

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**Monitoramento de espécie guarda-chuva *Puma
concolor* (Felidae – Mammalia: Carnivora)
empregando amostras não invasivas**

RENATO MARCELO FERREIRA DE SOUZA

**Botucatu, SP
Setembro de 2018**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**Monitoramento de espécie guarda-chuva *Puma concolor* (Felidae – Mammalia: Carnivora)
empregando amostras não invasivas**

RENATO MARCELO FERREIRA DE SOUZA

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Animais Selvagens para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Adjunta Lúgia Souza Lima Silveira da Mota.

Co-orientadora: Profa. Assistente Renata Cristina Batista Fonseca

**Botucatu, SP
Setembro de 2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Souza, Renato Marcelo Ferreira de.

Monitoramento de espécie guarda-chuva *Puma concolor*
(Felidae - Mammalia: Carnivora) empregando amostras não
invasivas / Renato Marcelo Ferreira de Souza. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia

Orientador: Lígia Souza Lima Silveira da Mota

Coorientador: Renata Cristina Batista Fonseca

Capes: 20406010

1. DNA - Análise. 2. Felídeo. 3. Puma. 4. Fezes - Análise.
5. Animais selvagens.

Palavras-chave: extração de DNA; felino; fezes; onça-parda.

Nome do autor: **Renato Marcelo Ferreira de Souza**

TÍTULO: Monitoramento de espécie guarda-chuva *Puma concolor* (Felidae – Mammalia: Carnivora) empregando amostras não invasivas

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Adjunta Lígia Souza Lima Silveira da Mota.

Orientadora

Departamento de Genética

Instituto de Biociências – UNESP – BOTUCATU

Prof. Adjunto Dr. Vidal Haddad Junior

Departamento de Dermatologia

FMB – UNESP – Botucatu

Dr. Caio Henrique Paganini Burini

Médico Veterinário Autônomo

Data da Defesa: 01 de outubro de 2018

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, sem ele nada do que vivemos seria possível. Mas o que é Deus? O significado literal da palavra Deus é origem, tudo que aconteceu até o presente é uma dádiva da sua origem, portanto agradeço sempre o dia de hoje, pois somos fruto de todos os acontecimentos passados, somos fruto de uma mistura da nossa genealogia com os eventos estocásticos do ambiente, sou grato a minha origem como um todo! Saibam que todos que passaram na minha vida me moldaram para ser o que eu sou hoje, Obrigado a todos que passaram pela minha vida sou grato por cada um de vocês.

Minha Origem: Pai e Mãe eu tenho uma coisa muito importante para lhes dizer, vocês são meus heróis! Obrigado por serem uma base sólida na minha vida, vocês sempre serão um modelo de Amor, Força, Inteligência e Justiça. Obrigado por me ensinarem a ter valores! Nunca apagaram meus sonhos, sempre me incentivando e deixando eu trilhar meu próprio caminho! Anna e Drika obrigado por me apoiarem e sempre me enxergarem de um jeito melhor que me enxergo! Ao restante da minha família saibam que vocês estão e sempre estarão presentes nos meus pensamentos todos os dias! Amo vocês!

Anna: "Eu sei que você é capaz"

Drika: "Você é um guerreiro! Ir morar longe é verdadeiramente difícil"

Obrigado a toda minha família, amigos e colegas, sem a ajuda de vocês este sonho nunca se tornaria realidade.

Origem do saber: Eu sempre fui um sonhador, quando era criança lembro-me de querer um terreno, sonhava em soltar animais lá, não entendia o real significado desse sonho, quando estava na faculdade conheci Karen minha digníssima onça que habita a floresta densa que chamo de Lar, em uma das nossas conversas sobre sonhos ela me questionou "por que você não faz isso na faculdade"? E aqui estou hoje lutando pela conservação na faculdade. Karen, muito mais do que companheira de vida, você me ensina como ser melhor dia a

dia, obrigado pela sua paciência e sua perseverança, obrigado pela Maya, obrigado por ser minha companheira. Amo você KR418.

A origem da ciência: Sabe aquelas coisas que fazem nós pensarmos que nada acontece por acaso? Sou um entusiasta quando se trata de vida, faço da minha um álbum de sonhos e, sonho a sonho, vou preenchendo-o, já trabalhei com serpentes, aranhas, escorpiões, alguns animais domésticos, mas os felinos realmente fizeram meus olhos brilharem. Quando li a primeira matéria que falava sobre a pós-graduação de animais selvagens, confesso que fiquei obcecado, foi ai que entrou na minha vida uma pessoa que além de muito parecida comigo (multitarefa) tem um pique invejável, Professora Ligia tem uma influência inimaginável na minha vida, é um modelo de profissional, se dedica a todas as coisas que faz com afinco e determinação, confio plenamente no trabalho dela e agradeço muito a oportunidade de aprender o que é realmente ciência, com ela. Profa., obrigado pela oportunidade. Um agradecimento especial também as Professoras Renata e Adriane que contribuíram com o meu caminhar na pós graduação.

Renato também é Origem: Meu obrigado especial vai para minha filha Maya Lis, obrigado por escolher minha casa para nascer, você é um anjo que impulsionou minha vida às estrelas, você é a chegada da primavera, obrigado por grunir para mim quando falo papai, até você já entende que é filha do Renato Selvagem!

Um agradecimento Selvagem a todos os colegas que me ajudaram com palavras e atitudes durante toda minha vida de Mestrando! Vitor, Diogo, Camila, Gysele, Daniel, Talita, Bruna, Bianca, Wal, Marcelo, Dada, Aninha, Rafael, Juan, Mariana, Peu, Marina, Lais, Jack, Alícia entre muitos outros que me fizeram enxergar que minha loucura não é solitária!

Obrigado aos alunos do Curso de Férias, quanto aprendizado! Sem vocês eu não estaria completo! Em especial meu amigo João, você me mostrou que mesmo sendo um entre muitos, alguém sempre estará te observando!

Virungárdia: André, Amanda, Bruna, obrigado por sonharem comigo e muito além disso, sonharem que poderíamos crescer lado a lado, nenhum a frente e nenhum atrás, mas todos juntos - o espírito de unidade transforma ideias em fatos!

Sumário

Lista de Tabelas e Figuras	vi
Resumo	1
Abstract	2
1 INTRODUÇÃO	3
2 OBJETIVOS	6
2 REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1 A espécie <i>Puma concolor</i>	7
3.2 Conservação e o <i>Puma concolor</i>	9
3.3 <i>Puma concolor</i> e o Homem.....	11
3.4 Região estudada.....	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Obtenção de material biológico.....	17
4.2 Extração de DNA.....	18
5 RESULTADOS	19
6 DISCUSSÃO	25
7 CONCLUSÕES	28
8 REFERÊNCIAS	30
9 TRABALHO CIÊNTIFICO	35
10 ANEXOS	49

Lista de tabelas e figuras

Tabela. Quantificação de DNA das amostras.....	23
Figura 1. Mapa de ocorrência.....	8
Figura 2. Trilhas percorridas.....	17
Figura 3. Georreferenciamento das amostras.....	18
Figura 4. Número de amostras coletadas.....	19
Figura 5. Localização das amostras.....	20
Figura 6. Amostras de fezes.....	21
Figura 7. Amostras 17 e 31.....	22
Figura 8. Eletroforese.....	24

Souza, R.M.F. Monitoramento de espécie guarda-chuva *Puma concolor* (Felidae – Mammalia: Carnivora) empregando amostras não invasivas Botucatu, 2018. 50p. Dissertação (Mestrado em Animais Selvagens – Clínica, Conservação e preservação) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O Brasil é um país megadiverso detentor de grande parte da riqueza ecológica do mundo, porém seus biomas, importantes devido aos serviços ecossistêmicos, sofrem com a pressão antrópica. Assim, os grandes predadores, que possuem efeito regulatório no ecossistema, geram conflitos direto com o homem. O *Puma concolor* é um predador generalista, atuando no perfil trófico onde reside. Estudos de populações *in situ* são importantes na elaboração de planos de manejo e a utilização de amostras não invasivas nos permitem ter acesso a informações biológicas a baixo custo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de amostras não invasivas para contribuir com informações nos planos conservacionistas da região. Foram percorridas bordas de mata e áreas de transição da APA-Botucatu. As amostras de fezes encontradas foram georreferenciadas, coletadas, selecionadas, fotografadas, classificadas e seu DNA extraído por meio da técnica empregando fenol/clorofórmio. O DNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro e sua qualidade avaliada em eletroforese. Trinta e cinco amostras foram classificadas quanto ao seu grau de degradação, submetidas à extração de DNA e seu produto avaliado. A presença de material genético nas fezes frescas ou pouco degradadas apresentaram maiores concentrações de DNA além de melhor qualidade quando comparadas com as mais degradadas. Estes resultados evidenciam que, o DNA obtido empregando metodologia de baixo custo, possui quantidade e qualidade suficientes para seu emprego em técnicas de biologia molecular com a acurácia necessária. Além disso, este material biológico pode responder diversas questões biológicas tais como ecologia trófica, parasitismo, comportamento territorial, entre outros.

Palavras-chave: felino; fezes; onça-parda; extração de DNA

Souza, R.M.F. Monitoring of umbrella species *Puma concolor* (Felidae – Mammalia: Carnivora) using non-invasive samples. Botucatu, 2018. 50p. Dissertação (Mestrado em Animais Selvagens – Clínica, Conservação e preservação) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Brazil is a highly diverse country that holds a significant part of the world's ecological wealth. However, its biomes, important due to its role in the ecosystemic services, suffer from anthropic pressure. Therefore, large predators, that have regulatory effect on the ecosystem, generate direct conflicts with humans. The *Puma concolor* is a large generalist predator that acts on the trophic profile where it lives. Populational studies in situ are important for the elaboration of management plans and the use of non-invasive samples allow us to have access to biological informations at a low cost. This project aimed to evaluate the use of non-invasive samples in conservationist plans of the region. Transitioning areas and edges of Forrest were analysed and samples of faeces were collected, selected, geo-referenced, photographed and classified. The DNA was extracted using phenol/chloroform and quantified with spectrophotometer and its quality was analysed through electrophoresis. 35 samples were classified regarding the degradation level, submitted to DNA extractions and its product evaluated. The presence of genetic material in the fresh faeces or low degraded showed higher concentrations of DNA and better quality of this material in comparison to the higher degraded samples. This results show that the DNA obtained through a non-invasive method (low cost methodology) can provide enough quality and quantity for molecular biology analyses while also be used to answer other different biological issues, such as trophic chain, parasitism, territorial behaviour, among others. Making the use of this methodology financially viable for this type of study.

Keywords: feline; feces; cougar; DNA extraction

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Apenas 17 países, entre as duzentas nações do mundo, detêm em seus territórios cerca de 70% da biodiversidade, a riqueza natural do Planeta e, devido a isso, são chamados de países megadiversos. O Brasil, sendo o maior país tropical do mundo está entre eles, pois contém a maior quantidade de florestas intactas do Planeta, abrigando a maior biodiversidade, o que se traduz em mais de 20% do número total de espécies da Terra. Desta forma, os estudos conservacionistas nestes países são considerados cruciais para proteger a grande maioria das espécies de animais e plantas existentes na Terra. Atualmente, considera-se que o Brasil possua cerca de 10 a 20 % da biota mundial e 30% das florestas tropicais do mundo. Entretanto, biomas como a Mata Atlântica e o Cerrado são hoje classificados como *hotspots* de biodiversidade, pelo contraste entre sua riqueza natural e o alto grau de degradação sofrido historicamente (MYERS *et al.*, 2000). Ou seja, são consideradas áreas de relevância ecológica.

Todos os biomas brasileiros sofrem com a fragmentação de habitats, porém é na Mata Atlântica que a situação se encontra mais crítica. As espécies remanescentes estão confinadas a pequenos fragmentos, restando apenas cerca de 8% de cobertura vegetal nativa e onde a maior parte dos fragmentos possui menos de 100 hectares (GANEM *et al.*, 2011). A Mata Atlântica é de grande importância para o homem devido aos serviços ecossistêmicos promovidos como regulação do clima, fertilidade do solo, regulação do ciclo da água, controle de erosão entre outros (CLEC'H *et al.*, 2016).

Biodiversidade alta indica, no ecossistema, a presença de grandes predadores que, em conjunto com a pressão antrópica, vem promovendo um aumento nos conflitos entre animal e homem, como no caso de ataques a rebanhos por onça-pintada, ou ataques a galinheiros por lobo guará. Estes conflitos devem ser resolvidos com cautela buscando compreender a importância da espécie para o ecossistema bem como sua biologia e, a partir daí, obter estratégias para minimizar tais conflitos (MARCHINI *et al.*, 2011).

Além desses conflitos, os grandes predadores possuem função regulatória na distribuição dos herbívoros, ou seja, sua presença ou ausência pode modificar o perfil trófico da região, como no caso do parque de *Yellowstone*, onde a presença do homem levou à extinção dos grandes predadores presentes no local causando diversas mudanças no ecossistema e no comportamento dos cervídeos. Com a extinção local dos lobos e dos leões das montanhas, os cervos passaram a pastar com maior frequência nas planícies abertas de *Yellowstone*, com a reintrodução em 1995-1996 de alguns lobos cinzentos (*Canis lupus*). Estes cervídeos passaram a pastar em locais com vegetação mais densa para fugir dos lobos, modificando a conformação da paisagem, livrando as planícies da sobrepastagem e, conseqüentemente, as plantas forrageiras passaram a crescer nas planícies inserindo uma nova cadeia trófica nas planícies (RIPPLE; BESCHTA, 2003).

De acordo com o Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMBio, 2017), a família Felidae é representada por nove espécies no Brasil, *Phantera onca*, *Puma concolor*, *Puma yagouaroundi*, *Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii*, *Leopardus tigrinus*, *Leopardus guttulus*, *Leopardus geoffroyi* e *Leopardus colocolo*, sendo que sete delas se encontram em estado “vulnerável” pelo Ministério do Meio Ambiente e uma “em perigo” na escala de risco de extinção.

As atividades humanas são responsáveis pelo evento denominado “Sexta Extinção”, onde a razão da quantidade de espécies que está sendo extinta supera o surgimento de novas espécies durante um curto intervalo de tempo. A extinção é um evento natural do planeta Terra, assim como o surgimento de novas espécies, porém quando a razão entre surgimento de novas espécies e a de animais extintos é menor que um, significa que estamos diminuindo a quantidade de espécies no planeta, caracterizando assim uma era de extinção até que estes números se revertam (FRANKKHAM *et al.*, 2008).

Cada vez mais trabalhos envolvendo estudos demográficos de populações *in situ* estão elucidando a biologia das espécies como, por exemplo, no trabalho de SOUZA *et al.* (2017). Os autores utilizaram amostras de fezes encontradas na beira de rodovias para a realização de estudos genéticos envolvendo análises de biologia molecular. Desta forma, puderam identificar uma população de, no mínimo, três onças pintadas residindo na Serra do Mar no

Brasil, sendo duas fêmeas e um macho. Neste estudo, além de identificar a espécie presente na região, foi possível também sua quantificação, permitindo planos de manejo para a espécie. Outro exemplo deste tipo de análise foi realizado por MANNISE *et al.* (2018). Empregando marcadores moleculares para analisar amostras de fezes de lobos-guarás *in situ*, os autores obtiveram os graus de parentesco dos animais entre outras razões tais como, o grau de endogamia desta população.

Portanto, ferramentas moleculares visando o incremento de informações em prol da conservação vêm se tornando indispensáveis no delineamento de práticas de preservação e na colaboração com delineamentos de viabilidade de populações *in situ* (JOHNSON *et al.*, 2001). Importância essa corroborada em FURTADO *et al.* (2010) onde afirmaram que marcadores moleculares do tipo microssatélites são ideais quando se trata de caracterização genética dos eucariotos e estudos populacionais.

Exemplos de estudos moleculares na conservação de felinos são diversos e abordam muitas espécies tais como o guepardo (*Acinonyx jubatus*) em estudo realizado por Terrell *et al.* (2016), a onça pintada (*Panthera onca*) por Souza *et al.* (2017), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e o gato maracajá (*Leopardus wiedii*) por Adrados *et al.* (2018) e a onça parda (*Puma concolor*) por Palomares *et al.* (2017).

O monitoramento de populações naturais é uma das estratégias para se entender as correlações adaptativas do genótipo com o ambiente, sendo crucial para entender a diversidade e suas implicações ecológicas (TEMPLETON, 2011). Sendo a diversidade genética inversamente proporcional ao grau de endogamia, as populações altamente endogâmicas apresentam um menor valor adaptativo ao ambiente e este, por sua vez, é um processo dinâmico de contínua mudança. Logo, populações com alta variabilidade ou com baixo grau de endogamia, possuem em seu DNA uma alta variação nas sequências de nucleotídeos, levando a codificação de diferentes proteínas, podendo resultar em diferentes funções morfológicas, comportamentais e bioquímicas (FRANKHAM, 2008).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Esta pesquisa teve, por objetivo principal, contribuir com planos conservacionistas na área de animais selvagens fornecendo informações quanto ao uso de amostras não invasivas para a obtenção de dados da espécie.

Para tal, buscou-se:

- a) Avaliar o uso das fezes de felinos em práticas ecológicas;
- b) Avaliar trajetos para coleta do material biológico, utilizando pegadas como indicativo e bordas de mata;
- c) Verificar a qualidade e quantidade do DNA extraído, presente nas amostras de fezes, para uso futuro empregando técnicas de biologia molecular.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A espécie *Puma concolor*

Popularmente conhecida como puma, suçuarana, onça-vermelha, onça-vermelha-do-lombo-preto, leão baio, onça parda ou leão-da-montanha, a *Puma concolor* é a segunda maior espécie de felino no Brasil. Possui hábitos solitários e terrestres, apresentando predomínio de suas atividades no período noturno. Seu habitat é variado, incluindo florestas tropicais e subtropicais, caatinga, cerrado e pantanal.

A onça-parda, sendo um predador generalista, necessita de grandes áreas, geralmente maiores do que 100 km² (SWEANOR *et al.*, 2000) e, quando em forrageamento, podem viajar, em média, 9 km por noite (BEIER, 1993).

São animais que se dispersam por longas distâncias, até mesmo na presença de fragmentação de seu habitat (RUTH *et al.*, 1998). Também são animais territorialistas que têm como prática marcar seu território depositando pequenos volumes de fezes em locais proeminentes como trilhas, rochas ou ninhos já desocupados. Essa atividade se deve ao fato de que, quando defeca, a maioria dos carnívoros produz secreções odoríferas na glândula anal que aderem às fezes (CHAME, 2003). Uma vez que cada espécie produz um odor característico, a marcação territorial por meio das fezes permite que sejam reconhecidas informações interespecíficas de um território individual, sexo e estado reprodutivo, desempenhando importante papel na comunicação social desses animais (GORMAN; TROWBRIDGE, 1989).

A União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) diz que seu status na lista vermelha é de baixa preocupação no risco de extinção, porém, sua população vem diminuindo (NIELSEN, 2018) (Figura 1). Azevedo *et al.* (2013) afirmam que, apesar da grande extensão do território brasileiro, a espécie *Puma concolor* encontra-se em estado vulnerável com risco de diminuir seu número real em 10% nos próximos 21 anos (período referente a 3 gerações). Os autores afirmam também que a ocorrência desta espécie é escassa em determinadas regiões e, já extintas, em outras.



FIGURA 1: Mapa de ocorrência da espécie *Puma concolor*, sendo as áreas amarelas onde ainda existem ocorrências e em roxo onde existe a possibilidade de ocorrência. (IUCN)

A sub-espécie *Puma concolor* cougar já foi endêmica nos Estados Unidos, porém em 2011, a população do nordeste foi oficialmente declarada como extinta. Este animal extinto é, na região, o mascote oficial da Universidade Estadual da Pensilvânia sendo referido como Nittany Lion. Evanitsky *et al.* (2017) empregando os recentes avanços metodológicos na área de biologia molecular em amostras de peles preservadas oriundas de cinco indivíduos *Nittany Lion*, obtiveram sequências completas do genoma do DNA mitocondrial (DNAMt). Quando comparadas com as sequências já publicadas, os autores verificaram que os *Nittany Lions* não são mais semelhantes entre si do que quando comparados com indivíduos do oeste dos EUA e da Flórida. Apoiando achados anteriores, os pumas da América do Norte, em geral, possuem menor diversidade genética quando comparados com os da América do Sul. Este resultado ressalta a importância de programas de conservação contínua no oeste dos EUA e na Flórida no intuito de evitar novas extinções regionais.

3.2 Conservação e o *Puma concolor*

A Constituição Federal Brasileira, promulgada em 05 de outubro de 1988, Caput Art. 225 diz: “Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações” (BRASIL, 1988). Assim, fica claro que a responsabilidade de manter ou buscar este equilíbrio natural é de todos e que, somente o ser humano, é capaz de promover a coexistência harmoniosa entre os predadores em áreas de domínio privado ou de administração governamental. Além disso, a manutenção de populações viáveis desses mamíferos carnívoros está diretamente ligada a estabilidade dos ecossistemas (TERBORGH *et al.*, 1999). Desde que o ambiente onde vivam possua uma área de tamanho significativo para a sua sobrevivência, além de recursos alimentares disponíveis e baixa ou nenhuma influência antrópica, estes animais tendem a evitar qualquer contato com o homem e suas criações (CONOVER, 2002).

São Paulo é o estado mais desenvolvido do Brasil e, apesar das intensas mudanças no uso da terra, algumas espécies de mamíferos ainda habitam fragmentos remanescentes de vegetação nativa do estado. Analisando amostras fecais coletadas em áreas protegidas e não protegidas do estado de São Paulo, Giordano *et al.* (2018) investigaram a diversidade de presas, a amplitude de nicho trófico e a sobreposição de nicho trófico de três carnívoros: pumas, jaguatiricas e lobos-guará. Os resultados indicaram que as três espécies podem se adaptar aos ambientes modificados elucidando alguns de seus aspectos biológicos e ecológicos.

Gheller-Costa *et al.* (2018) analisaram a dieta de onça-parda em uma paisagem silvicultural do Estado de São Paulo buscando estabelecer um padrão na dieta da espécie bem como preferências com relação às presas consumidas. Os autores verificaram um grande consumo de aves e mamíferos de pequeno porte, diferindo da alimentação da espécie em ambientes naturais onde os mamíferos são os principais itens alimentares. A variação na dieta confirmou a onça-parda como um predador generalista, consumindo as presas disponíveis sem apresentar preferência por determinadas espécies.

Guarda *et al.* (2016) afirmaram que a alimentação dos pumas mudou drasticamente desde o século 15 citando, como exemplo, uma população no Chile de pumas dos andes, onde as lhamas foram substituídas por espécies exóticas de coelhos e lebres europeias os quais possuem um tamanho significativamente menor.

Soria-Diaz *et al.* (2017) estudaram, no México, a resposta funcional de pumas em um sistema de múltiplas espécies de presas e concluíram que esses carnívoros possuem grande plasticidade em seu padrão alimentar. Logo, esta espécie guarda-chuva, reduz a densidade de suas presas, sendo esta considerada uma associação negativa. Porém, Breviglieri *et al.* (2017), analisando 23 fragmentos florestais no estado de São Paulo além das correlações negativas encontradas: diminuição de 45% na diversidade de espécies-presas e de 11% na presença dos mesopredadores, também verificaram correlações positivas ou neutras mostrando que o puma atua de maneira sistêmica em seu ambiente. Estes resultados contribuem com novos conhecimentos sobre os efeitos da predação e das características do ambiente quanto a sua composição e comportamento das diferentes espécies.

Entre as razões para se conservar os carnívoros temos o fato de os mesmos ocupam o topo da pirâmide alimentar e, por conseguinte, são considerados como espécie bandeira e espécie guarda-chuva (DOBROVOLSKI *et al.*, 2013). Possuem grande importância ecológica, pois podem controlar a abundância, distribuição e diversidade das populações e de suas presas influenciando toda a dinâmica do ecossistema em que vivem. Nesse grupo, a onça-parda (*Puma concolor*) é a espécie de mamífero silvestre mais amplamente distribuída do hemisfério ocidental.

Portanto na ausência de predadores, todo ecossistema natural, como os mamíferos, herbívoros, roedores, aves, répteis e insetos, tende a se desequilibrar sendo que populações de algumas espécies podem crescer exponencialmente. E, este cenário de desequilíbrio ambiental, acarretam consideráveis prejuízos à agricultura e conseqüentemente, proporcionais perdas financeiras (LEITE-PITMAN e OLIVEIRA, 2002).

3.3 *Puma concolor e o Homem*

Há milhares de anos, o homem vive um dilema em sua existência: o de evitar confrontos com os predadores que ameaçam a sua sobrevivência. E, a partir do momento em que o homem começou a criar animais domésticos para consumo e trabalho, os conflitos se intensificaram (CAVALCANTI *et al.*, 2015). Seguindo padrões de colonização europeia, os fazendeiros e caçadores atuaram diretamente no número de predadores e suas presas além de fragmentar seu ambiente natural (EVANITSKY *et al.*, 2017).

Nas diversas culturas dos povos antigos de todo mundo, os grandes carnívoros assumiam vultosa importância, quase sempre associados a deuses supremos (KRUUK, 2002). Na América Latina, esse papel é desempenhado pelos grandes felinos, como pumas e jaguares (QUAMMEN, 2003). Sabe-se que guerreiros incas se vestiam de puma acreditando que isto lhes daria mais força e coragem para guerrear com as tribos adversárias (HORNOCKER e NEGRI, 2010).

Hoje, predadores encurralados fogem do ser humano, competindo por espaço, comida e liberdade (WOODROFFE *et al.*, 2007). E, desta forma, os predadores de topo de cadeia, não havendo ninguém acima deles em seu meio natural, hoje se encontram acuados devido à intolerância humana e aos conflitos que involuntariamente ou propositalmente provocam (WOODROFFE *et al.*, 2007). Um exemplo desta intolerância ocorreu na Califórnia, entre os anos de 1800 e 1900 onde dinheiro era oferecido para cada puma abatido (HORNOCKER e NEGRI, 2010).

Segundo Cavalcanti *et al.* (2015) o produtor rural vive num dilema entre abster-se de matar o predador evitando uma suposta perda financeira devido a pragas no futuro ou, a matar o predador evitando a perda financeira certa e imediata resultante da predação sobre os animais domésticos. E normalmente, o produtor rural tende a escolher a segunda opção.

Palmeira e Barrella (2007) entrevistaram duas comunidades quilombolas da Mata atlântica que sofriam com ataques aparentemente sazonais de seus rebanhos por onças pardas e pintadas. Os autores relataram uma visão bem negativa dessas populações em relação à presença dos predadores sendo que 54% sugeriram o extermínio. Mesmo tendo conhecimento de que é ilegal

matar carnívoros, essa prática ocorre em algumas áreas mais remotas do país bem como em áreas onde a fiscalização é precária ou inexistente. Este mesmo estudo revelou também que a população atribuía qualquer desaparecimento de animal doméstico a um ataque a onça pintada, porém mais de um terço desta população, desconhecia a existência da onça parda. A correta identificação do predador é um importante passo na determinação de métodos de controle adequados, pois os mesmos dependem das características e comportamento da espécie em questão.

Saber quais são as espécies existentes em uma determinada região é o ponto inicial para os estudos ecológicos e para o estabelecimento de projetos de conservação. Além disso, o levantamento da densidade populacional é a principal condição para trabalhar com seu manejo e assim, avaliar tendências dessa população e a efetividade de planos de conservação ou manejo em áreas protegidas, cuja função é manter populações viáveis da espécie estudada.

Nas florestas tropicais do México, Ávira-Nájera *et al.* (2018) estudaram como os pumas são afetados pelas mudanças ambientais. Os resultados indicaram que a vegetação e a água foram variáveis importantes para o puma, entretanto, as variáveis que determinaram e modificaram a presença das espécies foram os padrões de atividade dos co-predadores e as potenciais presas. Os fatores que afetaram negativamente a presença das espécies foram incêndio, presença humana e deslocamento de um habitat para outro menos favoráveis no intuito de evitar a onça-pintada.

Atualmente, temos disponível informações relevantes quanto aos aspectos biológicos e ecológicos dos dois maiores felinos do continente Americano, o puma (*Puma concolor*) e a onça-pintada (*Panthera onca*), consideradas espécies simpátricas porém, pouco se conhece a respeito do parasitismo e doenças infecciosas que ocorrem na população de vida livre. Solózano-García *et al.* (2017) apresentaram um levantamento coparasitológico de onças-pintadas e pumas oriundos de duas regiões diferentes de floresta tropical no México. Os autores identificaram 16 espécies diferentes de parasitas sendo 56% nematóides 167 amostras fecais. Os autores concluíram que as comunidades parasitárias de onça-pintada e onça-parda eram mais semelhantes entre as espécies hospedeiras no mesmo tipo de floresta do que entre os hospedeiros coespecíficos que habitam diferentes tipos de floresta.

Estudos adicionais são necessários para uma estimativa mais precisa da composição da comunidade parasitária destes felinos, e para uma melhor compreensão dos efeitos que a perturbação do habitat poderia ter sobre a ecologia e transmissão de doenças parasitárias, e suas consequências para a conservação de felinos selvagens.

Alibhai *et al.* (2017) descreveram uma técnica robusta na identificação individual e do sexo de pumas baseado em suas pegadas. Os autores empregaram uma coleção de 535 imagens padronizadas oriundas de 35 animais em cativeiro sendo 19 fêmeas (300 pegadas) e 16 machos (235 pegadas). Os dados gerenciados por este software são capazes de identificar com uma acurácia maior que 90% em relação aos indivíduos e em mais de 99% em relação ao sexo. Esta técnica aumenta, potencialmente, os métodos disponíveis para estudar os pumas e outros felídeos.

3.4 Região estudada

No estado de São Paulo, devido ao processo de devastação ocorrido em um ritmo sem precedentes ao longo dos anos, a cobertura vegetal foi amplamente convertida em pastagens agropastoris e em áreas industriais e urbanas. Originalmente, cerca de dois terços da área do estado eram cobertos por Floresta Estacional Semidecidual (bioma Mata Atlântica) e, o terço restante, por formações típicas do bioma Cerrado. De acordo com Machado *et al.* (2004). Apesar dos esforços recentes do ministério do meio ambiente ainda não foram suficientes para abrandar a situação do bioma Cerrado, este Bioma que foi sugerido pelo autor que se enquadrasse em situação crítica ou preocupante.

Atualmente temos preservados apenas cerca de 46% de Cerrado (MACHADO *et al.* 2004) e, das áreas originais da Mata Atlântica, 12,5% considerando os fragmentos menores de 100ha, ou 8,5%, desconsiderado-os (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2016). Além disso, os remanescentes estão sujeitos a intervenções e constantes ameaças, pois se encontram próximos de grandes centros urbanos ou estão isolados por pastagens, vastas plantações de laranja, cana-de-açúcar e reflorestamento com Pinus e eucalipto (MACHADO *et al.* 2004; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2016).

Destaca-se no estado de São Paulo, a região da Cuesta de Botucatu, área situada entre os rios Tietê e Paranapanema, abrangendo os municípios de São Manuel, Botucatu, Bofete, Pardinho, Itatinga, Angatuba, Torre de Pedra, Guareí, Avaré e Porangaba. A vida na região da Cuesta tem como base o ambiente que ora é composto pelo Cerrado, ora pela Mata Atlântica e ora pela mistura de ambos os biomas, conferindo uma alta biodiversidade e disponibilidade de recursos aos seres vivos.

Este ambiente é definido como ecótono, ou seja, onde os elementos de dois biomas se misturam (MILAN & MORO, 2016). Por esse motivo, a região da Cuesta pode determinar grande heterogeneidade de habitat, proporcionada pela confluência dos ecossistemas regionais. Essa característica oferece condições para o estabelecimento de inúmeras espécies, desde aquelas típicas do Cerrado, as típicas de Mata Atlântica e as espécies mais generalistas, ou seja, as que não são exigentes em relação ao ambiente em que vivem e que habitam ambos os biomas e suas variações.

Esta região de contato entre diferentes biomas confere alto valor para a conservação da biodiversidade. Porém o cenário atual de conservação desse ambiente é negativo. As taxas de cobertura de vegetação natural são baixas (KRONKA *et al.*, 2005) e os impactos gerados pelas atividades antrópicas ainda persistem e continuam a ameaçar os remanescentes de vegetação e toda importante biodiversidade associada (ORTEGA; ENGEL, 1992; CARREGA *et al.*, 2009). Apesar disso, constatamos que muitas espécies da fauna silvestre regional ainda estão presentes. Os mamíferos que compreendem desde os pequenos roedores até espécies de grande porte como a onça-parda, são encontrados em diversos ambientes da região (ALVES *et al.*, 2012), algumas espécies até dentro das cidades como muitos morcegos, roedores e marsupiais, como os gambás.

Podemos encontrar circulando pela região da Cuesta, espécies como os tamanduás, onças-pardas, jaguatiricas, lobos-guará, raposinhas, veados entre outros (ALVES *et al.*, 2012). Os primatas (macacos-prego, micos, bugios) e outras espécies arborícolas, como as preguiças e alguns pequenos marsupiais, são raros, pois dependem de um ambiente florestado, estando confinados aos fragmentos de floresta que restaram. A situação da fauna na região da Cuesta é delicada, pois várias espécies correm o risco de desaparecer

e as principais ameaças são a destruição e poluição de seus habitats (das florestas, banhados, cerrados), a caça (muito comum ainda na região), os atropelamentos e a introdução de espécies exóticas e doenças.

O governo, no âmbito estadual e federal, vem reconhecendo a importância do ambiente natural desta região e a necessidade da implantação de ações para sua conservação. Em 1983, aproximadamente 218.000 hectares desta área foram decretados como protegidos com a criação da Área de Proteção Ambiental Corumbataí, Botucatu e Tejupá, perímetro Botucatu (APA Botucatu) com a finalidade de resguardar entre outros, elementos considerados “significativos da flora e da fauna” (SÃO PAULO, 1983). O governo do Estado de São Paulo, subsidiado pelo trabalho coordenado pelo Programa Biota/Fapesp, também identificou esta região como prioritária para conservação com alta indicação para incremento da conectividade da paisagem e inventários biológicos.

Em uma análise preliminar observa-se que os principais desafios para a conservação da região são a proteção desses fragmentos, aumento da fiscalização ambiental e o incremento da permeabilidade da paisagem por meio da formação de corredores ecológicos. Tais desafios necessitam de mais informações para serem superados. A região, em termos territoriais, ainda carece de pesquisas ecológicas que subsidiem o monitoramento ambiental e a tomada de decisões pelos gestores e líderes da região. Daí destaca-se o importante papel da Universidade Estadual Paulista (Unesp) do Campus de Botucatu em assumir essa tarefa aproveitando os recursos humano, logístico e material já existentes como também a atuação e experiência dos pesquisadores que trabalham nesta área.

Inserida dentro da área de proteção ambiental (APA) de Botucatu, destaca-se a Fazenda Experimental Edgárdia, pertencente a Unesp, com aproximadamente 1.200 hectares. Na história mais recente, a fazenda passou por processos de ocupação típicos da região como cultivo de café e criação de gado e, ainda hoje, é possível encontrar vestígios dessas ocupações e resgatar a sua história. A Fazenda possui uma rede hídrica composta por quatro principais rios que nascem na frente da Cuesta e drenam para uma área de várzea no Rio Capivara, sendo que apenas um rio tem sua nascente fora dos limites da fazenda. Cinco fragmentos de vegetação natural ainda permanecem no interior

da fazenda, num total de aproximadamente 747 alqueires de mata nativa, localizados na área de transição entre os biomas Mata Atlântica e Cerrado. Desde 1978, a Fazenda Edgárdia sofreu uma regeneração significativa da vegetação natural, com ampliação e conexão dos fragmentos ali presentes principalmente em áreas caracterizadas como frente da Cuesta. O restante da área é utilizado para práticas agrícolas e pecuárias voltadas prioritariamente à pesquisa universitária (JORGE; SARTORI, 2002).

Griese e Fonseca (2014) relataram a importância desses fragmentos como refúgio da biodiversidade e comprovaram a extinção de algumas espécies de mamíferos silvestres na região como a onça pintada (*Phantera onca*), anta (*Tapirus terrestris*), ariranha (*Pteronura brasiliensis*) e o cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*). Neste estudo, animais exóticos entraram na lista de espécies presentes nesta área, sendo eles o rato-do-banhado (*Myocastor coypus*) e a lebre-européia (*Lepus europeus*). Alves *et al.* (2012) fizeram registros indiretos da presença de mamíferos por meio da análise de vestígios (pegadas e fezes) em trilhas pré-existentes, ao longo de um ano. Foram registrados um total de 18 espécies de mamíferos silvestres de médio e grande porte. Porém, os pesquisadores afirmaram ser necessário um esforço amostral maior, uma vez que as espécies apresentam diferentes capacidades de utilização dos ambientes.

Desta forma, conclui-se que muitos dos elementos naturais e antrópicos presentes na fazenda e seu entorno refletem a situação geral da região o que a torna um excelente local para pesquisas visando responder às questões já levantadas sobre a dinâmica desses ambientes e auxiliar a gestão ambiental tanto da Fazenda como da região.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi protocolado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Unesp – Campus de Botucatu sob a numeração: 118/2016, e aprovado no dia 08/07/2016. Para autorização das atividades com finalidades científicas, o projeto foi protocolado sob a numeração: 58409-1 emitido pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO no dia: 30/05/2017

4.1 Obtenção de material biológico

O período de coleta das amostras de fezes de onça-parda foi de agosto de 2016 até outubro de 2017 na APA da Fazenda Edgárdia - Unesp, situada no Município de Botucatu, São Paulo. Durante os primeiros seis meses, foram feitos estudos prévios para reconhecimento de todas trilhas, conforme apresentadas na figura 2. Nos primeiros meses, foi realizada uma triagem das várias trilhas identificando quais os melhores locais a percorrer principalmente nas áreas de transição de vegetação, estradas e trilhas.



FIGURA 2: Trilhas percorridas na Fazenda Experimental Edgardia, Botucatu, SP, sobre ortofoto gerada com base na fotografia aérea de 2018. 1 e 2- floresta; 3- transição floresta/cerradão; A- cultura de arroz;

No campo, as fezes foram supostamente depositadas por onças-pardas. As coletas foram realizadas caminhando oportunisticamente nas trilhas,

segundo pegadas no chão ou outras marcas de passagem do animal. As amostras de fezes coletadas foram identificadas baseando-se no padrão de morfologia característico para a espécie *Puma concolor*. Cada amostra recolhida foi georreferenciada, conforme ilustrado na figura 3 e as fezes acondicionadas em tubos de plástico estéril e armazenada em -20°C .

As extrações de DNA e respectivamente as avaliações de qualidade e quantidade do material obtido, foram desenvolvidas no Laboratório de Genética Animal do Departamento de Genética do Instituto de Biociências, Unesp, Campus de Botucatu.



FIGURA 3: Georreferenciamento no momento da coleta da amostra. Dados do GPS: $22^{\circ}40'07.2''$ em 27 de agosto de 2016.

4.2 Extração de DNA

A extração de DNA total foi realizada empregando fenol/clorofórmio, segundo protocolo descrito em Sambrook e Russel (2001). A quantidade e a qualidade do DNA foram avaliadas em espectrofotômetro (*Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific*), por meio de absorbância a 260-280 nm, e em gel de agarose 1,5%, corado com Gel Red (*Uniscience*) ($0,1\mu\text{L}/10\text{mL}$) imerso em tampão TAE 1X (Tris-Ácido acético-EDTA) e visualizados em digitalizador de imagens, sob luz ultravioleta.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Foi coletado um total de 44 amostras biológicas durante o período de coleta conforme ilustrado na figura 4.

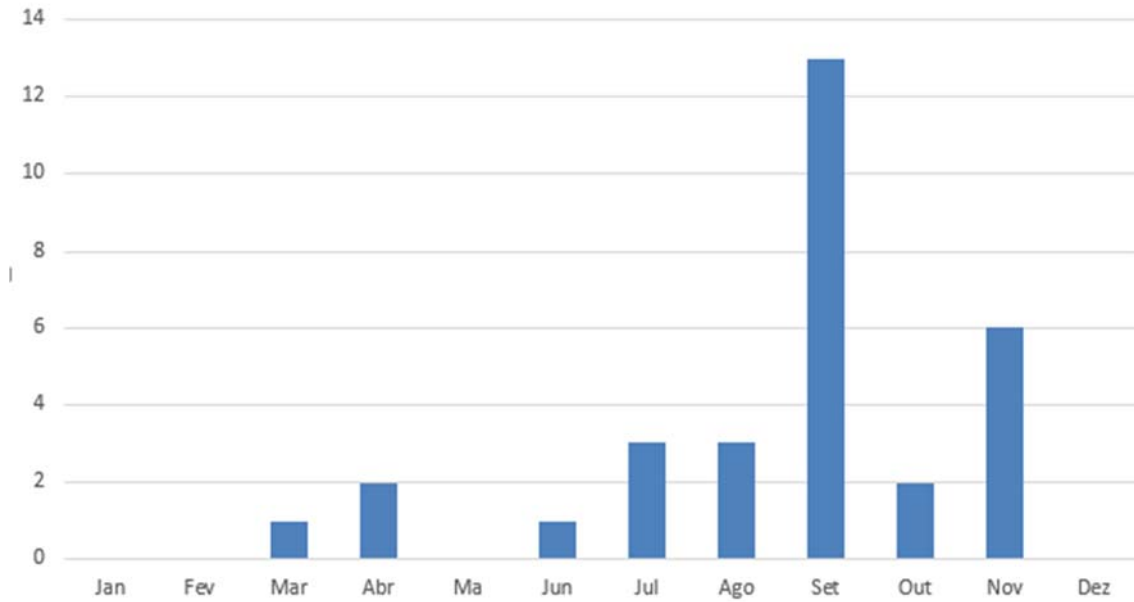


FIGURA 4: Número de amostras encontradas durante agosto de 2016 a outubro de 2017.

Abaixo, segue o mapa, da fazenda Experimental Edgárdia, contendo os dados de georreferenciamento das amostras coletadas:



FIGURA 5: Fazenda Experimental Edgárdia: identificação dos locais de coleta das amostras de fezes.

No local e após uma análise prévia de cada uma das amostras coletadas, nove delas foram excluídas conforme os critérios: ausência de pêlos, presença de sementes e/ou falta de informação de referência (figura 6).



FIGURA 6: À esquerda: amostra 17 de *Puma concolor* evidenciando a presença de pelos. À direita: amostra 31 – amostra descartada devido à presença de sementes e ausência de pelos.

Em algumas amostras, foi possível a identificação de ossos de presas, conforme exemplificado na figura 7.



FIGURA 7: Amostra de fezes de *Puma concolor* analisadas em laboratório. Em vermelho, destacam-se fragmentos de ossos de suas presas.

Na tabela 1 encontram-se os resultados obtidos em termos de concentração de DNA (ng/ μ l) e avaliação de sua qualidade por meio da análise de absorvância em espectrofotômetro, para cada uma das 35 amostras de DNA obtidas empregando a técnica de extração por fenol/clorofórmio.

TABELA: Descrição das 35 amostras quanto à concentração de DNA obtida e respectiva análise de absorvância.

Amostras	Concentração ng/μl	Absorvância 260/280μm
1	33,7	1,76
2	12,2	0,69
3	38,4	1,67
4	17,2	1,34
5	23,6	1,77
6	116,9	1,29
7	11,7	1,43
8	54,8	1,86
9	19,4	1,69
10	3,6	1,93
11	47,5	1,64
12	82,2	1,67
13	14,4	1,76
14	6,9	1,8
15	27,9	1,45
16	1,5	2,15
17	1	2,43
18	0,5	1,18
19	4	1,53
20	8,7	1,87
21	7,1	1,48
22	13,5	1,57
23	21,7	1,6
24	6,4	1,29
25	8,7	1,4
26	9,8	1,52
27	32,6	1,5
28	60,2	1,82
29	179,6	1,53
30	10,7	1,79
31	178,5	1,3
32	60,5	1,69
33	1,1	0,97
34	5,1	1,44
35	123,1	1,49

Todas as amostras foram analisadas visualmente e classificadas quanto ao seu grau de degradação em: (a) muito degradadas; (b) degradadas; (c) pouco degradadas ou (d) frescas. Posteriormente, realizou-se uma comparação relacionando o grau de degradação com a qualidade de DNA obtida por meio da análise em eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Gel Red (0,1µL/10mL) imerso em tampão TAE 1X e visualizados em digitalizador de imagens, sob luz ultravioleta conforme ilustrado na figura 8. A média da somatória das concentrações das amostras muito degradadas, degradadas, pouco degradadas e frescas deram respectivamente: 19,03 ng/µl; 16,86 ng/µl; 43,27 ng/µl; 70,78 ng/µl



FIGURA 8: Identificação das amostras segundo o seu grau de degradação: (A) muito degradadas; (B) degradadas; (C) pouco degradadas ou (D) frescas e respectivo resultado da eletroforese em gel de agarose a 1,5% evidenciando a qualidade e integridade do DNA obtido.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Um dos objetivos da biologia da conservação é o de possibilitar à sobrevivência, em longo prazo, das espécies e dos ecossistemas aos quais elas dependem (WAYNE e MORIN, 2004). Os mamíferos carnívoros são naturalmente inclinados a entrar em conflito com o homem porque suas extensas áreas de vida, seus requerimentos alimentares e comportamento predatório os colocam em competição com os humanos e podem representar ameaça à segurança física ou econômica da comunidade. Essas características reduzem à tolerância aos carnívoros de maneira geral, diminuindo assim o apoio à sua conservação.

Conservacionistas preocupados com os grandes felinos não podem simplesmente se restringir ao estudo da espécie com a qual trabalham isolando-as do contexto e não se envolvendo com os aspectos sócio-econômicos e políticos mais amplos ou, desta forma, sua pesquisa não irá representar a realidade a que estão expostos. O presente trabalho visou, levando-se em consideração o bem-estar animal, contribuir com informações que venham a se somar aos dados já existentes na literatura, de forma a ampliar o conhecimento ecológico sobre a região e a espécie *Puma concolor*.

Uma nova possibilidade de monitorar a demografia de espécies que são difíceis de serem observadas ou capturadas, como no caso da onça-parda, utiliza materiais orgânicos ou rastros por elas deixados. Sabe-se que, para se obter informações confiáveis do material genético de um animal, é necessário que as etapas que antecedem a amplificação (replicação *in vitro*) sejam rigorosas e livres de contaminação. Muitos são os métodos desenvolvidos para obtenção de DNA puro e integro sendo alguns baseados em kits comerciais de gastos relativamente elevados. Muitas são baseadas em kits comerciais, de gastos relativamente elevados. São escassos os estudos empregando métodos de extração de baixo custo, como a técnica de extração a partir do uso de fenol/clorofórmio utilizada neste estudo e também aplicáveis a amostras de material biológico obtidas por métodos não invasivos de coleta. Na maioria dos casos, as extrações de DNA envolvem amostras obtidas por métodos invasivos, que no caso de grandes animais, tornam a coleta uma tarefa difícil e demorada,

além de provocar estresse nos animais. Em virtude dessas desvantagens, métodos alternativos têm surgido com o intuito de tornar a obtenção das amostras um processo menos desgastante tanto para os animais quanto para os pesquisadores.

Amostras não invasivas de *Puma concolor*, tais como as fezes, são fontes confiáveis para o conhecimento biológico não só da espécie em questão, mas de toda sua cadeia alimentar, além de ser um método barato de monitoramento de espécies *in situ*.

Para combater o desafio de localizar tais tipos de amostras não invasivas, as etapas de levantamento e triagem das trilhas neste experimento foram de crucial importância. A detecção dos locais com grande quantidade de pegadas foi um indicativo de encontrar fezes possivelmente frescas. O resultado quanto ao número de amostras obtido mostrou que os locais escolhidos para patrulhamento foram eficazes visto que foram encontradas e coletadas 44 amostras de fezes. Correlacionando as coletas com a época do ano evidenciou-se que, entre os meses de julho a novembro, ocorreu uma maior atividade de demarcação territorial. Este fato sugere que este período possa indicar a estação reprodutiva da espécie. Quando correlacionamos o mesmo período com os dados de índice pluviométrico da região, observou-se que o maior número de amostras foi coletado nos meses secos sugerindo que, com a ocorrência de chuvas, ocorre a lavagem das fezes. Portanto, estudos comportamentais complementares de demarcação territorial devem ser realizados. Este estudo prévio demonstrou que é possível, com o patrulhamento das trilhas na APA da Fazenda Edgárdia, o levantamento de informações cruciais para a região da Cuesta de Botucatu. Porém, este deve ser um esforço contínuo de forma a compreender a dinâmica dos biomas Cerrado, Mata Atlântica e sua região de transição.

Assim, em estudos futuros, esforços amostrais devem ser conduzidos somente em determinados períodos do ano, ou seja, aqueles de baixa pluviosidade. Faz-se uma ressalva aqui quando os estudos a serem realizados envolvam aspectos comportamentais de demarcação de território dessa espécie.

As fezes coletadas apresentaram-se repletas de ossos, pelos e bicos. Este fato evidencia claramente a existência de algumas espécies que habitam a região, pois a onça-parda é um predador generalista e se alimenta de qualquer espécie que aumente sua densidade. Desta forma, esta espécie, exerce um controle do ecossistema e de suas pragas. Atualmente, devido à grande fragmentação de habitats, as populações selvagens estão ficando cada vez mais isoladas e, com o estudo a partir da análise das fezes, pode-se elucidar todo o complexo ecológico da região.

As amostras biológicas oriundas de felinos foram facilmente identificáveis, levando-se em consideração, além de sua morfologia, a presença de ossos e pelos emaranhados, devido ao seu comportamento de autolimpeza. Porém, quando nessas fezes, observávamos a presença de sementes, as mesmas foram descartadas considerando serem pertencentes a outra espécie, e não a estes carnívoros.

O resultado referente a quantificação do DNA obtido nas 35 amostras de fezes mostrou que em todas elas havia material, porém, sua concentração variou de 0,5 a 180 ng/ μ L. O DNA obtido das fezes é oriundo das células epiteliais descamadas durante a passagem pelo intestino (KOHN e WAYNE, 1997). Embora geralmente produzam quantidades pequenas de DNA, observou-se que tais as amostras não invasivas, podem ser usadas para a análise de variação genética individual como uma ferramenta poderosa para responder questões sobre a diversidade genética, parentesco e relações populacionais.

A qualidade das amostras tem um impacto direto na acurácia dos resultados a serem obtidos quando do emprego de técnicas de biologia molecular tais como amplificação por PCR e reações de sequenciamento. Quando consideramos a qualidade do DNA obtido, conforme ilustrado na figura 8, verificamos a presença de DNA mais íntegro nas amostras de fezes frescas ou pouco degradadas. Já, nas amostras classificadas como degradadas ou muito degradadas, verificamos a contaminação com RNA, uma vez que se detecta banda na parte inferior do gel de agarose.

Evidenciou-se nesta pesquisa que a qualidade do DNA obtido está diretamente relacionada com o grau de degradação das amostras encontradas. E assim, a obtenção de DNA a partir de fezes para posterior utilização em

metodologias de biologia molecular, é extremamente promissor para os estudos demográficos de populações *in situ*, devido a acessibilidade deste material biológico sem necessidade de captura do animal.

Os resultados obtidos vêm contribuir com planos de manejo da espécie escolhida e, devido à similaridade comportamental das espécies guarda-chuva, demais estudos com grandes felinos podem seguir modelos semelhantes empregando também amostras não invasivas. Além disso, técnicas mais acuradas de análise de pegadas como o uso de medidas em programas computacionais e o uso de armadilhas fotográficas, podem auxiliar no esclarecimento da dinâmica dessas comunidades em seu ecossistema.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos espera-se que esta pesquisa traga novos subsídios na utilização de amostras não invasivas e assim, venha a contribuir com planos de conservação tanto regionais como nacionais.

a) A escolha da espécie guarda-chuva, *Puma concolor*, demonstrou ser confiável devido ao seu efeito sistêmico no ecossistema no qual reside, além da demarcação de territórios, comportamento natural de muitos felinos, facilitando o acesso a coleta de amostras e posterior análises genéticas.

b) A estratégia de escolha dos trajetos a serem percorridos nas áreas de transição e bordas de mata pela presença de pegadas se mostrou altamente eficaz para encontrar fezes de *Puma concolor*.

c) A obtenção de DNA de qualidade a partir de amostras de fezes empregando a metodologia de fenol/clorofórmio se mostrou eficiente bem como uma alternativa de baixo custo.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

- Adrados B, Zanin M, Silveira L, Villalva P, Chávez C, Keller C, et al. Non-invasive genetic identification of two sympatric sister-species: ocelot (*Leopardus pardalis*) and margay (*L. wiedii*) in different biomes. *Conserv Genet Resour* [Internet]. 2013;5(3):1-15 [citado 15 Nov 2017]. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12686-018-0992-5>.
- Alibhai S, Jewell Z, Evans J. The challenge of monitoring elusive large carnivores: Na accurate and cost-effective tool to identify and sex pumas (*Puma concolor*) from footprints. *PLoS One*. 2017;12(3):p. e0172065.
- Alves TR, Fonseca RCB, Engel VL. Mamíferos de médio e grande porte e sua relação com o mosaico de habitats na cuesta de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Iheringia Ser Zool*. 2012;102(2):150-8.
- Ávira-Nájera DM, Chávez C, Pérez-Elizalde S. Ecology of *Puma concolor* (Carnivora: Felidae) in a mexican tropical forest: adaptation to environmental disturbances. *Rev Biol Trop*. 2018;66(1):78-90.
- Azevedo FC, Lemos FG, Almeida LB, Campos CB, Beisiegel BM, Paula RC, et al. Avaliação do risco de extinção da onça-parda, *Puma concolor* (Linnaeus, 1771) no Brasil. *Biodivers Bras* [Internet]. 2013;3(1):107-21 [citado 10 Out 2016]. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/revistaeletronica/index.php/BioBR/article/view/377/285>
- Beier P. Determining minimum habitat areas and habitat corridors for cougars. *Conserv Biol*. 1993;7(1):94-107.
- Brasil. Constituição (1988). Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília: Senado Federal/ Centro Gráfico; 1988.
- Breviglieri CPB, Laundré JW, Romero GQ. Effects of puma on the diversity and composition of neotropical mammals. *J Trop Ecol*. 2017;33:317-26.
- Carrega EFB, Campos S, Jorge LAB. Evolução do uso do solo e vegetação natural da bacia do Rio Capivara, Botucatu – SP. *Rev Energ Agricult*. 2009;24(1):35-48.
- Cavalcanti SMC, Paula RC, Brasília RLG. Conflitos com mamíferos carnívoros: uma referência para o manejo e a convivência Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio; 2015. 121 p.
- Chame M. Terrestrial mammal feces: a morphometric summary and description. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(1):71-94.
- Clec'h SL, Jégou N, Dufour S, Grimaldi M, Decaens T, Oszwald J, et al. Mapeando os serviços ecossistêmicos em um contexto de frente pioneira: uma

nova forma de interpretação dos territórios. Geofronter [Internet]. 2016;1(2):1-32 [citado 15 Mar 2018]. Disponível em: <https://periodicosonline.uems.br/index.php/GEOF/index>.

Conover MR. Resolving human - wild life conflict: the science of wildlife damage management. Cherril Hill: Lewis Publishers; 2002. 440 p.

Dobrovolski R, Loyola RD, Guilhaumon F, Gouveia SF, Diniz-Filho JAF. Global agricultural expansion and carnivore conservation biogeography. Biol Conserv. 2013;165:162-70.

Evanitsky MN, George RJ, Johnson S, Dowell S, Perry GH. Mitochondrial genomes of the regionally extinct Nittany Lion (*Puma concolor* from Pennsylvania). Biorxiv. nov. 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/214510>.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe D. Fundamentos de genética da conservação. Ribeirão Preto: SBG; 2008. v. 1, 259 p.

Fundação Sos Mata Atlântica. Relatório Anual 2016 [Internet]. São Paulo; 2016 [citado 23 Mar 2018]. Disponível em: https://www.sosma.org.br/wp-content/uploads/2013/05/AF_RASOSMA_2016_web.pdf.

Furtado EL, Basseto MA, Firmino AC, Cruz JCS, Kronka AZ. Principios básicos de biologia molecular. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais; 2010. p. 26-35.

Ganem RS, Drumond JA. Biologia da conservação: as bases científicas da proteção da biodiversidade. In: Ganem RS, organizadora. Conservação da biodiversidade: legislação e políticas públicas [Internet]. Brasília: Edições Câmara; 2010 [citado 14 Mar 2018]. p. 11-46. (Série Memória e análise de leis; 2). Disponível em: <http://bd.camara.gov.br/bd/handle/bdcamara/5444>.

Gheler-Costa C, Botero GP, Reia L, Gilli LC, Comin FH, Martins L. Ecologia trófica de onça-parda (*Puma concolor*) em paisagem agrícola verdade. Rama Rev Agron Meio Amb. 2018;11(1):203-25.

Giordano C, Lyra-Jorge MC, Miotto RA, Pivello VR. Food habits of three carnivores in a mosaic landscape of São Paulo state, Brazil. Eur J Wildl Res. 2018;64:15. doi: <https://doi.org/10.1007/s10344-018-1172-3>.

Gorman ML, Trowbridge BJ. The role odor in the social lives carnivores. In: Gittleman JL. Carnivore behavior, ecology and evolution. New York: Chapman & Hall; 1989. p. 57-88.

Griese J, Fonseca RCB. Guia de mamíferos silvestres de médio e grande porte da região da cuesta de Botucatu. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais; 2014.

Guarda N, Gálvez N, Osorio JLCM, Bonacic C. *Puma concolor* density estimation in the Mediterranean Andes of Chile. *Oryx*. 2016;51(2):263-7.

Hornocker M, Negri S. Cougar ecology & conservation. London: The University of Chicago Press; 2010.

Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMbio). Carnívoros brasileiros [Internet]. Brasília: Ministério do Meio Ambiente; 2017 [citado 7 Nov 2017]. Disponível em: <http://www4.icmbio.gov.br/cenap/carnivoros-brasileiros.html>

Johnson WE, Eizirick E, Roelke-Parker M, O'Brien SJ. Applications of genetics concepts and molecular methods to carnivore conservation. In: Gittleman JL, Funk SM, Macdonald D, Wayne RK, editors. Carnivore conservation. Cambridge: Cambridge University Press /The Zoological Society of London; 2001. p. 335-58.

Jorge LAB, Sartori MS. Uso do solo e análise temporal da ocorrência de vegetação natural na fazenda experimental edgardia, em Botucatu-SP. 2002 5:585-592.

Kohn M, Wayne RK. Facts from feces revisited. *Trends Ecol Evol*. 1997;12:223-27.

Kronka FJN, Nalon MA, Matsukuma CK, Kanashiro MM, Ywane MSS, Lima LMPR, Guillaumon JR, Barradas AMF, Pavão M, Manetti LA, Borgo SC. Monitoramento da vegetação natural e do reflorestamento no Estado de São Paulo. 2005.

Kruuk H. Hunter and hunted: relationship between carnivores and people. Cambridge: Cambridge University Press; 2002. 246 p.

Leite-Pitman MRP, Oliveira TG, De Paula RC, Indrusiak EC. Manual de identificação, prevenção e controle de predação por carnívoros. Brasília: Ibama; 2002.

Machado RB, Ramos Neto MB, Pereira PGP, Caldas EF, Gonçalves DA, Santos NS, et al. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Brasília: Conservação Internacional; 2004.

Mannise N, Trovati RG, Duarte JMB, Maldonado JE, González S. Using non-invasive genetic techniques to assist in maned wolf conservation in a remnant fragment of the Brazilian Cerrado. *Anim Biodivers Conserv* [Internet]. 2018;41(2):315-9 [12 Mar 2018]. Disponível em: http://abc.museucienciasjournals.cat/files/ABC_41-2_pp_315-319-color.pdf.

Marchini S, Paula RC, Cavalcante SMC. Predadores silvestres e animais domésticos: guia prático de convivência [Internet]. Brasília: Instituto Chico

Mendes de Conservação da Biodiversidade; 2011 [citado 3 Abr 2018]. v. 2, 45 p. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/cenap/carnivoros-brasileiros.html>.

Milan E, Moro RS. O conceito biogeográfico de ecótono. *Terr@Plural*. 2016;10(1):75-88.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Da Fonseca GAB, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 2000;403:853-8.

Nielsen C, Thompson D, Kelly M, Lopez-Gonzalez CA. *Puma concolor* (errata version published in 2016). In: The IUCN Red List of Threatened Species [Internet]. Cambridge: IUCN; 2015 [citado 3 Fev 2018]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T18868A50663436.en>

Ortega VR, Engel VL. Conservação da biodiversidade em remanescentes de mata atlântica na região de Botucatu, SP. *Rev Inst Florest*. 1992;4(3):834-52.

Palmeira FBL, Barrela W. Conflitos causados pela predação de rebanhos domésticos por grandes felinos em comunidades quilombolas na Mata Atlântica. *Biota Neotróp* [Internet]. 2007;7(1):119-28 [citado 20 Jul 2018]. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-06032007000100017

Palomares F, Agrados B, Zanin M, Silveira L, Keller C. A non-invasive faecal survey for the study of spatial ecology and kinship of solitary felids in the Viruá National Park, Amazon Basin. *Mamm Res* [Internet]. 2017;62(3):241-9 [14 Nov 2017]. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13364-017-0311-7#citeas>

Quammen D. *Monster of god: the man-eating predator in the jungles of history and the mind*. New York: W.W. Norton & Company Inc; 2003. 528 p.

Ripple WJ, Beschta RL. Wolf reintroduction, predation risk, and cottonwood recovery in Yellowstone National Park. *For Ecol Manage* [Internet]. 2003;184:299-313 [citado 8 Jan 2018]. Disponível em: <http://trophiccascades.forestry.oregonstate.edu/sites/trophic/files/ripple.pdf>.

Ruth TK, Logan KA, Sweanor L, Hornocker MG, Temple LJ. Evaluating cougar translocation in New Mexico. *J Wildl Manage*. 1988;62:1264-75.

Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3a ed. New York: Cold Spring HarborLaboratory Press; 2001.

São Paulo. Decreto n. 20.960, de 8 de junho de 1983. Declara área de proteção ambiental regiões situadas em diversos municípios, dentre os quais Corumbataí, Botucatu e Tejuapá. São Paulo; 1983.

Solózano-García B, White-Day JM, Gómez-Contreras M, Cristóbal-Azkárate J, Osorio-Sarabia D, Rodríguez-Luna E. Coprological survey of parasites of free-

ranging jaguar (*Panthera onca*) and puma (*Puma concolor*) inhabiting 2 types of tropical forest in Mexico. *Rev Mex Biodivers*. 2017;88(1):146-53.

Soria-Diaz L, Fower MS, Monroy-Vilchis O, Oro D. Funcional responses of cougars (*Puma concolor*) in a multiple prey-species system. *Integr Zool*. 2018;13:84-93.

Souza ASMC, Saranholi BH, Crawshaw PG, Paviolo AJ, Rampim LE, Sartorello L, et al. Re-discovering jaguar in remaining coastal Atlantic Forest in southeastern Brazil by non-invasive DNA analysis: redescobrimdo a onça-pintada em um remanescente de Mata Atlântica costeira no sudeste do Brasil por análise não-invasiva de DNA. *Biota Neotrop* [Internet]. 2017;17(2):e20170358 [citado 21 Nov 2017]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2017-0358>.

Sweaner LL, Logan KA, Hornocker MG. Cougar dispersal patterns, metapopulation dynamics, and conservation. *Conserv Biol*. 2000;14(3):798-808.

Templeton AR. Genética de populações e teoria microevolutiva. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética; 2011. v. 1, 705 p.

Terborgh J, Estes J, Paquet P, Ralls K, Boyd-Heger D, Miller B, et al. The role of top carnivores in regulating terrestrial ecosystems. In: Soulé ME, Terborgh J, editors. *Continental conservation: Scientific Foundations of Regional Reserve Networks*. Washington: Island Press; 1999. p. 60-103.

Terrell KA, Crosier AE, Wildt DE, O'Brien SJ, Anthony NM, Marker L, et al. Continued decline in genetic diversity among wild cheetahs (*Acinonyx jubatus*) without further loss of semen quality. *Biol Conserv* [Internet]. 2016;200(1):192-9 [citado 14 Ago 2017]. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.05.034>.

Wayne RK, Morin PA. Conservation genetics in the new molecular age. *Front Ecol Environ*. 2004;2(2):89-97.

Woodroffe R, Frank LG, Lindsey P, Ole Rannah S, Romanach S. Livestock husbandry as a tool for carnivore conservation in Africa's community Rangelands: a case control study. *Biodivers Conserv*. 2007;16(4):1245-60

TRABALHO CIENTÍFICO

Artigo a ser submetido no periódico:
“Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.”

Title page

Monitoramento de espécie guarda-chuva *Puma concolor* (Felidae – Mammalia: Carnivora) empregando amostras não invasivas

*[Monitoring of umbrella species *Puma concolor* (Felidae – Mammalia: Carnivora) using non-invasive samples]*

R.M.F. Souza ^{1*}, R.C.B. Fonseca ², L.S.L.S. Mota ³

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) do Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP)

² UNESP Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA) do Campus de Botucatu

³ UNESP Instituto de Biociências (IB) do Campus de Botucatu

*Autor para correspondência: zoo_renato@hotmail.com

1 *Manuscript*

2

3 **RESUMO**

4 O Brasil é um país megadiverso detentor de grande parte da riqueza ecológica do mundo,
5 porém seus biomas, importantes devido aos serviços ecossistêmicos, sofrem com a
6 pressão antrópica. Assim, os grandes predadores, como o *Puma concolor*, possuem efeito
7 regulatório no ecossistema. Estudos de populações *in situ* são importantes na elaboração
8 de planos de manejo e a utilização de amostras não invasivas, nos permitem ter acesso a
9 informações biológicas a um baixo custo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de
10 amostras não invasivas e, para tal, foram percorridas trilhas na APA-Corumbataí-Tejupá-
11 Botucatu. As amostras de fezes encontradas foram georreferenciadas, coletadas,
12 selecionadas, fotografadas, classificadas e seu DNA extraído por meio da técnica
13 empregando fenol/clorofórmio. O DNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro e
14 sua qualidade avaliada em gel de agarose a 1,5%. Todas as amostras foram analisadas
15 visualmente e classificadas em uma das 4 classes estabelecidas quanto ao seu grau de
16 degradação. As maiores concentrações de DNA bem como a obtenção de um material de
17 melhor qualidade foram obtidas nas fezes frescas ou pouco degradadas. Estes resultados
18 evidenciam que o DNA obtido possui quantidade e qualidade suficientes para seu
19 emprego em técnicas de biologia molecular e assim, a possibilidade de respostas para
20 diversas questões biológicas.

21 Palavras-chave: felino; fezes; onça-parda; extração de DNA

22

23 **ABSTRACT**

24 *Brazil is a highly diverse country that holds a significant part of the world's ecological*
25 *wealth. However, its biomes, important due to its role in the ecosystemic services, suffer*
26 *from anthropic pressure. Therefore, large predators have regulatory effect on the*
27 *ecosystem. The Puma concolor is a large generalist predator that acts on the trophic*
28 *profile where it lives. Populational studies in situ are important for the elaboration of*
29 *management plans and the use of non-invasive samples allow us to have access to*
30 *biological informations at a low cost. This project aimed to evaluate the use of non-*
31 *invasive samples in conservationist plans of the region. Transitioning areas and edges of*
32 *Forrest were analysed and samples of faeces were collected, selected, geo-referenced,*
33 *photographed and classified. The DNA was extracted using phenol/chloroform and*
34 *quantified and its quality was analysed through electrophoresis. the samples were*

35 *submitted to DNA extractions and its product evaluated. The presence of genetic material*
36 *in the fresh faeces or low degraded showed higher concentrations of DNA. This results*
37 *show that the DNA obtained through a non-invasive method (low cost methodology) can*
38 *provide enough quality and quantity for molecular biology analyses while also be used*
39 *to answer other different biological issues.*

40 *Keywords: feline; feces; cougar; DNA extraction*

41

42 **INTRODUÇÃO**

43 Popularmente conhecida como puma, suçuarana, onça-vermelha, onça-vermelha-do-
44 lombo-preto, leão baio, onça parda ou leão-da-montanha, a *Puma concolor* é a segunda
45 maior espécie de felino no Brasil. Possui hábitos solitários e terrestres, apresentando
46 predomínio de suas atividades no período noturno. Seu habitat é variado, incluindo
47 florestas tropicais e subtropicais, caatinga, cerrado e pantanal. São animais que se
48 dispersam por longas distâncias, até mesmo na presença de fragmentação de seu habitat
49 (Ruth *et al.*, 1998). Também são animais territorialistas que têm como prática marcar seu
50 território depositando pequenos volumes de fezes em locais proeminentes como trilhas,
51 rochas ou ninhos já desocupados. Essa atividade se deve ao fato de que, quando defeca,
52 a maioria dos carnívoros produz secreções odoríferas na glândula anal que aderem às
53 fezes (Chame, 2003). Uma vez que cada espécie produz um odor característico, a
54 marcação territorial por meio das fezes permite que sejam reconhecidas informações
55 interespecíficas de um território individual, sexo e estado reprodutivo, desempenhando
56 importante papel na comunicação social desses animais (Gorman e Trowbridge, 1989).
57 Soria-Diaz *et al.* (2017) estudaram, no México, a resposta funcional de pumas em um
58 sistema de múltiplas espécies de presas e concluíram que esses carnívoros possuem
59 grande plasticidade em seu padrão alimentar. Logo, esta espécie guarda-chuva, reduz a
60 densidade de suas presas, sendo esta considerada uma associação negativa. Porém,
61 Breviglieri *et al.* (2017), analisando 23 fragmentos florestais no estado de São Paulo além
62 das correlações negativas encontradas: diminuição de 45% na diversidade de espécies-
63 presas e de 11% na presença dos mesopredadores, também verificaram correlações
64 positivas ou neutras mostrando que o puma atua de maneira sistêmica em seu ambiente.
65 Estes resultados contribuem com novos conhecimentos sobre os efeitos da predação e das
66 características do ambiente quanto a sua composição e comportamento das diferentes
67 espécies.

68 Entre as razões para se conservar os carnívoros, temos o fato de os mesmos ocupam o
69 topo da pirâmide alimentar e, por conseguinte, são considerados como espécie bandeira
70 e espécie guarda-chuva (Dobrovolski *et al.*, 2013). Possuem grande importância
71 ecológica, pois podem controlar a abundância, distribuição e diversidade das populações
72 e de suas presas influenciando toda a dinâmica do ecossistema em que vivem. Nesse
73 grupo, a onça-parda (*Puma concolor*) é a espécie de mamífero silvestre mais amplamente
74 distribuída do hemisfério ocidental.

75 Portanto na ausência de predadores, todo ecossistema natural como os mamíferos,
76 herbívoros, roedores, aves, répteis e insetos, tende a se desequilibrar sendo que
77 populações de algumas espécies podem crescer exponencialmente. E este cenário de
78 desequilíbrio ambiental, acarreta em consideráveis prejuízos à agricultura e
79 consequentemente, proporcionais perdas financeiras (Leite-Pitman e Oliveira, 2002).

80 Saber quais são as espécies existentes em uma determinada região é o ponto inicial para
81 os estudos ecológicos e para o estabelecimento de projetos de conservação. Além disso,
82 o levantamento da densidade populacional é a principal condição para trabalhar com seu
83 manejo e assim, avaliar tendências dessa população e a efetividade de planos de
84 conservação ou manejo em áreas protegidas, cuja função é manter populações viáveis da
85 espécie estudada.

86 No estado de São Paulo, devido ao processo de devastação ocorrido em um ritmo sem
87 precedentes ao longo dos anos, a cobertura vegetal foi amplamente convertida em
88 pastagens agropastoris e em áreas industriais e urbanas. Originalmente, cerca de dois
89 terços da área do estado eram cobertos por Floresta Estacional Semidecidual (bioma Mata
90 Atlântica) e, o terço restante, por formações típicas do bioma Cerrado. De acordo com
91 Machado *et al.* (2004) Apesar dos esforços recentes do ministério do meio ambiente, eles
92 ainda não foram suficientes para abrandar a situação do bioma Cerrado. foi sugerido pelo
93 autor que este bioma se enquadrasse em situação crítica ou preocupante.

94 Atualmente temos preservados apenas cerca de 46% de Cerrado (Machado *et al.* 2004) e,
95 de vegetações originais da Mata Atlântica, 12,5% considerando os fragmentos menores
96 de 100ha, ou 8,5% desconsiderando-os (Fundação SOS Mata Atlântica, 2016) Além
97 disso, os remanescentes estão sujeitos a intervenções e constantes ameaças, pois
98 encontram-se próximos de grandes centros urbanos ou estão isolados por pastagens,
99 vastas plantações de laranja, cana-de-açúcar e reflorestamento com Pinus e Eucalipt
100 o(Machado *et al.* 2004; Fundação SOS Mata Atlântica, 2016).

101 No estado de São Paulo, a região da Cuesta de Botucatu é uma área situada entre os rios
102 Tietê e Paranapanema, abrangendo os municípios de São Manuel, Botucatu, Bofete,
103 Pardinho, Itatinga, Angatuba, Torre de Pedra, Guareí, Avaré e Porangaba. A vida na
104 região da Cuesta tem como base o ambiente que é composto tanto pelo Cerrado, quanto
105 pela Mata Atlântica e, também, pela mistura de ambos os biomas, o chamado ecótono
106 (Milan & Moro, 2016), conferindo uma alta biodiversidade e disponibilidade de recursos
107 aos seres vivos. Portanto a região da Cuesta possui grande heterogeneidade de habitat,
108 proporcionada pela confluência dos ecossistemas regionais. Essa característica oferece
109 condições para o estabelecimento de inúmeras espécies, desde aquelas típicas do Cerrado,
110 às típicas de Mata Atlântica e as espécies mais generalistas, ou seja, as que não são
111 exigentes em relação ao ambiente em que vivem e que habitam ambos os biomas e suas
112 variações.

113 Em uma análise preliminar observa-se que os principais desafios para a conservação da
114 região são a proteção desses fragmentos, aumento da fiscalização ambiental e o
115 incremento da permeabilidade da paisagem por meio da formação de corredores
116 ecológicos. Tais desafios necessitam de mais informações para serem superados. A
117 região, em termos territoriais, ainda carece de pesquisas ecológicas que subsidiem o
118 monitoramento ambiental e a tomada de decisões pelos gestores e líderes da região. A
119 partir disso, destaca-se o importante papel da Universidade Estadual Paulista (Unesp) do
120 Campus de Botucatu em assumir essa tarefa aproveitando os recursos humano, logístico
121 e material já existentes, como também a atuação e experiência dos pesquisadores que
122 trabalham nesta área.

123 Inserida dentro da área de preservação ambiental (APA) de Botucatu, destaca-se a
124 Fazenda Experimental Edgárdia, pertencente a Unesp, com aproximadamente 1.200
125 hectares. Na história mais recente, a fazenda passou por processos de ocupação típicos da
126 região como cultivo de café e criação de gado e, ainda hoje, é possível encontrar vestígios
127 dessas ocupações e resgatar a sua história. A Fazenda possui uma rede hídrica composta
128 por quatro principais rios que nascem na frente da Cuesta e drenam para uma área de
129 várzea no Rio Capivara, sendo que apenas um rio tem sua nascente fora dos limites da
130 fazenda. Cinco fragmentos de vegetação natural ainda permanecem no interior da
131 fazenda, num total de aproximadamente 747 alqueires de mata nativa, localizados na área
132 de transição entre os biomas Mata Atlântica e Cerrado. Desde 1978, a Fazenda Edgárdia
133 sofreu uma regeneração significativa da vegetação natural, com ampliação e conexão dos
134 fragmentos ali presentes, principalmente em áreas caracterizadas como “frente da

135 Cuesta”. O restante da área é utilizado para práticas agrícolas e pecuárias voltadas
136 prioritariamente às pesquisas universitárias (Jorge e Sartori, 2002).

137 Griese e Fonseca (2014) relataram a importância desses fragmentos como refúgio da
138 biodiversidade e comprovaram a extinção de algumas espécies de mamíferos silvestres
139 na região como a onça pintada (*Panthera onca*), anta (*Tapirus terrestris*), ariranha
140 (*Pteronura brasiliensis*) e o cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*). Neste estudo,
141 animais exóticos entraram na lista de espécies presentes nesta área, sendo eles o rato-do-
142 banhado (*Myocastor coypus*) e a lebre-européia (*Lepus europeus*). Alves *et al.* (2012)
143 fizeram registros indiretos da presença de mamíferos por meio da análise de vestígios
144 (pegadas e fezes) em trilhas pré-existentes, ao longo de um ano. Foram registrados um
145 total de 18 espécies de mamíferos silvestres de médio e grande porte. Porém, os
146 pesquisadores afirmaram ser necessário um esforço amostral maior, uma vez que as
147 espécies apresentam diferentes capacidades de utilização dos ambientes.

148 Desta forma, considera-se que muitos dos elementos naturais e antrópicos presentes na
149 fazenda e seu entorno refletem a situação geral da região, o que a torna um excelente local
150 para pesquisas visando responder às questões já levantadas sobre a dinâmica desses
151 ambientes, e que poderiam auxiliar na gestão ambiental tanto da Fazenda como da região.

152

153 MATERIAL E MÉTODOS

154 Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da
155 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Unesp – Campus de Botucatu
156 , sob o protocolo de número 118/2016, na data 08/07/2016. Para autorização das
157 atividades com finalidade científica, o projeto foi protocolado sob a numeração 58409-1,
158 emitido pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO no dia
159 30/05/2017.

160 O período de coleta das amostras de fezes de onça-parda foi de agosto de 2016 até outubro
161 de 2017, na APA da Fazenda Edgárdia - Unesp, situada no Município de Botucatu, São
162 Paulo. Durante os primeiros seis meses, foram feitos estudos prévios para reconhecimento
163 de todas trilhas, conforme apresentadas na Fig. 1. Além disso, foi realizada uma triagem
164 das várias trilhas identificando quais os melhores locais a percorrer, principalmente nas
165 áreas de transição de vegetação, estradas e trilhas.



166

167 Figura 1.: Trilhas percorridas na Fazenda Experimental Edgardia, Botucatu, SP, sobre
 168 ortofoto gerada com base na fotografia aérea de 2018. 1 e 2- floresta; 3- transição
 169 floresta/cerradão; A- cultura de arroz;

170

171 No campo, as fezes foram supostamente depositadas por onças-pardas. As coletas foram
 172 realizadas caminhando oportunisticamente nas trilhas, seguindo pegadas no chão ou
 173 outras marcas de passagem do animal. As amostras de fezes coletadas foram identificadas
 174 baseando-se no padrão de morfologia característico para a espécie *Puma concolor*. Cada
 175 amostra recolhida foi georreferenciada, conforme ilustrado na Fig. 2 e as fezes
 176 acondicionadas em tubos de plástico estéril e armazenada em temperatura de -20°C .

177 As extrações de DNA e as avaliações de qualidade e quantidade do material obtido, foram
 178 desenvolvidas no Laboratório de Genética Animal do Departamento de Genética do
 179 Instituto de Biociências, Unesp, Campus de Botucatu.



180

181 Figura 2.: Georreferenciamento no momento da coleta da amostra. Dados do GPS:
 182 $22^{\circ}40'07.2''$ em 27 de agosto de 2016.

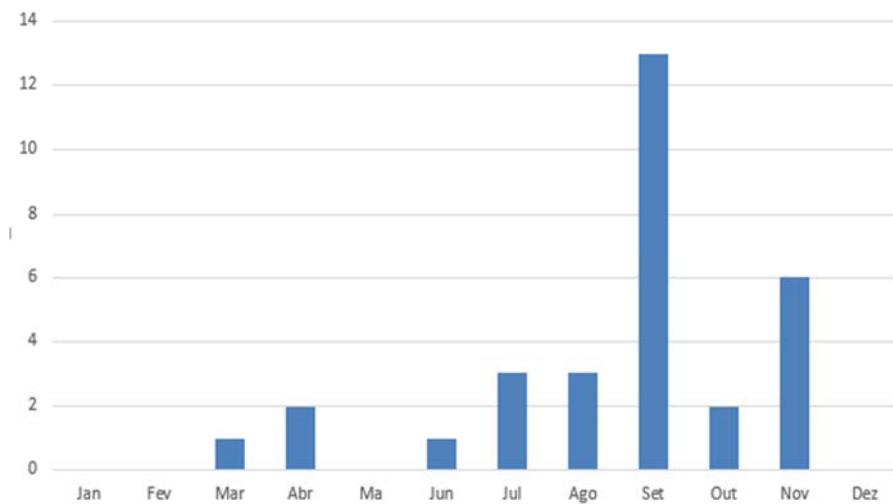
183

184 A extração de DNA total foi realizada empregando fenol/clorofórmio, segundo protocolo
 185 descrito por Sambrook e Russel (2001). A quantidade e a qualidade do DNA foram
 186 avaliadas em espectrofotômetro (*Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer - Thermo*
 187 *Fisher Scientific*), por meio de absorvância a 260-280 nm, e em gel de agarose 1,5%,
 188 corado com Gel Red (*Uniscience*) ($0,1\mu\text{L}/10\text{mL}$) imerso em tampão Tris-Ácido acético-
 189 EDTA (TAE) e visualizados em digitalizador de imagens, sob luz ultravioleta.

190

191 RESULTADOS

192 Foi coletado um total de 44 amostras biológicas durante o período de coleta, conforme
193 ilustrado na Fig. 3.



194

195 Figura 3.: Número de amostras encontradas durante agosto de 2016 a outubro de 2017.

196

197 Abaixo, segue o mapa da fazenda Experimental Edgárdia, contendo os dados de
198 georreferenciamento das amostras coletadas (Fig. 4):



199

200 Figura 4.: Fazenda Experimental Edgárdia: identificação dos locais de coleta das amostras
201 de fezes.

202

203 No local e após uma análise prévia de cada uma das amostras coletadas, nove delas foram
204 excluídas conforme os seguintes critérios: ausência de pelos, presença de sementes e/ou
205 falta de informação de referência (Fig. 5).



206

207 Figura 5.: À esquerda: amostra 17 de *Puma concolor* evidenciando a presença de pelos.

208 À direita: amostra 31 - descartada devido a presença de sementes e ausência de pelos.

209

210 Na Tab. 1. encontram-se os resultados obtidos em termos de concentração de DNA

211 (ng/ μ l) e avaliação de sua qualidade por meio da análise de absorvância em

212 espectrofotômetro, para cada uma das 35 amostras de DNA obtidas empregando a técnica

213 de extração por fenol/clorofórmio.

214

215

216 Tabela 1.: Descrição das 35 amostras quanto a concentração de DNA obtida e respectivas

217 análise de absorvância

(A)	(C)	(Ab)	(A)	(C)	(Ab)	(A)	(C)	(Ab)
1	33,7	1,76	13	14,4	1,76	25	8,7	1,4
2	12,2	0,69	14	6,9	1,8	26	9,8	1,52
3	38,4	1,67	15	27,9	1,45	27	32,6	1,5
4	17,2	1,34	16	1,5	2,15	28	60,2	1,82
5	23,6	1,77	17	1	2,43	29	179,6	1,53
6	116,9	1,29	18	0,5	1,18	30	10,7	1,79
7	11,7	1,43	19	4	1,53	31	178,5	1,3
8	54,8	1,86	20	8,7	1,87	32	60,5	1,69
9	19,4	1,69	21	7,1	1,48	33	1,1	0,97
10	3,6	1,93	22	13,5	1,57	34	5,1	1,44
11	47,5	1,64	23	21,7	1,6	35	123,1	1,49
12	82,2	1,67	24	6,4	1,29			

218

219 Legenda: (A) Amostra, (C) Concentração ng/ μ l, (Ab) Absorvância.

220

221 Todas as amostras foram analisadas visualmente e classificadas quanto ao seu grau de
222 degradação em: (a) muito degradadas; (b) degradadas; (c) pouco degradadas ou (d)
223 frescas. Posteriormente, realizou-se uma comparação relacionando o grau de degradação
224 com a qualidade de DNA obtida, sendo que os resultados foram visualizados em
225 digitalizador de imagens, sob luz ultravioleta conforme ilustrado na Fig. 6. A média da
226 somatória das concentrações das amostras muito degradadas, degradadas, pouco degradadas
227 e frescas deram respectivamente: 19,03 ng/ μ l; 16,86 ng/ μ l; 43,27 ng/ μ l; 70,78 ng/ μ l.

228

229 Figura 6.: Identificação das amostras segundo o seu grau de degradação: (A) muito
230 degradadas; (B) degradadas; (C) pouco degradadas ou (D) frescas e respectivo resultado
231 da eletroforese em gel de agarose a 1,5% evidenciando a qualidade e integridade do DNA
232 obtido.

233

234

235

236

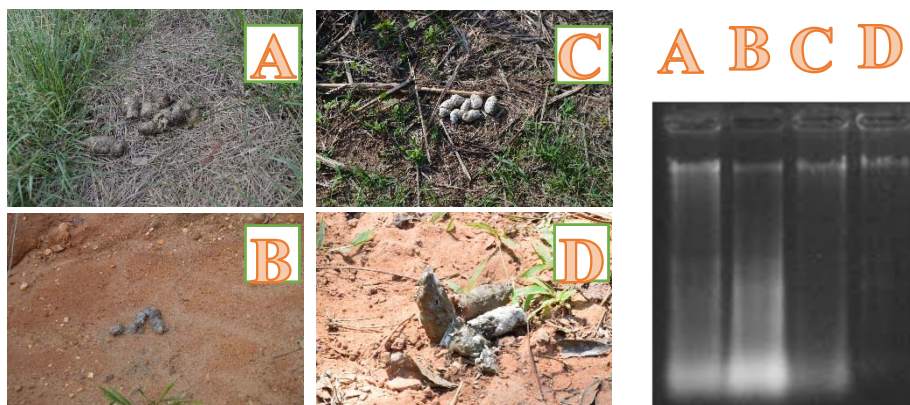
237

238

239

240

241



242

DISCUSSÃO

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

Um dos objetivos da biologia da conservação é o de possibilitar a sobrevivência, em longo prazo, das espécies e dos ecossistemas aos quais elas dependem (Wayne e Morin, 2004).

Os mamíferos carnívoros são naturalmente inclinados a entrar em conflito com o homem porque suas extensas áreas de vida, seus requerimentos alimentares e comportamento predatório os colocam em competição com os humanos e podem representar ameaça à segurança física ou econômica da comunidade. Essas características reduzem a tolerância aos carnívoros de maneira geral, diminuindo assim o apoio à sua conservação.

Conservacionistas preocupados com os grandes felinos não podem simplesmente se restringir ao estudo da espécie com a qual trabalham, isolando-as do contexto e não se envolvendo com os aspectos sócio-econômicos e políticos mais amplos, pois, desta forma, sua pesquisa não irá representar a realidade a que estão expostos. O presente estudo visou, levando-se em consideração o bem-estar animal, contribuir com

255 informações que venham a se somar aos dados já existentes na literatura, de forma a
256 ampliar o conhecimento ecológico sobre a região e a espécie *Puma concolor*.

257 Uma nova possibilidade de monitorar a demografia de espécies que são difíceis de serem
258 observadas ou capturadas, como no caso da onça-parda, utiliza materiais orgânicos ou
259 rastros por elas deixados. Sabe-se que, para se obter informações confiáveis do material
260 genético de um animal, é necessário que as etapas que antecedem a amplificação
261 (replicação *in vitro*) sejam rigorosas e livres de contaminação. Muitos são os métodos
262 desenvolvidos para obtenção de DNA puro e íntegro. Muitas são baseadas em *kits*
263 comerciais, de gastos relativamente elevados. São escassos os estudos empregando
264 métodos de extração de baixo custo, como a técnica de extração a partir do uso de
265 fenol/clorofórmio utilizada neste estudo e também aplicáveis a amostras de material
266 biológico obtidas por métodos não invasivos de coleta. Na maioria dos casos, as extrações
267 de DNA envolvem amostras obtidas por métodos invasivos, que no caso de grandes
268 animais, tornam a coleta uma tarefa difícil e demorada, além de provocar estresse nestes
269 animais. Em virtude dessas desvantagens, métodos alternativos têm surgido com o intuito
270 de tornar a obtenção das amostras um processo menos desgastante tanto para os animais
271 quanto para os pesquisadores.

272 Para combater o desafio de localizar tais tipos de amostras não invasivas, as etapas de
273 levantamento e triagem das trilhas neste experimento foram de crucial importância. A
274 detecção dos locais com grande quantidade de pegadas foi um indicativo de encontrar
275 fezes possivelmente frescas. O resultado obtido quanto ao número de amostras mostrou
276 que os locais escolhidos para patrulhamento foram positivos, visto que foram encontradas
277 e coletadas 44 amostras de fezes. Correlacionando as coletas com a época do ano
278 evidenciou-se que, entre os meses de julho a novembro, ocorreu uma maior atividade de
279 demarcação territorial. Este fato sugere que este período possa indicar a estação
280 reprodutiva da espécie. Quando correlacionamos o mesmo período com os dados de
281 índice pluviométrico da região, observou-se que o maior número de amostras foi coletado
282 nos meses secos sugerindo que, com a ocorrência de chuvas, ocorre a lavagem das fezes.
283 Portanto, estudos comportamentais complementares de demarcação territorial devem ser
284 realizados. Este estudo prévio demonstrou que é possível, com o patrulhamento das trilhas
285 na APA da Fazenda Edgárdia, o levantamento de informações cruciais para a região da
286 Cuesta de Botucatu. Porém, este deve ser um esforço contínuo de forma a compreender a
287 dinâmica dos biomas Cerrado, Mata Atlântica e sua região de transição.

288 As fezes coletadas apresentaram-se repletas de ossos, pelos e bicos. Este fato evidencia
289 claramente a existência de algumas espécies que habitam a região, pois a onça-parda é
290 um predador generalista e se alimenta de qualquer espécie que aumente sua densidade.
291 Desta forma, esta espécie exerce um controle do ecossistema e de suas pragas.
292 Atualmente, devido à grande fragmentação de habitats, as populações selvagens estão
293 ficando cada vez mais isoladas e, com o estudo a partir da análise das fezes, pode-se
294 elucidar todo o complexo ecológico da região.

295 As amostras biológicas oriundas de felinos foram facilmente identificáveis, levando-se
296 em consideração, além de sua morfologia, a presença de ossos e pelos emaranhados,
297 devido ao seu comportamento de autolimpeza. Porém, quando nessas fezes observávamos
298 a presença de sementes, as mesmas foram descartadas considerando serem pertencentes
299 à outra espécie, e não a estes carnívoros.

300 O resultado referente à quantificação do DNA obtido nas 35 amostras de fezes mostrou
301 que em todas elas havia material, porém, sua concentração variou de 0,5 a 180 ng/ μ L. O
302 DNA obtido das fezes é oriundo das células epiteliais descamadas durante a passagem
303 pelo intestino (Kohn e Wayne, 1997). Embora geralmente produzam quantidades
304 pequenas de DNA, observou-se que tais as amostras não invasivas, podem ser usadas para
305 a análise de variação genética individual como uma ferramenta poderosa para responder
306 questões sobre a diversidade genética, parentesco e relações populacionais.

307 A qualidade das amostras tem um impacto direto na acurácia dos resultados a serem
308 obtidos quando do emprego de técnicas de biologia molecular tais como amplificação por
309 reação em cadeia da polimerase (PCR) e reações de sequenciamento. Quando
310 consideramos a qualidade do DNA obtido, conforme ilustrado na Fig. 6, verificamos a
311 presença de DNA mais íntegro nas amostras de fezes frescas ou pouco degradadas. Já,
312 nas amostras classificadas como degradadas ou muito degradadas, verificamos a
313 contaminação com RNA, uma vez que se detecta banda na parte inferior do gel de
314 agarose.

315

316 CONCLUSÕES

317 Com base nos resultados obtidos espera-se que esta pesquisa traga novos subsídios na
318 utilização de amostras não invasivas e assim, venha a contribuir com planos de
319 conservação tanto regionais como nacionais. A escolha da espécie guarda-chuva, *Puma*
320 *concolor*, demonstrou ser confiável devido ao seu efeito sistêmico no ecossistema no qual

321 reside, além da demarcação de territórios, comportamento natural de muitos felinos,
322 facilitando o acesso a coleta de amostras e posterior análises genéticas.

323 A estratégia de escolha dos trajetos a serem percorridos nas áreas de transição e bordas
324 de mata pela presença de pegadas se mostrou altamente eficaz para encontrar fezes de
325 *Puma concolor*.

326

327 REFERÊNCIAS

328 ALVES, TR. FONSECA, R.C.B. ENGEL, VL. Mamíferos de médio e grande porte e sua
329 relação com o mosaico de habitats na cuesta de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil.
330 *Iheringia Ser Zool.* V.102, n.2, p.150-8. 2012

331 BREVIGLIERI, C.P.B.; LAUNDRÉ, J.W.; ROMERO, G.Q. Effects of puma on the
332 diversity and composition of neotropical mammals. *J Trop Ecol.*,v.33, p.317-26, 2017.

333 CHAME, M. Terrestrial mammal feces: a morphometric summary and description. *Mem*
334 *Inst Oswaldo Cruz*, v.98, n.1, p.71-94, 2003.

335 DOBROVOLSKI, R.; LOYOLA, R.D.; GUILHAUMON, F.; et al. Global agricultural
336 expansion and carnivore conservation biogeography. *Biol Conserv.*,v.165, p.162-70,
337 2013.

338 FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. Relatório Anual 2016. São Paulo; 2016.
339 Disponível em: [https://www.sosma.org.br/wp-content/uploads/2013/05/AF_RASOSMA](https://www.sosma.org.br/wp-content/uploads/2013/05/AF_RASOSMA_2016_web.pdf)
340 [_2016_web.pdf](https://www.sosma.org.br/wp-content/uploads/2013/05/AF_RASOSMA_2016_web.pdf). Acessado em: 23 mar. 2018.

341 GORMAN, M.L.; TROWBRIDGE, B.J. The role odor in the social lives carnivores. In:
342 Gittleman JL. Carnivore behavior, ecology and evolution. New York: Chapman & Hall;
343 1989. p. 57-88.

344 GRIESE, J.; FONSECA, R.C.B. Guia de mamíferos silvestres de médio e grande porte
345 da região da cuesta de Botucatu. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e
346 Florestais; 2014.

347 JORGE, L.A.B.; SARTORI, M.S. Uso do solo e análise temporal da ocorrência de
348 vegetação natural na fazenda experimental edgardia, em Botucatu-SP. *Rev. Arvore*, v.26,
349 n.5, p.585-592, 2002.

350 KOHN, M.; WAYNE, R.K. Facts from feces revisited. *Trends Ecol Evol.*,v.12, p.223-27,
351 1997.

352 LEITE-PITMAN, M.R.P.; OLIVEIRA, T.G.; DE PAULA, R.C.; INDRUSIAK, E.C.
353 Manual de identificação, prevenção e controle de predação por carnívoros. Brasília:
354 Ibama; 2002.

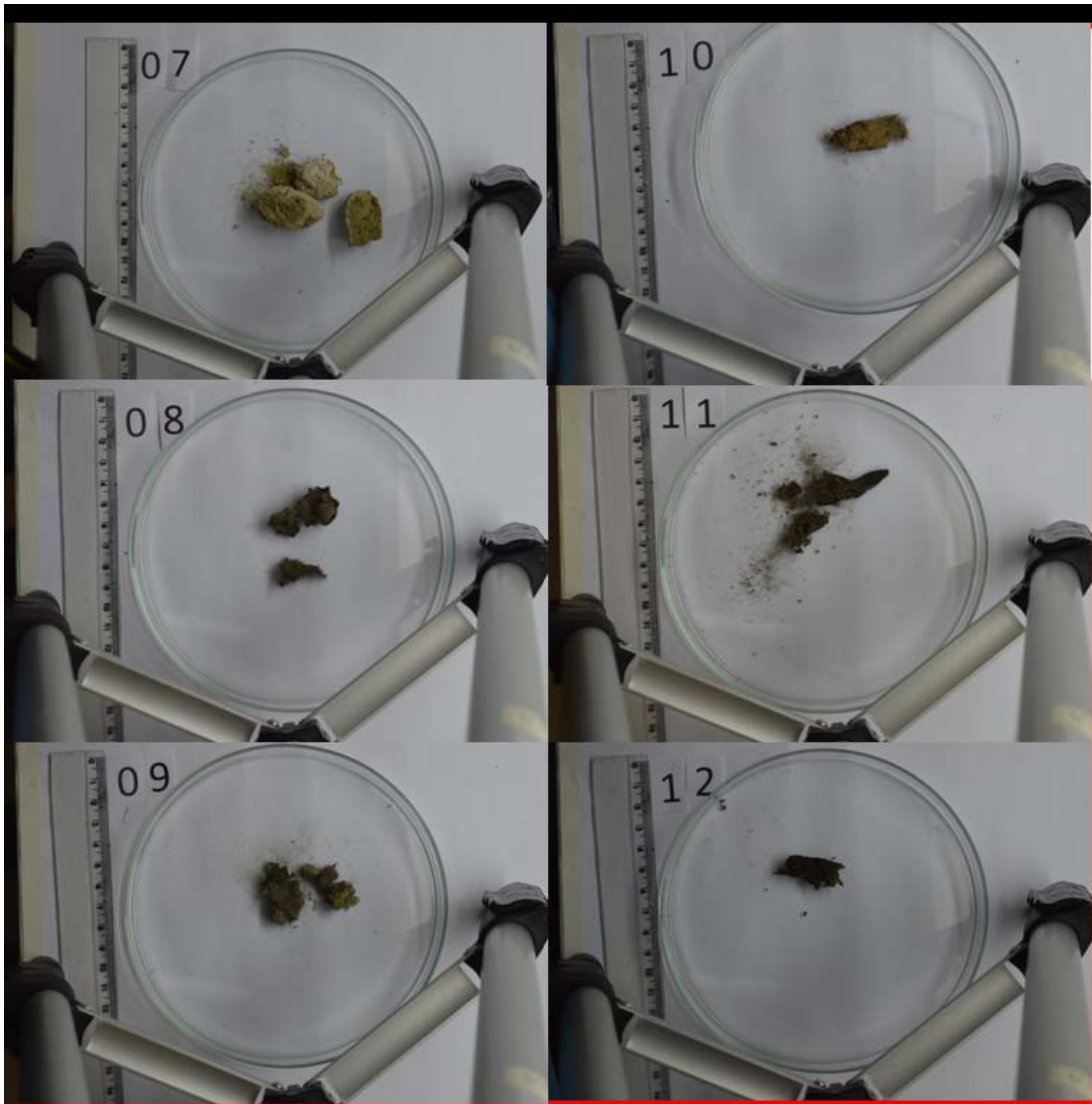
-
- 355 MACHADO, R.B.; RAMOS NETO, M.B.; PEREIRA, P.G.P.; et al. Estimativas de perda
356 da área do Cerrado brasileiro. Brasília: Conservação Internacional; 2004.
- 357 MILAN, E.; MORO, R.S. O conceito biogeográfico de ecótono. *Terr@Plural.*, v.10, n.1,
358 p.75-88, 2016.
- 359 RUTH, T.K.; LOGAN, K.A.; SWEANOR, L.; HOMOCHER, M.G.; TEMPLE, L.J.
360 Evaluating cougar translocation in New Mexico. *J Wildl Manage.*, v.62, p.1264-75, 1988.
- 361 SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3a ed. New
362 York: Cold Spring HarborLaboratory Press; 2001.
- 363 SORIA-DIAZ, L.; FOWER, M.S.; MONROY-VILCHIS, O.; ORO, D. Funcional
364 responses of cougars (*Puma concolor*) in a multiple prey-species system. *Integr Zool.*,
365 v.13, p.84-93, 2018.
- 366 WAYNE, R.K.; MORIN, P.A. Conservation geneticsin the new molecular age. *Front*
367 *Ecol Environ.*, v.2, n.2, p.89-97, 2004.

ANEXOS

Imagens das Amostras analisadas no Laboratório



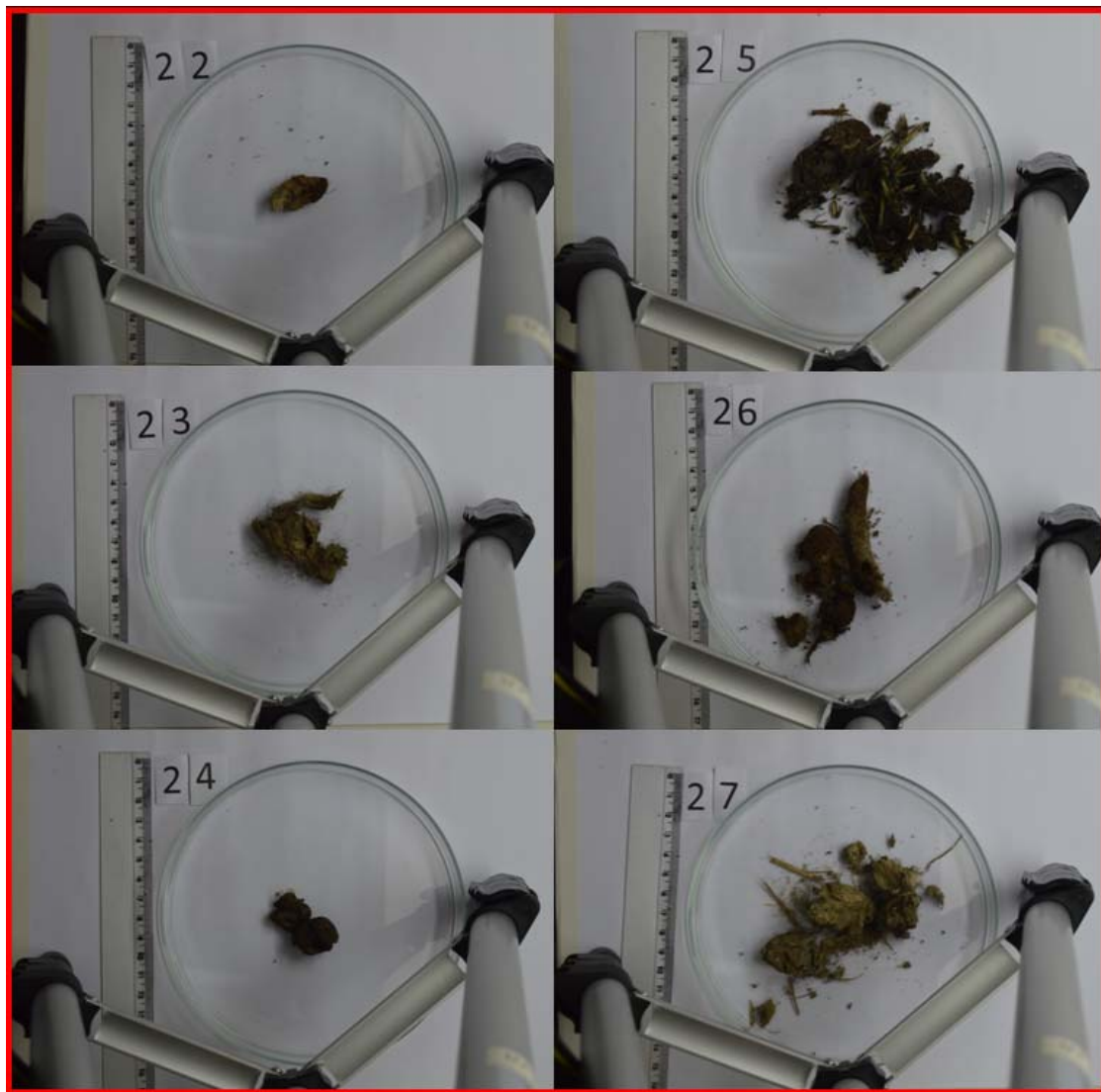
Imagens das Amostras analisadas no Laboratório



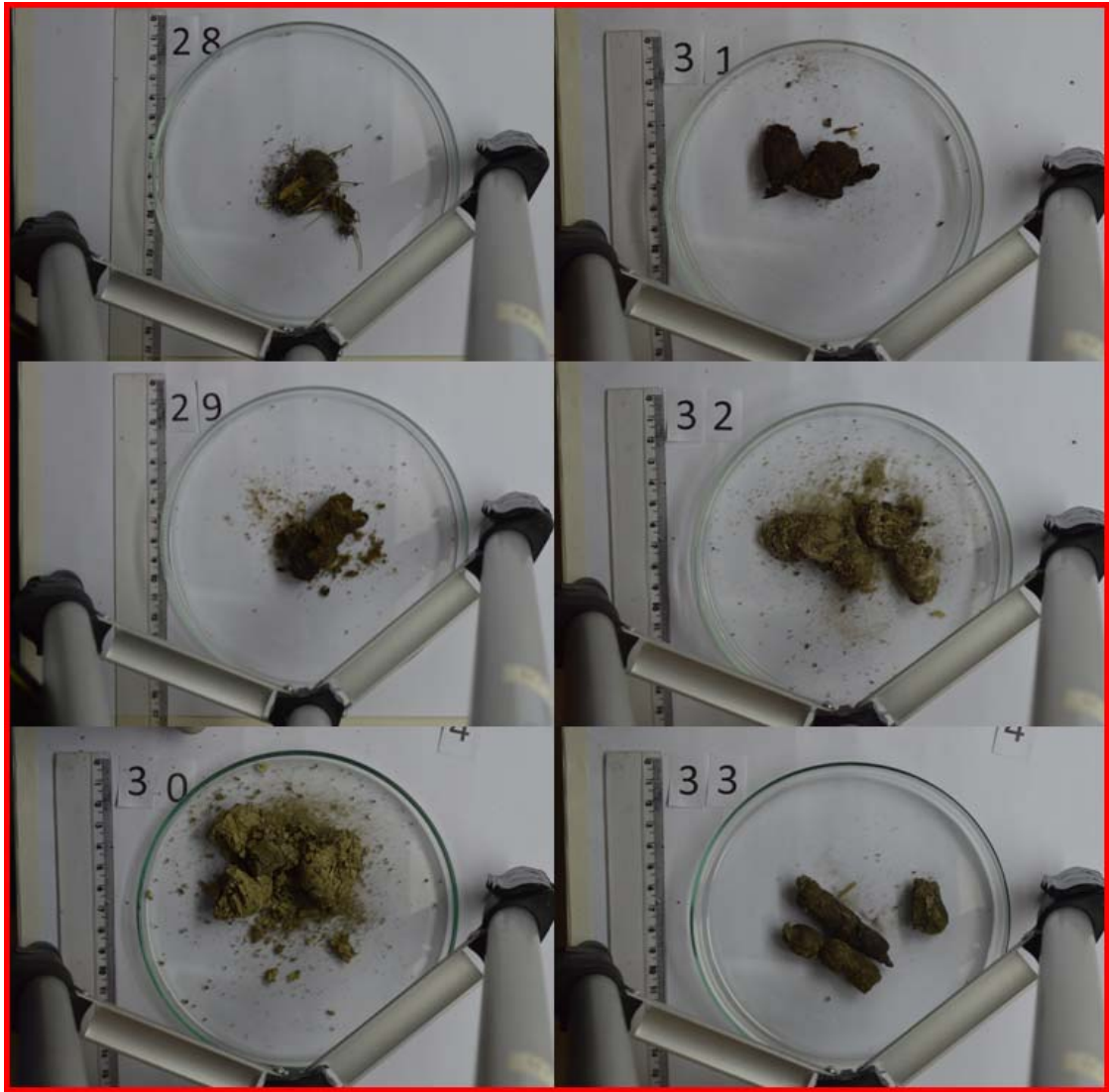
Imagens das Amostras analisadas no Laboratório



Imagens das Amostras analisadas no Laboratório



Imagens das Amostras analisadas no Laboratório



Imagens das Amostras analisadas no Laboratório



Imagens das Amostras analisadas no Laboratório

