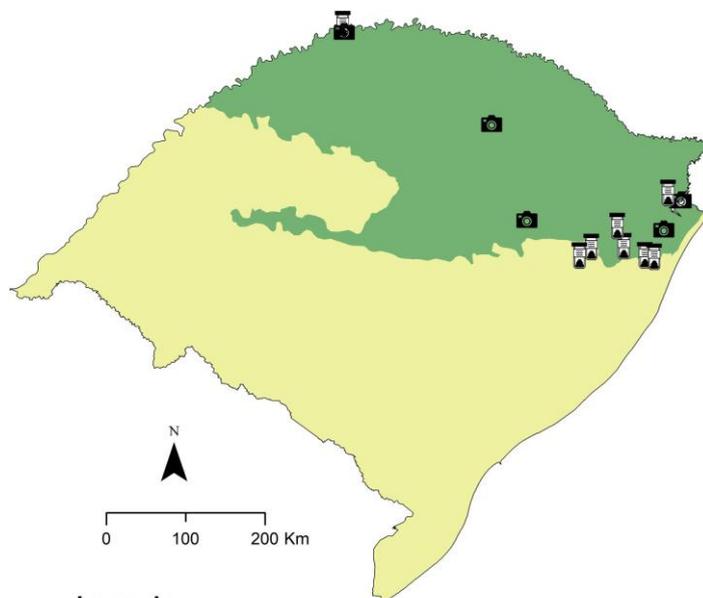
Foram instaladas 20 estações de armadilhas fotográficas com duas câmeras cada em cinco áreas do Estado do Rio Grande do Sul (Figura 1 e Tabela 1). As estações foram instaladas com aproximadamente 1 km de distância entre elas. Além disso, as câmeras permaneceram ativas em campo por cerca de dois meses entre os anos de 2017 e 2019.



Adicionalmente, realizamos o monitoramento de vestígios de lontras em margens e barrancos de rios e cursos d'água na Bacia do Rio dos Sinos (2015

- 2016) e nos arredores do Parque Nacional dos Aparados da Serra (2017 - 2018). respeitando um mínimo de

5 km entre os pontos amostrais em campanhas mensais e bimensais, respectivamente. No total, 10 áreas de estudo foram monitoradas para pelo menos uma espécie de mustelídeos (Tabela 1).



Legenda

- | | | | | | |
|---|-------------------------|---|----------------|---|-------------------|
|  | Coleta de fezes |  | Mata Atlântica |  | Rio Grande do Sul |
|  | Armadilhas fotográficas |  | Pampa | | |

Tabela 1: Lista de localidades amostradas e métodos não-invasivos utilizados: Armadilhas fotográficas e Coleta de amostras fecais



Localidade	Município	Coordenadas	Método
Campo Bom	Campo Bom	29°41'50.15"S 51° 3'7.49"O	
Caraá	Caraá	29°47'35.59"S 50°26'42.68"O	
Centro de Pesquisas PROMATA	São Francisco de Paula	29°28'50.60"S 50°10'26.02"O	
FLONA Passo Fundo	Mato Castelhano	28°18'51.11"S 52°11'18.05"O	
Igrejinha	Igrejinha	29°32'42.15"S 50°46'45.48"O	
PARNA Aparados da Serra	Cambará do Sul	29°10'39.28"S 50° 6'23.57"O	
PARNA Serra Geral	Cambará do Sul	29° 7'20.28"S 50° 0'42.95"O	
PE do Turvo	Derrubadas	27°13'57.61"S 53°51'4.82"O	
Rio da Ilha	Rio da Ilha	29°34'47.38"S 50°41'34.44"O	
Riozinho	Riozinho	29°38'48.84"S 50°31'10.39"O	
Rolante	Rolante	29°39'35.12"S 50°38'25.18"O	
São Leopoldo	São Leopoldo	29°45'36.70"S 51° 8'5.90"O	
Sapucaia do Sul	Sapucaia do Sul	29°47'41.65"S 51°11'12.59"W	
Taquara	Taquara	29°41'7.88"S 50°48'35.25"O	
Teutônia e arredores	Teutônia	29°28'17.84"S 51°49'0.37"O	
Três Coroas	Três Coroas	29°27'32.16"S 50°45'31.07"O	

Pesquisa em Cativeiro



No intuito de fortalecer parcerias entre Instituições de Pesquisa e Zoológicos brasileiros, implementamos um novo protocolo simplificado para a coleta de amostras fecais não-invasivas de mustelídeos em cativeiro que visa atender demandas de estudos em biologia molecular (análise de perfis químicos).

Todo o material para coleta, bem como instruções de aplicação do protocolo (Anexo D) foram enviados para dez Zoológicos brasileiros parceiros: (i) Parque Ecológico de Americana, (ii) Parque Ecológico de São Carlos/SP, (iii) Parque Zoobotânico Vale/PA, (iv) Parque Zoológico de Sapucaia do Sul/RS, (v) Zoológico de Brasília/DF, (vi) Zoológico de Pomerode/SC, (vii) Zoológico Municipal de Canoas/RS, (viii) Zoológico Municipal de Curitiba/PR, (ix) Zoológico Municipal de Uberaba/MG, e (x) Zoológico da Universidade de Caxias do Sul/RS. Os procedimentos foram realizados pela equipe local e o material biológico armazenado até seu envio imediato por correio rápido.

Em laboratório, as amostras recebidas foram processadas e aplicadas a cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas, responsável pela separação e leitura dos compostos químicos encontrados nas amostras fecais. Posteriormente realizamos análises multivariadas para detectar diferenças entre os perfis químicos dos mustelídeos.



Divulgação Científica



A divulgação científica é uma ferramenta de popularização da ciência que busca realizar a difusão do conhecimento científico para públicos não especializados. No intuito de instigar futuros cientistas e conscientizar para o conhecimento da ecologia e conservação de mustelídeos no Rio Grande do Sul, disponibilizamos uma cartilha para o público infanto-juvenil no QR Code abaixo para impressão e utilização acessível de gestores e profissionais da Educação.



RESULTADOS

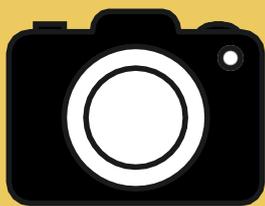
RESULTADOS ALCANÇADOS E AVALIAÇÃO DAS FERRAMENTAS DE TRABALHO.

Na revisão da literatura encontramos 98 publicações e, após a triagem de temas relacionados à ecologia, conservação e distribuição local das espécies, foram selecionadas 30. A lista completa de trabalhos consultados pode ser acessada encontrada na seção de referências e as informações encontradas compõem o Sumário Executivo de cada espécie.

Recomendamos:

- A criação de um repositório estadual integrado e online para compilar e atualizar a bibliografia publicada de pesquisas realizadas em Unidades de Conservação (UC) do Estado do Rio Grande do Sul.
- A consulta periódica dos repositórios de teses, dissertações e monografias das principais Universidades do Estado.



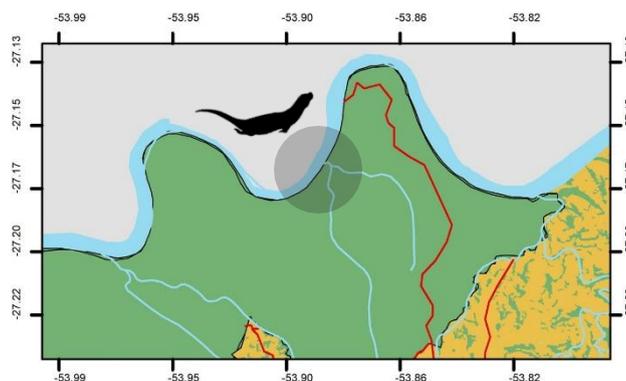


No monitoramento em campo, as armadilhas fotográficas obtiveram 33 registros iraras e 13 de furões pequeno são longo das áreas amostradas e diversas paisagens, considerando o intervalo de uma hora para registros independentes. Não foram registradas lontras através desse método.

Iraras foram mais registradas no Parque Estadual do Turvo e no Parque Nacional da Serra Geral. Registros de furão-pequeno na FLONA de Passo Fundo confirmam a potencial ocorrência prevista no plano de manejo dessa Unidade. Inclusive, nesta UC foi onde mais registramos a espécie.

Assim, recomendamos a inclusão do Parque Nacional da Serra Geral como localidade de ocorrência de irara (*Eira barbara*) e da FLONA de Passo Fundo como localidade de ocorrência de furão-pequeno (*Galictis cuja*) nas próximas avaliações do risco de extinção dessa espécie feita pelo ICMBio.

Fezes de lontras foram abundantes nos cursos d'água monitorados em Caraá, em Rolante e nos Parques Nacionais da Serra Geral e dos Aparados da Serra, ao longo do Rio Camisas. No Parque Estadual do Turvo, foram coletadas amostras próximo ao Salto Yucumã e na entrada da bacia do Rio Marosa.



Foram ainda detectadas fezes de outros carnívoros durante as campanhas de campo em todas as áreas de estudo, mas pela falta de um método acessível para identificação, não foram coletadas.

A pesquisa desenvolvida junto aos Zoológicos visou a discriminação de espécies de lontras, irara e furões a partir da composição de compostos químicos presentes em amostras fecais.





Foram coletadas um total de 75 amostras fecais individuais nos Zoológicos parceiros.

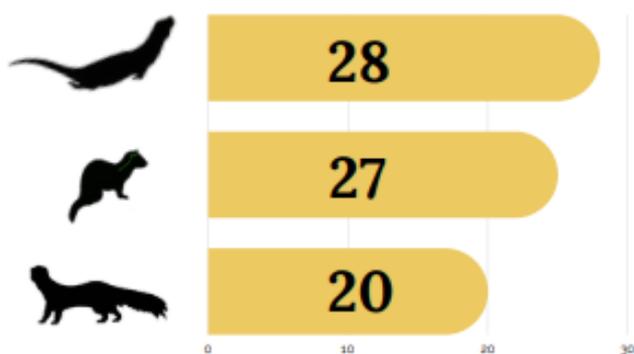


Fig. 3 Número amostral das coletas de amostras fecais para cada espécie.

As maiores dificuldades relatadas pelas equipes foram: o isolamento dos indivíduos até a defecação e o armazenamento correto das amostras fecais.

Para as pesquisadoras, as principais dificuldades estiveram relacionadas com a obtenção de informações sobre a presença de mustelídeos no plantel de cada Instituição e a não observação da legislação vigente para amostras fecais e métodos não-invasivos por alguns responsáveis que acarretou novas solicitações e dificuldades

na aprovação da pesquisa.

Apesar dos constrangimentos acima relatados, os objetivos foram atingidos, tendo sido possível discriminar as três espécies de mustelídeos que ocorrem no RS, através de amostras fecais. Em escala Neotropical, nossos resultados discriminaram três grandes grupos: 1- lontras (ariranha e lontra Neotropical), 2- furões (furão-grande e pequeno), 3- Irara. No futuro, este método pode ser aplicado com fezes oriundas de trabalhos de campo e para outras espécies de Carnívora com distribuição simpátrica.

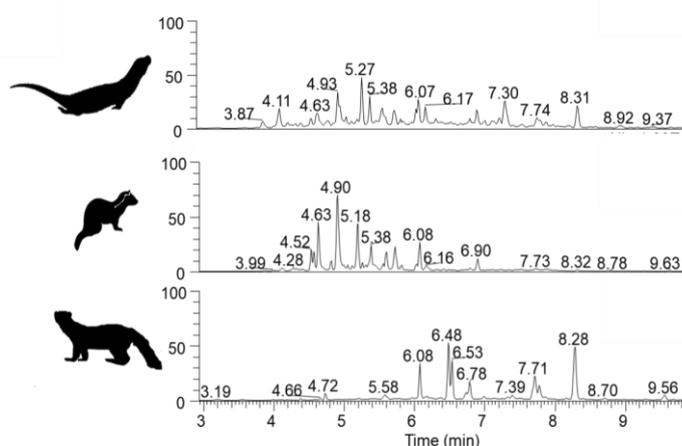


Fig. 4 Perfil químicos das três espécies de mustelídeos apresentam padrões distintos.

Sugerimos:

- A instalação de armadilhas fotográficas como metodologia não-invasiva para o monitoramento de longo-prazo

de espécies de mustelídeos terrestres em Unidades de Conservação do RS e em fragmentos de Mata Atlântica, em geral.

- A coleta de amostras fecais de mamíferos de médio e grande porte em Unidades de Conservação como método não-invasivo complementar.

- A implementação de um sistema único de consulta de plantel das Instituições reconhecidas pela Secretaria de Meio Ambiente e Infraestrutura do Estado do Rio Grande do Sul – SEMA/RS que abrigam fauna silvestre em cativeiro. Ou a integração desses dados ao Sistema de Informação Geográfica sobre a Biodiversidade (SIGBio).

- A instalação de pelo menos um refrigerador laboratorial em Zoológicos e Unidades de Conservação do Estado para atender demandas de futuros estudos de biologia molecular.

- A realização de estudos de fisiologia, nutrição, comportamento animal e reprodução de mustelídeos e outros mamíferos, fortalecendo parcerias entre Universidades e Zoológicos gaúchos.





**MUSTELÍDEOS DO
RIO GRANDE DO SUL**

SUMÁRIO EXECUTIVO

PORTO ALEGRE | 2022

LANA RESENDE DE ALMEIDA
MARIA JOÃO RAMOS PEREIRA



© Patricio Cowper Coles

Eira barbara | Irara



A irara é um mustelídeo terrestre de hábito semi-arborícola. De porte médio e corpo comprido, iraras podem pesar até 7 kg (2). Iraras possuem coloração variável e podem apresentar manchas na garganta úteis para identificação individual (8). O dimorfismo sexual é reconhecido para a espécie, onde os machos são 30 % maiores que as fêmeas (2). A espécie ocorre desde o México ao Norte da Argentina, presente em todo o território brasileiro com exceção a áreas mais áridas da Caatinga (9).

Contexto taxonômico

Os padrões de coloração de iraras têm sido estudados ao longo da sua distribuição no intuito de resolver aspectos da sua taxonomia, principalmente ao nível da subespécie (10). No entanto, apesar da maioria dos indivíduos possuírem uma pelagem bicolor, com os pelos da cabeça e pescoço bege-amarronzado e do corpo marrom-acinzentado, é possível encontrar indivíduos completamente escuros ou com pelagem majoritariamente clara entre as diferentes populações (11).



Além disso, casos de leucismo também têm sido reportados para espécie (12). No entanto, com base em dados morfológicos cranianos e moleculares é reconhecido que *E. b. barbara* é a subespécie que ocorre no Rio Grande do Sul (10).

Ecologia

As iraras são animais onívoros, se alimentam de frutos, frutas, mel, invertebrados e pequenos vertebrados, incluindo primatas e aves (11). No entanto, na região Sul já foram registrados eventos de predação de presas maiores como veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) (13). Iraras possuem um papel relevante como dispersoras de sementes e tal-

vez estejam competindo em algum nível com predadores de maior porte (13). No entanto, lacunas de conhecimento sobre a biologia da espécie ainda mantêm seus potenciais papéis ecológicos e ecossistêmicos relativamente desconhecidos.

As iraras possuem o olfato bem desenvolvido, indicando que a comunicação química é prioritária na espécie (2). Os perfis químicos fecais da espécie incluem 85% de ácidos biliares, a maior proporção dentre os perfis de mustelídeos neotropicais. Os ácidos biliares são compostos majoritariamente endógenos que além regularem inúmeras vias metabólicas poderão estar envolvidos em interações intra e interespecífica de iraras (14).

A espécie ocorre em todo o Estado do Rio Grande do Sul, especialmente nos remanescentes de Mata Atlântica (5). No entanto, apresenta grande plasticidade ambiental reflexo da sua grande capacidade de deslocamento diário(11). Assim, iraras têm sido detectadas em campos nativos, plantações e em regiões periurbanas, mais afastadas de grandes cidades (15).

Mesmo sendo animais reconhecidamente diurnos, obtivemos registros de atividade de forrageio crepuscular e noturno, principalmente na região do município de Teutônia, no Vale do Taquari (15). Em regiões mais preservadas como no Parque Nacional da Serra Geral e na FLONA de São Francisco de Paula a espécie revelou-se majoritariamente diurna (15,16).

Ameaças e Conservação

Globalmente, a irara categorizada como espécie de "Menos Preocupante". No entanto, o status de "Vulnerável" e a tendência de populações em declínio no RS indicam que a espécie enfrenta um risco alto de extinção na natureza num futuro próximo (6,7).

Os atropelamentos e os ataques de cães são ameaças à conservação da espécie, tal como acontece nas outras espécies de mustelídeos (6,17,18). No entanto, a fragmentação e degradação de ambientes florestais pode ter um impacto particular para a irara (19).



Não foram encontradas evidências de zoonoses recentes em iraras, mas é expectável que doenças descritas em outros mustelídeos também ocorram nesta espécie.

Assim, recomendamos:

- O apoio a estudos que visem esclarecer a distribuição, a estruturação genética e as ameaças pertinentes à conservação de iraras (*Eira barbara*), objetivando a identificação de áreas prioritárias e refúgios no RS.

- O apoio a estudos de parasitologia e fisiologia pelo potencial de *E. barbara* como espécie reservatório de zoonoses.

- A adoção de medidas mitigatórias para o atropelamento de fauna nas rodovias estaduais do RS, especialmente aquelas que circundam Unidades de Conservação, onde a espécie tem sido mais registrada.

- A elaboração de programas de monitoramento contínuo e de longo-prazo para a espécie e observação das medidas previstas para espécies em status de conservação Vulnerável no Estado do Rio Grande do Sul.

- Ações de conscientização ambiental e conservação da biodiversidade em parceria com as principais Unidades de Conservação da Mata Atlântica gaúcha.





©Franco Elgueta

Galictis cuja | Furão-pequeno



O furão-pequeno é um mustelídeo terrestre de corpo alongado e patas curtas que possui uma pelagem cinza- amarela e uma faixa diagonal amarelo- alaranjado (20). Ao contrário de *Galictis vittata*, a outra espécie de furão que ocorre no Brasil, o furão-pequeno mede entre 49 – 54 cm e sua cauda representa 40% do comprimento total do corpo (2).

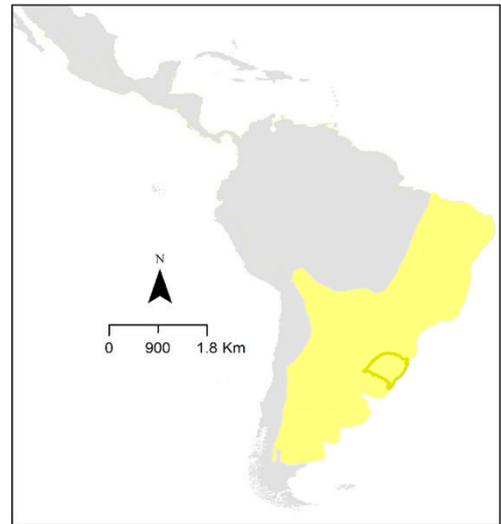
A espécie ocorre no sudeste do Peru, oeste e sul da Bolívia, centro do Chile, Paraguai, Uruguai, Argentina. O furão-pequeno ocorre em quase todo o território nacional, exceto na Amazônia (21).

Contexto taxonômico

São atualmente reconhecidas quatro subespécies de *Galictis cuja*: *G. c. cuja*, *G. c. huronax*, *G. c. luteola* e *G. c. furax*. Esta última ocorre em parte do território nacional e em todo o Estado do Rio Grande do Sul (20).

Ecologia

A espécie ocorre em regiões florestais e em campo abertos, sendo encontrada também em áreas de cultivo de grãos e rurais (22). Apesar de ser considerada diurna com alguma atividade crepuscular/noturna, a sua atividade de forrageio apresenta alguma variação sazonal no RS (23,24).



Atividade diurna mais contínua é registrada no inverno, ao passo que no verão, o forrageio é bimodal, com picos de atividade no início da manhã no final da tarde, evitando as horas mais quentes do dia (15,24).

Por ser um mesopredador, o período de forrageio do furão-pequeno também podem ser moldado pela presença de predadores de maior porte com atividade catemeral, como por exemplo, a onça-parda, *Puma concolor* (15,24).

A abundância da espécie parece ser menor em ambientes florestais do que em ambientes abertos, sendo frequentemente registrada no Pampa gaúcho (20,23).

Mesmo assim, registros de furão-pequeno na FLONA de Passo Fundo, realizados durante nossa amostragem de campo, confirmam a ocorrência da espécie na Unidade, em uma nova localidade na Mata Atlântica do sul do Brasil (15).

Análises da morfologia craniana de furão-pequeno indicam que os indivíduos que ocorrem no Pampa são maiores do que os encontrados na Mata Atlântica (25). Além disso, há dimorfismo sexual em relação ao tamanho em ambos os biomas, onde machos são 20% em média maiores do que as fêmeas (25).

Mesmo sendo considerados animais generalistas e oportunistas, como a maioria dos outros mustelídeos, a dieta dos furões pequenos é majoritariamente carnívora (22). Roedores, marsupiais, pequenos répteis, anuros e aves compõem um cardápio variado, sendo que a proporção desses itens na composição da dieta varia ao longo da distribuição da espécie, provavelmente associado à disponibilidade local de cada um destes itens (24).

Roedores, marsupiais, pequenos répteis, anuros e aves compõem um cardápio variado, sendo que a proporção desses itens na composição da dieta varia ao longo da distribuição da espécie, provavelmente associado à disponibilidade local de cada um destes itens (24).

Porém, essa hipótese carece de estudos desenvolvidos através de metodologias padronizadas ao longo da distribuição da espécie para ser suportada.

Ameaças e Conservação

Galictis cuja é uma das espécies de mustelídeos menos conhecidas, sendo um desafio estimar suas tendências populacionais, ameaças e status de conservação. A espécie é considerada "Menos Preocupante" internacionalmente e "Dados Insuficientes" no RS (5,20,21).

Para além da fragmentação e degradação de seus habitats, os atropelamentos são um perigo eminente à conservação da espécie, sobretudo no Pampa (26).

© Diego Carús



Além disso, inúmeros parasitas e potenciais zoonoses já foram encontrados nos furões pequenos como *Leshimania infatum*, *Diocotylidium phymenale* e o vírus da cinomose canina (família Paramyxoviridae) (20,27).

A caça cultural e/ou por retaliação também ameaça a espécie, mesmo a prática sendo ilegal. Além disso, furões podem ser caçados por cães domésticos principalmente quando ocorrem em plantações e fazendas (17).

Galictis cuja não é considerada uma espécie prioritária para conservação no Brasil, nem no Rio Grande do Sul. No entanto, com o aumento da degradação ambiental da Mata Atlântica e principalmente do Pampa, as populações da espécie no RS poderão estar sob algum grau de ameaça ainda desconhecido.

Assim, recomendamos:

- O apoio a estudos no Pampa, e na Savana Uruguiaia como um todo, para minimizar lacunas de conhecimento de modo a auxiliar futuras avaliações locais, regionais e estaduais do status de conservação de *G. cuja*.

- A adoção de medidas mitigatórias para o atropelamento de fauna nas rodovias estaduais do RS, especialmente as que circundam arrozais, onde a espécie tem sido frequentemente avistada.

- O apoio a estudos sobre zoonoses pelo potencial de *G. cuja* como reservatório silvestre.
- Ações de conscientização ambiental e conservação da biodiversidade em parceria com Unidades de Conservação e organizações de representação de proprietários rurais do RS.





© Carlos Sánchez

Lontra longicaudis | Lontra neotropical



A Lontra Neotropical é um mustelídeo semiaquático que ocorre em uma diversidade de habitats associados aos ecossistemas de água doce e costeiros, como rios, lagoas, lagos e estuários (28). De hábito crepuscular, a espécie é um predador de topo oportunista e generalista, apesar de ser reconhecida uma dieta majoritariamente composta por peixes e crustáceos (29).

A Lontra Neotropical ocorre desde o México ao nordeste da Argentina e em todo o território nacional brasileiro com exceção da Caatinga, onde a sua ocorrência ainda é incerta (28).

Contexto Taxonômico

Atualmente, características da morfologia craniana e aspectos ecológicos sustentam a ocorrência de três subespécies de *Lontra longicaudis*: *L. l. annectens*, *L. l. enudris* e *L. l. longicaudis*, esta última com ocorrência em todo o Estado do Rio Grande do Sul (29). Entretanto, pela divergência genética recente entre *L. l. enudris* e *L. l. longicaudis* –



aproximadamente 0.5 Ma - é controverso se a divisão atualmente reconhecida é efetivamente válida (30).

Independentemente da hipótese filogenética atualmente aceita, *L. l. longicaudis* representa uma unidade biológica distinta em sua distribuição geográfica, história evolutiva e características genéticas e morfológicas (30).

Dessa forma, em termos de conservação, é preciso atentar que suas populações podem estar sob ameaças locais particulares e ainda desconhecidas. Além disso, é preciso identificar as suas respostas às pressões antrópicas e, com base nesse

conhecimento, implementar estratégias de monitoramento e conservação locais.

Afinal, a manutenção local das populações é de suma importância para melhorar o status de conservação de *Lontra longicaudis* através da sua ampla distribuição (28,30).

Ecologia

No RS, a lontra Neotropical está presente em cursos d'água no Pampa gaúcho onde geralmente se alimenta de peixes das famílias Cichlidae e Loricariidae pelas suas grandes abundância e baixa motilidade (31). Nessa região a espécie parece ser principalmente diurna, tal como ocorre em outros ambientes mais abertos como no Pantanal (32).

Na porção do Estado sob o domínio da Mata Atlântica do Estado, a espécie ou seus vestígios são frequentemente detectados. Tal ocorre desde regiões mais preservadas como o PE do Turvo, os PARNA de Aparados da Serra e Serra Geral e ainda, a região do município de Caraá - onde está situada a nascente do Rio dos Sinos - até áreas mais urbanizadas como em rios e arroios da região Metropolitana de Porto Alegre e Pelotas (15,33,34).

No litoral gaúcho, as lontras exploramdes de ambientes de água doce até estuários e lagoas de águas salobras (35,36). No sistema hidrológico do Taim há evidências de que as lontras forrageiam a maior parte de suas vidas na região sob influência estuarina e, eventualmente, entram nos rios da região para se alimentarem e garantir a sua estabilidade fisiológica devido às alterações de salinidade (35).

Um padrão invertido é encontrado na região da Bacia do Rio Tramandaí onde somente os machos, que apresentam maior capacidade de dispersão, parecem forragear de forma ocasional nas águas salobras da Lagoa de Tramandaí (35).

Dessa forma, as lontras exercem uma importante função ecossistêmica de transporte de nutrientes entre ecossistemas de água doce e costeiros.

© Chris Lloyd



Ameaças e Conservação

Conflitos com pescadores são cada vez mais reportados em todo o Estado devido ao fato das lontras eventualmente se alimentarem de espécies de interesse comercial, como corvinas (*Micropogonias furnieri*), siris azuis (*Callinectes* sp.), entre outras (35,36).

Além disso, a ocorrência da espécie em regiões mais urbanizadas e rurais, onde a qualidade da água é ruim, os conflitos parecem ainda mais críticos pela menor disponibilidade de peixes e maior registro de ataques da espécie à animais em pisciculturas e açudes artificiais (29,33).

A presença de lontras em cursos d'água poluídos, mesmo que menos frequentemente, é uma potencial ameaça à espécie pela risco de bioacumulação e biomagnificação de poluentes (15,36). Inclusive, recentemente, foram detectados contaminantes de origem industrial nos perfis químicos de lontras da Bacia do Rio dos Sinos (15). Essa contaminação pode afetar diretamente a fisiologia, a comunicação química e a reprodução da espécie.

O conflito com cães também sido uma ameaçada evidente às lontras no RS. Além de ataques fatais, casos de parvovirose canina, parasitismo por *Diocrophyme renale* e outras zoonoses são reconhecidas ameaças para a espécie (37).

Frequentes atropelamentos em estradas gaúchas bem como o aumento da fragmentação e degradação ambiental são ameaças para a lontra Neotropical.

A espécie é atualmente categorizada como "Quase Ameaçada" tanto a nível global quanto no Estado do Rio Grande do Sul (5,7,38).

Mesmo sendo priorizada em dois Planos de Ação Nacional (PAN Ariranhas e Mamíferos Aquáticos da Amazônia) (39,40), recomendamos as seguintes ações para o Rio Grande do Sul:

© Jessica dos Anjos



- A inclusão de *Lontra longicaudis* como espécie de interesse no PAN Lagoas do Sul, promovendo ações de monitoramento da espécie e levantamento de conflitos no litoral do Estado e todo o Sul do Brasil.

- A adoção de medidas mitigatórias para o atropelamento de fauna nas rodovias estaduais do RS, especialmente aquelas próximas a cursos d'água e as de alta velocidade como é o caso, por exemplo, da BR-290 e a BR-101 litoral.

- O apoio estudos em Unidades de Conservação, onde possivelmente a espécie está mais protegidas, para minimizar lacunas de conhecimento que possam auxiliar futuras avaliações do seu status de conservação.

- O apoio a estudos em cativeiro, onde é possível avaliar mais facilmente alguns aspectos da biologia e fisiologia da espécie e que possam auxiliar futuras avaliações

do seu status de conservação.

- O incentivo aos proprietários e pescadores para adotarem técnicas menos nocivas para as lontras em atividades pesqueiras e de criação de peixes e aves.

- O monitoramento de lontras em ambientes urbanos, para a detecção de locais mais frequentes de avistamentos e a sensibilização das pessoas em âmbito da conservação da espécie, por exemplo na Orla do Rio Guaíba, em Porto Alegre.

- Ações de conscientização ambiental e conservação da bio-diversidade em parceria com Unidades de Conservação e organizações de representação de pescadores e populações ribeirinhas do RS, onde a lontra tem potencial de ser usada como espécie bandeira pelo seu apelo midiático.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

A conservação da biodiversidade depende do conhecimento da biologia das espécies, de políticas públicas de preservação ambiental e da sensibilização das pessoas. Para os mamíferos, especialmente os carnívoros, as ameaças são cada vez maiores, sendo este grupo um dos principais protagonistas dos conflitos entre humanos e fauna silvestre (18,41).

No Rio Grande do Sul, ocorrem 25 espécies de carnívoros, onde as três espécies de mustelídeos abordadas nesse projeto estão incluídas. Regionalmente, as principais ameaças às populações de carnívoros incluem a destruição do habitat, principalmente pela conversão em larga-escala dos seus habitats para fins agrícolas e silvícolas, e conflitos pelo aumento da área urbanizada (41).

Para os mustelídeos, a poluição de recursos hídricos, ataques de animais domésticos, zoonoses e atropelamentos também são ameaças eminentes (15).

De fato, os atropelamentos de mustelídeos em estradas gaúchas representam cerca de 40% dos atropelamentos registrados para o grupo no Brasil (42,43).

O conhecimento de aspectos ecológicos e biológicos relevantes como estimativas de tamanho e densidade populacionais, padrões de atividade e ocupação espaço-temporais, hábitos alimentares e viabilidade genética das populações é crucial.

Além disso, o estabelecimento de métodos de monitoramento que contemplem as peculiaridades dos mustelídeos são importantes para o manejo e a conservação deste grupo que inclui espécies de hábitos semi-arborícolas e semiaquáticos.

Contudo, as demandas da ciência no sentido de sanar lacunas do conhecimento só poderão ser atendidas através do comprometimento das agências financiadoras com a pesquisa científica de qualidade (41).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Grupos de pesquisa de Universidades públicas e particulares do Estado têm avançado no conhecimento acerca dos mustelídeos. Este esforço deve ser continuado, bem como a publicação e a divulgação mais abrangente dos resultados desses trabalhos. O monitoramento integrado das espécies é ainda outra necessidade.

No âmbito público, medidas mitigatórias para os atropelamentos de fauna silvestre são de suma relevância para a conservação dos mustelídeos no RS e de outros grupos que compõe a fauna nativa do estado. Além disso, a gestão e o licenciamento ambiental baseados em evidências científicas devem ser adotados.

Ademais, a legislação e a fiscalização adequadas para proteção da biodiversidade, o fortalecimento das Unidades de Conservação e apoio a Instituições que abrigam animais em cativeiro e acolhem fauna silvestre são fundamentais para a

manutenção da biodiversidade gaúcha.

Por fim, a conservação da natureza passa pela sensibilização e educação ambiental. Esta tarefa pode ser árdua, mas é preciso persistir. Ações integradas de cientistas, administração pública e de setores da sociedade civil, como particulares e organizações não-governamentais, devem ser estimuladas, bem como a organização de eventos e atividades de divulgação científica e programas permanentes de educação ambiental. Nesse sentido, iraras, furões pequenos e principalmente lontras são espécies carismáticas que podem ser usadas como espécies bandeira na comunicação ambiental.

Em última instância, o futuro das populações das espécies de mustelídeos, e de outros carnívoros, dependerá de estratégias integradas sob a luz da governança ambiental ética, comprometida com a conservação da biodiversidade.

REFERÊNCIAS

1. Wilson D, Mittermeier A, editors. Carnivores. In: Handbook of the mammals of the world. Lynx Editions; 2009.
 2. Macdonald DW, Newman C, Harrington LA, editors. Biology and conservation of musteloids. First Edit. New York: Oxford University Press; 2017. 701 p.
 3. Patterson BD, Ramírez-Chaves HE, Vilela JF, Soares AER, Grewe F. On the nomenclature of the American clade of weasels (Carnivora: Mustelidae). J Anim Divers. 2021;3(2):1–8. Available from: <http://jad.lu.ac.ir/article-1-132-en.html>
 4. Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP, editors. Mamíferos do Brasil. Londrina; 2006. 437 p.
 5. Silva F. Mamíferos do Rio Grande do Sul. 3a ed. Porto Alegre: Via Sapiens; Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul; 2014. 308 p.
 6. IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. 2022. Available from: <http://www.iucnredlist.org>
 7. Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. Lista da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul. Porto Alegre; 2014.
 8. Villafañe-Trujillo ÁJ, López-González CA, Kolowski JM. Throat Patch variation in Tayra (*Eira barbara*) and the potential for individual identification in the field. Diversity. 2018;10(1):1–23.
 9. Cuarón AD, Reid F, Helgen K, González-Maya JF. *Eira barbara*. IUCN Red List Threat Species. 2016;
 10. Schiaffini MI. Are subspecies of *Eira barbara* real? J. of Mammalogy 2020;(X):1–16.
 11. Rodrigues L de A, Mendes Pontes AR, Rocha-Campos CC. Avaliação do risco de extinção da Irara *Eira barbara* (Linnaeus, 1758) no Brasil. ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2013.
 12. Aximoff I, Hübel M, Freitas AC de, Rosa C, Caravaggi A. Natural History Notes on Interactions and Abnormal Coloration in Carnivores in the Araucaria Forest, Southern Brazil. Oecologia Aust. 2021;25(04):862–70.
 13. Grotta-Neto F, Mello MCH, Mello RC, Bernardi IP, Carrano E, Passos FC. The role of tayra (*Eira barbara*) as predator of medium and large-sized mammals. Austral Ecol. 2021;46(2):329–33.
-

REFERÊNCIAS

14. Almeida LR de, Alves M, Mastella AMO, Garret R, Ramos Pereira MJ. Neotropical mustelids: fecal metabolome diversity and its potential for taxonomic discrimination. *Integr Zool.* 2022.
 15. Almeida LR de. Mustelídeos Neotropicais: Das moléculas à Conservação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2022.
 16. Marques RV, Fabián ME. Daily activity patterns of medium and large Neotropical mammals in an area of Atlantic rain forest at altitude. *Rev Bras Zool.* 2018;19(3).
 17. Pereira AD, Antoniazzi MH, Vidotto-Magnoni AP, Orsi ML. Mamíferos silvestres predados por cães domésticos em fragmentos de Mata Atlântica no sul do Brasil. *Biotemas.* 2019;32(2):107–13.
 18. Wright PGR, Croose E, Macpherson JL. A global review of the conservation threats and status of mustelids. *Mamm Rev.* 2022;1–15.
 19. Bianchi R, Jenkins JMA, Lesmeister DB, Gouvea JA, Cesário CS, Fornitano L, et al. Tayra (*Eira barbara*) landscape use as a function of cover types, forest protection, and the presence of puma and free-ranging dogs. *Biotropica.* 2021; 53(6):1569–81.
 20. Kasper CB, Leuchtenberger C, Bornholdt R, Pontes ARM, Beisiegel Bde M. Avaliação do risco de extinção do Furão *Galictis cuja* (Molina, 1782) no Brasil. Vol. 3, ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2013.
 21. Helgen K, Schiaffini M. *Galictis cuja*. The IUCN Red List of Threatened Species. 2016.
 22. Poo-Muñoz DA, Escobar LE, Townsend Peterson A, Astorga F, Organ JF, Medina-Vogel G. *Galictis cuja* (Mammalia): An update of current knowledge and geographic distribution. *Iheringia - Ser Zool.* 2014;104(3):341–6.
 23. Gomide AM, Loebmann D. Atividade diária para carnívoros simpátricos no extremo sul do Brasil. Universidade Federal do Rio Grande - FURG; 2017.
 24. Pires NC. Dieta e padrão de atividade do furão-pequeno *Galictis cuja* (Carnivora: Mustelidae). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2018.
 25. Migliorini RP, Fornel R, Kasper CB. Geographic variation in the skull morphology of the lesser grison (*Galictis cuja*: Carnivora, Mustelidae) from two Brazilian ecoregions. *PeerJ.* 2020; 8:1–19.
-

REFERÊNCIAS

26. Cirino DW, Freitas SR. Quais são os mamíferos silvestres mais atropelados no Brasil ? In: Anais do 5º Workshop de Evolução e Diversidade. 2019.
27. Pedrassani D, Worm M, Drechmer J, Santos MCI. Lesser Grison (*Galictis cuja* Molina, 1782) as host of *Diocotophyme renale* Goeze, 1782. *Arq Inst Biol* (Sao Paulo). 2018;84(0):1–4.
28. Rheingantz ML, Santiago-Plata VM, Trinca CS. The Neotropical otter *Lontra longicaudis*: a comprehensive update on the current knowledge and conservation status of this semiaquatic carnivore. *Mamm Rev*. 2017;47(4):291–305.
29. Almeida LR, Ramos Pereira MJ. Ecology and biogeography of the Neotropical otter *Lontra longicaudis*: existing knowledge and open questions. *Mammal Res*. 2017;62(4).
30. Hernández-Romero PC, Gutiérrez-Rodríguez C, Valdespino C, Prieto-Torres DA. The Role of Geographical and Ecological Factors on Population Divergence of the Neotropical otter *Lontra longicaudis* (Carnivora, Mustelidae). *Evol Biol*. 2018;45(1):37–55.
31. Correa Almansa FA. Hábitos alimentares de *Lontra longicaudis* (Carnivora : Mustelidae) e sua relação com a disponibilidade de presas no Pampa Gaúcho. Universidade Federal do Pampa; 2019.
32. Rheingantz ML, Leuchtenberger C, Zucco CA, Fernandez F a. S. Differences in activity patterns of the Neotropical otter *Lontra longicaudis* between rivers of two Brazilian ecoregions. *J Trop Ecol*. 2016;32 (May):170–4. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0266467416000079
33. Almeida LR, Pereira MJR. Influence of the water quality on the occurrence of the Neotropical otter (*Lontra longicaudis*) (Olfers, 1818) in a human-altered river basin. *MarFreshw Res*. 2018;(1):122–7.
34. Koling A. O que sabemos sobre ecologia e conservação de mamíferos carnívoros no rio grande do sul? Universidade Federal da Fronteira Sul; 2017.
-

REFERÊNCIAS

35. Carrasco TS, de Lima RC, Botta S, Machado R, Simões-Lopes PC, Ott PH, et al. Temporal and individual variation in the diet of the Neotropical otter, *Lontra longicaudis* (Olfers, 1818) (Carnivora, Mustelidae), as revealed by stable isotope analysis of vibrissae. *Mamm Biol.* 2020;100(5):505–20. <https://doi.org/10.1007/s42991-020-00060-8>
36. Carrasco TS, Botta S, Machado R, Simões-Lopes PC, Carvalho-Junior O, Ott PH, et al. Isotopic niche of the Neotropical otter, *Lontra longicaudis* (Carnivora, Mustelidae), in different coastal aquatic systems in southern Brazil. *Hydrobiologia.* 2019;0123456789.
37. Echenique JVZ, Soares MP, Mascarenhas CS, Bandarra PM, Quadros P, Driemeier D, et al. *Lontra longicaudis* infected with canine parvovirus and parasitized by *Dioctophyma renale*. *Pesquisa Veterinária Bras.* 2018;38(9):1844–8.
38. Rheingantz ML, Rosas-Ribeiro P, Gallo-Reynoso J, Fonseca da Silva, V.C., Wallace R, Utreras V, Hernández-Romero P. *Lontra longicaudis*. The IUCN Red List Threat Species. 2021.
39. ICMBio. Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Mamíferos Aquáticos Amazônicos. ICMBio - Instituto Chico Mendes Conservação da Biodiversidade. 2019; Available from : <http://www.icmbio.gov.br/portal/fa-unabrasileira/planos-de-acao/10193-plano-de-acao-nacional-para-a-conservacao-mamiferos-aquaticos-amazonicos>
40. ICMBio. Plano de Ação Nacional para a Conservação da Ariranha. I ICMBio - Instituto Chico Mendes Conservação da Biodiversidade. 2010;
41. Tirelli FP, Ramos Pereira MJ. Passado, presente e futuro da conservação de carnívoros no extremo sul do Brasil. *Rev BioDiverso.* 2021;1:45–66.
42. Gomes LDP, Caixeta FF, Rocha R, Castro DN De, Thomé GA, Ikaro R. Fauna run-over mitigation measures on Brazilian federal highway concessions. *Herigiana.* 2019;13(1):10–20.
43. Grilo C, Coimbra MR, Cerqueira RC, Barbosa P, Dornas RAP, Gonçalves LO, et al. BRAZIL ROAD-KILL: a data set of wildlife terrestrial vertebrate road-kills. *Ecology.* 2018;99(11):2625
-

ANEXO I - Protocolo de Procedimento para Coleta de Fezes em Cativeiro.

Material

Todo o material necessário para coleta será enviado para a Instituição que realizará a coleta. O kit de coleta contará com:

- ♦ Três tubos Falcon (50 ml) para coleta de fezes de cada indivíduo com etiquetas padronizadas a serem preenchidas;
- ♦ Luvas descartáveis;
- ♦ Sílica gel;
- ♦ Espátula;
- ♦ Material complementar.

Recomendações

- ♦ Tome o máximo cuidado ao coletar amostras fecais para minimizar o risco de contaminação.
- ♦ Use luvas descartáveis em todos os momentos durante a coleta.
- ♦ Esterilize os instrumentos entre as coletas das amostras. É aconselhável o uso de álcool (etanol) para limpeza dos instrumentos.
- ♦ Use recipientes novos e limpos para o armazenamento de cada amostra fecal.
- ♦ Certifique que os indivíduos estão separados de outros de mesma espécie; já que garantir a coleta individual é fundamental.

Coleta

- ♦ A coleta deve ser realizada com uso de luvas descartáveis que devem ser trocadas a cada nova coleta.
- ♦ Se for necessário o uso de espátula para remoção das fezes, esterilize o material com álcool (etanol) a cada nova coleta.
- ♦ Não há horário preferencial para coleta de fezes em cativeiro, mas é recomendável que seja logo após a deposição das fezes no ambiente. Fezes muito antigas e ressecadas podem não ser passíveis de processamento posterior.

Quantidade

- Serão fornecidos três tubos Falcon de 50ml preenchidos parcialmente com esferas de sílica gel ou completamente vazios. Estes devem ser complementados até seu volume total com a amostra fecal individual coletada.
- Para cada indivíduo serão coletados três tubos de amostras. É imprescindível que cada uma das três amostras seja coletada em dias diferentes, totalizando assim, três dias de coleta para cada indivíduo.

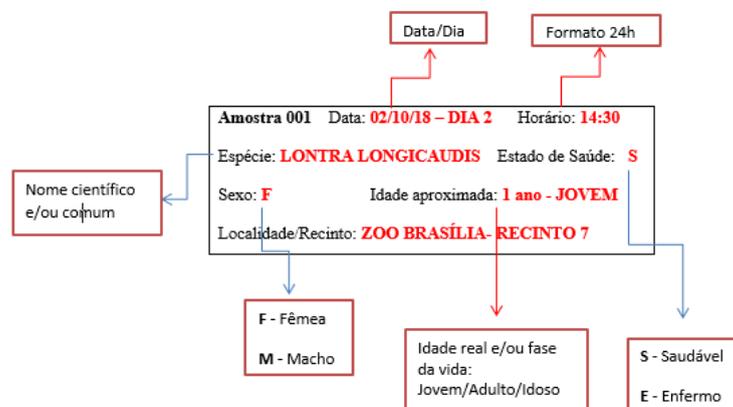
Dados

Todos os dados faltantes nas etiquetas de coleta devem ser preenchidos.

Condições do animal

- Não é necessário que os animais estejam em jejum ou sem hidratação.
- Em caso de enfermidades, deverá ser informado conforme campo específico indicado na etiqueta de coleta.

Exemplo de etiqueta e preenchimento:



Armazenamento

- Os tubos devem ser acondicionados de volta em suas respectivas embalagens e congelados em freezer disponível até o despacho do material. Evitar incidência solar direta.

Para dúvidas e esclarecimentos, por favor entrar em contato.

CAPÍTULO 5 – Conclusão Geral



Figure 3 Resumo dos principais resultados encontrados ao longo deste projeto de pesquisa.

Em comparação com outras espécies de mamíferos como felinos e canídeos, o conhecimento sobre os mustelídeos neotropicais ainda permanece lacunoso. Desta forma, este projeto reuniu grande parte da literatura atualizada e disponível sobre as espécies foco, bem como buscou implementar metodologias para monitoramento do grupo e contribuir para o conhecimento da ecologia das espécies que ocorrem na Mata Atlântica. A partir das distintas abordagens concluímos que:

- A ecologia química é um campo promissor a ser investido nos estudos de ecologia e conservação dos mustelídeos, e de outros Carnívora, visto que metodologias químicas a partir de amostras não-invasivas foram úteis na distinção taxonômica e eventual monitoramento das espécies. No futuro, os perfis metabolômicos poderão auxiliar a revelar interações que orquestram a comunicação dos mustelídeos e outros mamíferos.

- Estudos de padrões espaciotemporais de mustelídeos podem revelar limites de persistência das suas populações e seus ajustes a distúrbios antrópicos. Contudo, os nossos resultados não evidenciaram alterações nos padrões de ocupação e no uso do tempo em resposta a variáveis antrópicas; recomendamos, assim, o uso de outras variáveis para além do uso da terra e de densidade humana em pesquisas futuras. Os mustelídeos parecem ser espécies com grande plasticidade ambiental; contudo, diante da desenfreada superexploração de recursos e degradação ambiental planetária, provavelmente também estarão em perigo no futuro próximo.

Os achados dessa Tese instigam perspectivas futuras para a investigação de diferentes aspectos ainda lacunosos da biologia do mustelídeos, tais como fisiologia, comunicação, monitoramento e respostas ambientais dessas espécies na região Neotropical. Os nossos resultados mostram ainda como estudos em ambientes impactados podem revelar mesopredadores como espécies de interesse, particularmente no sentido da preservação de funções ecológicas em ecossistemas modificados diante da crise ambiental global. Por fim, salientamos que ações que fortaleçam os elos entre a pesquisa científica, as autoridades ambientais e a sociedade são de extrema importância para a conservação dos mustelídeos e de toda a biodiversidade.

Supplementary Material 1 - Figure S1 Principal component analysis (PCA) of the fecal metabolome profiles of the five mustelids analyzed by LC-HRMS. Three major clusters are observed: 1 – tayra, 2 – otters and 3 – grisons. TA = Tayra (orange line); GG = Greater grison (blue squares); LG = Lesser grison (green lozenges); GO = Giant otter (black circles); and NO = Neotropical otter (purple triangles). QC (wine asterisk) represents the pooled quality control samples.

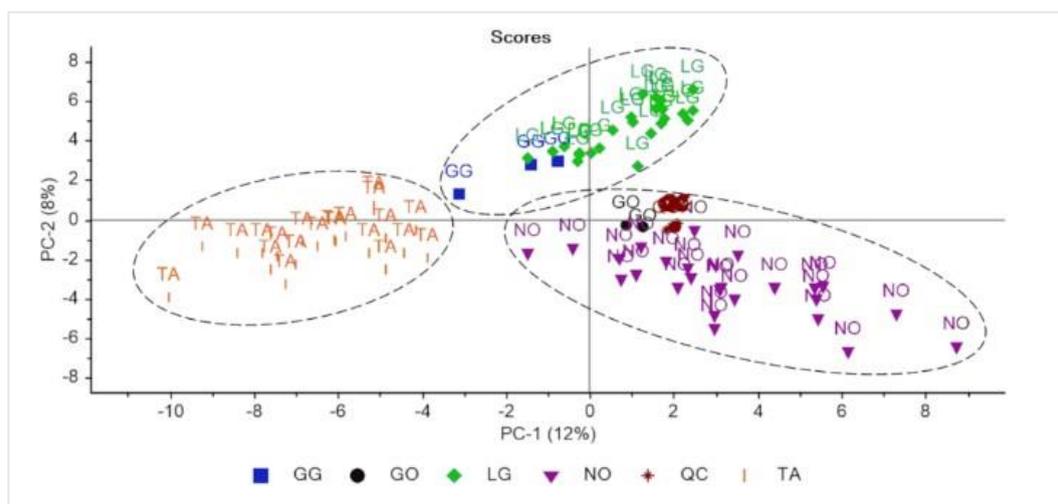
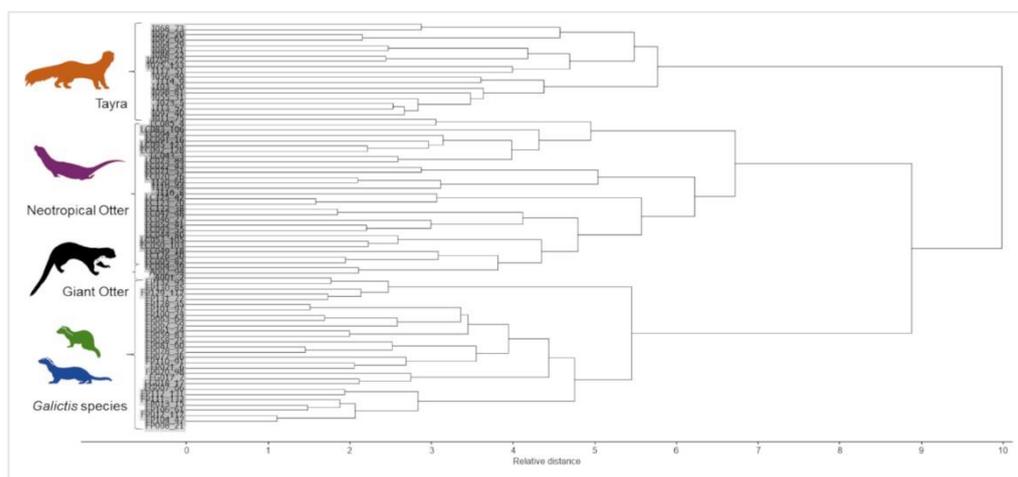


Figure S2 Hierarchical clustering of the chemical profiles from fecal samples of the five mustelids analyzed by LC-HRMS. Except for the *Galictis* species samples, all other samples were correctly grouped into species recognized a priori. Three major clusters are observed: 1 – tayras; 2 – otters and 3 – grisons. Color silhouettes represent neatly: Tayra (orange); Neotropical otter (purple); Giant otter (black); Greater grison (blue) and Lesser grison (green). Among the *Galictis* species, the first silhouette corresponds to Lesser grison and the second to Greater grison.



MATERIAL SUPPLEMENTAR 2 – Disponível na planilha Excel anexada e enviada junto ao documento de Tese.

Dataset DS1 - Details of the 218 chemical compounds.

Dataset DS2 – SIMPER results.