



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COM ÊNFASE EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS

MARIA CLARA SILVA SOARES DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DA GENÉTICA FORENSE NA IDENTIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO
DO JAGUARUNDI (*Herpailurus yagouaroundi*) NO BRASIL**

Recife
2024

MARIA CLARA SILVA SOARES DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DA GENÉTICA FORENSE NA IDENTIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO
DO JAGUARUNDI (*Herpailurus yagouaroundi*) NO BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Bacharel.

Orientador: Dr. Valdir de Queiroz Balbino

Recife
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Oliveira, Maria Clara Silva Soares de .

Aplicação da Genética Forense na Identificação e Conservação do Jaguarundi
(Herpailurus yagouaroundi) no Brasil / Maria Clara Silva Soares de Oliveira. -
Recife, 2024.

38 p. : il., tab.

Orientador(a): Valdir de Queiroz Balbino

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas /Ciências
Ambientais - Bacharelado, 2024.

Inclui referências.

1. Genética Forense. 2. Jaguarundi. 3. Conservação. 4. DNA mitocondrial. I.
Balbino, Valdir de Queiroz . (Orientação). II. Título.

570 CDD (22.ed.)

MARIA CLARA SILVA SOARES DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DA GENÉTICA FORENSE NA IDENTIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO
DO JAGUARUNDI (*Herpailurus yagouaroundi*) NO BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel.

Aprovada em: 08/10/2024

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Valdir de Queiroz Balbino (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Sérgio de Sá Leitão Paiva Júnior (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

MSc. Osmar dos Reis Filho (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico à minha família e aos meus amigos, que acreditaram em mim quando eu mais precisei.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me fortalecer nos momentos difíceis, aqueles que precisei ter paciência e calma. Por ter me acompanhado e protegido durante toda a trajetória do curso, a Ele toda honra e glória sempre.

Agradeço aos meus pais e ao meu irmão, que acreditaram e me incentivaram ao longo do curso, no processo de pesquisa e escrita. Graças a vocês, pude me dedicar e tive o privilégio de chegar até aqui.

Agradeço aos meus colegas de curso e laboratório, por todo acolhimento e ajuda. Vivenciei momentos maravilhosos com cada um de vocês, essenciais ao longo da minha trajetória.

RESUMO

O uso da Genética Forense possibilita a identificação de espécies suscetíveis a diminuição de populações, como é o caso do felino *Herpailurus yagouaroundi*, conhecido popularmente como jaguarundi, classificado no Brasil como Vulnerável devido a sua reduzida área de ocupação; assim como a criação e implementação de estratégias de conservação. As principais ameaças da espécie atualmente são a perda e fragmentação de habitat, especialmente em razão da agricultura e pastagens em grande escala. Apesar disso, o jaguarundi pode ser encontrado em boa parte da América Latina e especificamente no Brasil habita todas as principais ecorregiões, incluindo Pantanal, Cerrado, Caatinga, floresta tropical da Amazônia, floresta atlântica, matas de galeria e vegetação perturbada ou secundária de vários tipos de habitat. O gene da subunidade 1 da citocromo c oxidase (COI) do DNA mitocondrial foi considerado como critério para identificação da espécie, devido a sua degradação mais lenta e abundância em células somáticas, visando o uso de material genético não invasivo (fezes e pelos), tornando-o mais favorável e sem que haja a captura do animal, diminuindo a perturbação. Nesse sentido, o presente estudo busca contribuir com o aumento de pesquisas sobre o *Herpailurus yagouaroundi*, fornecendo informações a respeito do uso de técnicas da genética forense para identificação e conservação da espécie no Brasil.

Palavras-chave: Genética Forense. Jaguarundi. Conservação. DNA mitocondrial. COI.

ABSTRACT

The use of Forensic Genetics makes it possible to identify species susceptible to population decline, such as the feline *Herpailurus yagouaroundi*, popularly known as the jaguarundi, classified in Brazil as Vulnerable due to its reduced area of occupation; as well as the creation and implementation of conservation strategies. The main threats to the species today are habitat loss and fragmentation, especially due to large-scale agriculture and pastures. Despite this, the jaguarundi can be found in much of Latin America and specifically in Brazil, it inhabits all the main ecoregions, including the Pantanal, Cerrado, Caatinga, Amazon rainforest, Atlantic forest, gallery forests and disturbed or secondary vegetation of various types of habitat. The mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene was considered as a criterion for species identification, due to its slower degradation and abundance in somatic cells, aiming at the use of non-invasive genetic material (feces and hair), making it more favorable and without the capture of the animal, reducing disturbance. In this sense, the present study seeks to contribute to the increase of research on *Herpailurus yagouaroundi*, providing information about the use of forensic genetic techniques for identification and conservation of the species in Brazil.

Keywords: Forensic Genetics. Jaguarundi. Conservation. Mitochondrial DNA. COI.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Padrões de variações fenotípicas do <i>Herpailurus yagouaroundi</i> .	15
Figura 2 –	Árvore filogenética da família Felidae, com destaque para os 3 clados que compreendem as espécies de felinos neotropicais.	18
Figura 3 –	Trechos do alinhamento múltiplo de <i>Herpailurus yagouaroundi</i> em relação a outras espécies de felinos silvestres neotropicais, com destaque para as regiões homólogas	23
Figura 4 –	Árvore filogenética de felinos neotropicais em relação à região de amplificação do par de primer HF03/HR03 (H03).	29
Figura 5-	Árvore filogenética de felinos neotropicais em relação à região de amplificação do par de primer HF07/HR07 (H07).	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Dados de espécies de felinos silvestres neotropicais, recuperados por meio da plataforma GenBank	20
Tabela 2 –	Primers desenhados com base na sequência do gene COI do <i>Herpailurus yaguarondi</i> por meio da plataforma online Primer-BLAST	25
Tabela 3 –	Espécies identificadas utilizando as regiões de ancoragem na sequência COI do <i>Herpailurus yaguarondi</i> , dos primers HF03 e HR03, projetados neste estudo por meio da pcr in silico	26
Tabela 4 –	Espécies identificadas utilizando as regiões de ancoragem na sequência COI do <i>Herpailurus yaguarondi</i> , dos primers HF07 e HR07, projetados neste estudo por meio da pcr in silico	27
Tabela 5 –	Espécies da família Felidae identificadas no BLAST utilizando as regiões de amplificação dos primers HF03 e HR03	28
Tabela 6 –	Espécies família Felidae identificadas no BLAST utilizando as regiões de amplificação dos primers HF07 e HR07	28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo Geral	13
2.2	Objetivos Específicos	13
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
3.1	Características do <i>Herpailurus yagouaroundi</i>	14
3.2	Comportamento e distribuição do <i>Herpailurus yagouaroundi</i> no território brasileiro	16
3.3	Diversidade de Felinos na Região Neotropical	17
3.4	A Genética Forense como ferramenta de identificação e conservação	18
4	METODOLOGIA	20
4.1	Levantamento de dados biológicos	20
4.2	Alinhamento múltiplo dos felinos neotropicais	21
4.3	Análise do MSA	21
4.4	Design dos primers para identificação do <i>Herpailurus yagouaroundi</i>	22
5	RESULTADOS	23
5.1	Alinhamento múltiplo a partir do gene da subunidade 1 da citocromo oxidase (COI) dos felinos neotropicais	23
5.2	Identificação do <i>Herpailurus yagouaroundi</i> por meio da pcr in silico	24
5.3	Análise filogenética dos Felinos Neotropicais em relação às regiões de interesse	29
6	DISCUSSÃO	30
7	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	

1. INTRODUÇÃO

A Genética Forense é a área do conhecimento que trata da utilização dos conhecimentos e das técnicas de genética e de biologia molecular no auxílio à justiça (Dos Santos, 2018, p.13). No entanto, essas técnicas, desenvolvidas inicialmente para humanos, foram rapidamente adaptadas para a utilização a partir de outras amostras biológicas, como de animais, plantas e microrganismos; Uma vez que a análise deste material é hoje amplamente utilizada, fornecendo provas auxiliares em criminalística em casos como ataques de animais, tráfico de espécies, bioterrorismo e identificação de composição fraudulenta de alimentos, entre muitos outros (Arenas et al., 2017).

A técnica de DNA Barcoding é um dos métodos favoráveis nos casos forenses, uma vez que o dna mitocondrial possui uma degradação mais lenta e é abundante em células somáticas, sendo assim é possível realizar a identificação de espécies por meio da avaliação dos loci mitocondriais, a exemplo da Citocromo c Oxidase (COI), material genético que pode ser obtido a partir de tecidos processados e degradados (Alacs et al., 2010; Lindquist & Wictum, 2016; Mitra et al., 2018), a exemplo de uma amostragem não invasiva, como por fezes e pelos, solução mais viável, com menor estresse e indicado para animais de grande porte (Laguardia et al., 2015; Portella, 2011).

Nesse sentido, a identificação de espécies suscetíveis a diminuição de população, por meio da genética forense, são de extrema importância para a criação e implementação de estratégias de conservação, como é o caso do felino *Herpailurus yagouaroundi*, conhecido popularmente como jaguarundi, classificado no Brasil pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) como Vulnerável (C1), devido a sua reduzida área de ocupação (AOO).

A espécie geralmente não é explorada para o comércio, embora os jaguarundis sejam sem dúvida capturados em armadilhas preparadas para espécies comercialmente valiosas e possam estar sujeitos a pressões de caça de baixa intensidade em torno de áreas povoadas (Nowell e Jackson 1996). As suas principais ameaças são, no entanto, a perda e fragmentação de habitat, especialmente para a agricultura e pastagens em grande escala. Os Jaguarundis são frequentemente mortos por consumir aves domésticas, registros comuns no

México e no Brasil (Sanchez et al. 2002, Michalski et al. 2006, Monroy-Vilchis et al. 2011).

Apesar da ampla distribuição do *Herpailurus yagouaroundi*, os estudos sobre a espécie ainda são limitados. O jaguarundi ocorre desde as planícies orientais do Parque Nacional Chipinque em Nuevo León, México (limite NE) e nas planícies ocidentais do México, até o sul do Brasil, Paraguai, Uruguai (Dotta et al. 2007) e ao sul através do centro da Argentina em cerca de 39°S. Esta é predominantemente uma espécie de planície que varia até 2.000 m, mas na Colômbia foi encontrada até 3.200 m (Cuervo et al. 1986). Está provavelmente extinta nos EUA (sul do Texas), uma vez que não há registros da espécie no Texas desde o ano de 1986, quando um indivíduo foi encontrado atropelado (Sunquist e Sunquist 2002, Caso 2013).

No Brasil, jaguarundis habitam todas as principais ecorregiões, incluindo Pantanal, Cerrado, Caatinga, floresta tropical da Amazônia, Floresta Atlântica, matas de galeria e vegetação perturbada ou secundária de vários tipos de habitats (De Oliveira & Cassaro 1997, De Oliveira 1998, Nakano-Oliveira 2002, Trovati 2004, De Oliveira et al. 2010). É considerado um felino de pequeno porte, com pernas curtas e alongado, com cabeça proporcionalmente pequena e orelhas baixas e arredondadas. Existem três padrões principais de pelagem: um fenótipo marrom chocolate a quase preto, que parece ser o mais comum; uma fase prateada acinzentada; e uma cor ferrugem ou marrom-avermelhada marcante, embora menos comum (De Oliveira 1998).

Dessa forma, o aumento de pesquisas mais específicas do *Herpailurus yagouaroundi* são extremamente necessárias, uma vez que contribuem para a melhor compreensão da densidade demográfica da espécie, das interações interespecíficas e de ameaças e impactos das ações humanas em suas diversas formas. Sendo assim, o presente estudo busca fornecer informações a respeito do uso da genética forense para identificação e consequente conservação do jaguarundi no Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Contribuir com estudos de conservação do jaguarundi (*Herpailurus yagouaroundi*) no Brasil, por meio da identificação da espécie em relação a felinos neotropicais, utilizando os métodos da genética forense.

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar um levantamento de dados biológicos das espécies de felinos silvestres Neotropicais, a fim de consultar e extrair as sequências genéticas mitocondriais.
- Considerar as espécies de felinos Neotropicais na identificação filogenética, buscando entender o grau de parentesco com o *Herpailurus yagouaroundi* e possíveis relações interespecíficas.
- Realizar o desenho de primers para identificação do *Herpailurus yagouaroundi*, por meio da reação de pcr e sequenciamento.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Características do jaguarundi (*Herpailurus yagouaroundi*)

O *Herpailurus yagouaroundi* é um mamífero pertencente à Ordem Carnívora, no qual apresenta uma diversidade de 47 espécies na América do Sul, das quais 27 ocorrem no Brasil, possuindo uma enorme variedade de padrões comportamentais, sociais e características corporais. Os carnívoros têm requisitos ecológicos diversos, no entanto, estão sendo bastante afetados por ameaças que vão desde da caça retaliatória e esportiva ao desmatamento e à mortalidade por doenças adquiridas de animais domésticos (Silveira 2018).

Essa espécie está inserida na Família dos felinos, Felidae, que são caracterizados por suas adaptações a saltos e escaladas, como possuir membros anteriores curtos e posteriores longos, unhas retráteis e sola da pata com tecido de amortecimento de impacto. Sua cabeça arredondada e a órbita ocular são grandes, seu focinho é curto. Animais que pertencem a essa família são predadores que exercem um importante controle populacional em relação a outros animais, sendo quase sempre animais de topo de cadeia alimentar, que conseqüentemente os torna bons indicadores da integridade das relações ecológicas de um ambiente (Silveira 2018).

Está classificado atualmente no Brasil, segundo IUCN, como Vulnerável (C1), devido a sua reduzida área de ocupação (AOO). Sendo tipicamente a terceira do ranking de abundância dos mesofelinos (Oliveira et al. 2010, Oliveira 2011). O tamanho das populações desta espécie é relativamente pequeno, com densidade variando entre 0,01-0,05 indivíduos/km², chegando a 0,1-0,25 indivíduos/km² apenas nas áreas consideradas de alta densidade. As densidades mais elevadas são encontradas em poucas localidades e sempre onde *L. pardalis* está ausente ou em números consideravelmente baixos (Oliveira et al. 2010, Oliveira 2011). Uma vez que já foi demonstrado que *L. pardalis* afeta negativamente os números de *H. yagouaroundi*, por conta do potencial de predação intraguilda, conhecida como Efeito Pardalis (Oliveira et al. 2010, Oliveira 2011).

Figura 1: Padrões de variações fenotípicas do *Herpailurus yagouaroundi*



Fonte: Extraída de software de código aberto iNaturalist em 21 de mai. de 2024.

O Jaguarundi, apresenta três padrões principais de pelagem, um fenótipo marrom chocolate a quase preto (Figura 1A), que parece ser o mais comum; uma fase prateada acinzentada (Figura 1B); e uma cor ferrugem ou marrom-avermelhada marcante (Figura 1C), embora menos comum (De Oliveira 1998). A dieta da espécie compreende mamíferos de pequeno e médio porte (terrestres e arborícolas), aves, cobras, lagartos e anfíbios (Manzani & Monteiro-Filho 1989, Facure & Giaretta 1996, Tófoli et al. 2009, Oliveira et al. 2010, Bianchi et al. 2011).

Jaguarundis percorrem grandes distâncias em um dia, cerca de 7km em 24h (Sunquist & Sunquist 2002), possuem área de vida entre 88 e 100 km², determinada para dois machos adultos estudados em Belize, e 20,11 km² para uma fêmea adulta (Konecny 1989). No sul do Brasil, no Parque Nacional de Iguaçu, a área de vida de um macho e de uma fêmea adultos foram de 17,6 e 6,8 km², respectivamente (Crawshaw 1995). Em região de Cerrado no estado do Tocantins, a área de vida de um macho adulto foi estimada em 25,3 km² e de uma fêmea adulta, 18 km² (Trovati 2004). Na Mata Atlântica do estado de São Paulo, a área de vida de um macho e uma fêmea adultos foram de 8,5 km² e 6,8 km², respectivamente (Michalski et al. 2006). Em paisagem dominada por atividade agrícola, no norte do Rio Grande do

Sul, a área de vida de três indivíduos monitorados oscilou entre 5,8 e 23,77 km² (Oliveira et al. 2010).

3.2. Comportamento e distribuição do *Herpailurus yagouaroundi* no território brasileiro

Herpailurus yagouaroundi pode ser encontrado em florestas de planícies e matas, utiliza ambientes florestais primários e secundários, restingas, cerrado, manguezais e plantações de eucalipto (Santos et al. 2004, Michalski & Peres 2005, Nowak 2005, Rocha & Dalponte 2006, Trolle et al. 2007, Oliveira et al. 2010). Com isso, há registros de sua ocorrência desde as planícies orientais do Parque Nacional Chipinque em Nuevo León, México (limite NE) e nas planícies ocidentais do México, até o sul do Brasil, Paraguai, Uruguai (Dotta et al. 2007) e ao sul através do centro da Argentina em cerca de 39°S. Está provavelmente extinta nos EUA (sul do Texas), uma vez que não há registros da espécie no Texas desde o ano de 1986, quando um indivíduo foi encontrado atropelado (Sunkist & Sunkist 2002, Caso 2013).

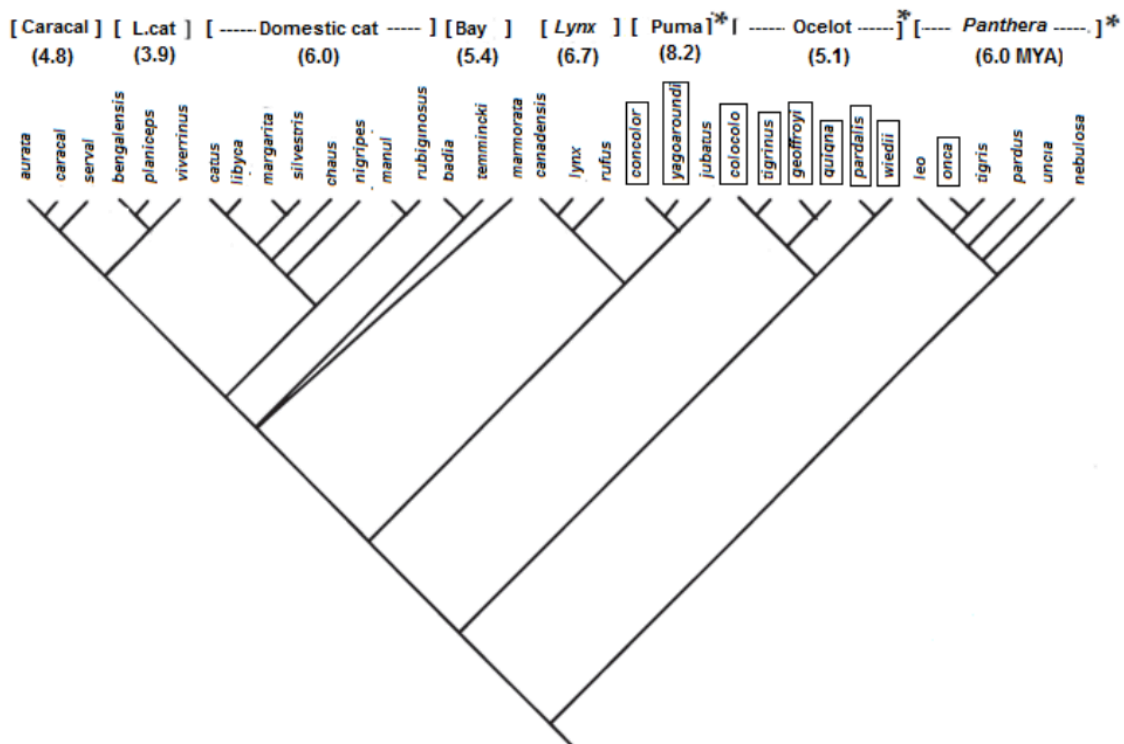
No Brasil, jaguarundis habitam todas as principais ecorregiões, incluindo Pantanal, Cerrado, Caatinga, floresta tropical da Amazônia, floresta atlântica, matas de galeria e vegetação perturbada ou secundária de vários tipos de habitat (De Oliveira & Cassaro 1997, De Oliveira 1998a, Nakano-Oliveira 2002, Trovati 2004, De Oliveira et al. 2010). Entretanto, apesar de estar associado a habitats mais abertos e ter hábitos diurnos (Oliveira 1988), sendo frequentemente avistado, estudos populacionais demonstraram que a espécie é muito menos abundante do que se acreditava (Oliveira et al. 2010, Oliveira 2011).

Portanto, ainda que possua ampla distribuição no território americano, pesquisas mostram que o Jaguarundi é uma espécie incomum e de baixa densidade, uma vez que o tamanho das populações desta espécie é relativamente pequeno, com densidade variando entre 0.01-0.05 indivíduos/km², chegando a 0,1-0,25 indivíduos/km² apenas nas áreas consideradas de alta densidade. (Oliveira et al. 2010, Oliveira 2011).

3.3 Diversidade de Felinos na Região Neotropical

A região Neotropical, área que abrange desde a parte sul da América do Norte até a América do Sul, é ocupada por 12 a 19 espécies da família Felidae (Sendas, 2018), que podem ser divididas em três clados evolutivamente distintos, diferenciados por meio de uma variedade de técnicas de genética molecular. Considerando a árvore filogenética (Figura 2) proposta por Mattern & McLennan (2000 apud Grisolia e Cotulio, 2012), o primeiro clado, é a linhagem de ocelotes que compreende todas as espécies do gênero *Leopardus*. O segundo clado, o da linhagem puma que compreende as duas espécies do gênero *Puma*. O último e terceiro clado, linhagem *Panthera*, é representado nesta região pela onça-pintada (*Panthera onca*). No Brasil, segundo levantamento de dados no NCBI, existem 9 destas espécies, conforme tabela 1: *Leopardus colocolo* (gato-palheiro), *Leopardus geoffroyi* (gato-montês), *Leopardus guttulus* (gato-do-mato), *Leopardus pardalis* (jaguaririca), *Leopardus tigrinus* (gato-do-mato-pequeno), *Leopardus wiedii* (maracajá), *Panthera onca* (onça-pintada), *Puma concolor* (onça parda) e *Herpailurus yagouaroundi* (jaguarundi).

Figura 2: Árvore filogenética da família Felidae, com destaque para os 3 clados que compreendem as espécies de felinos neotropicais



Fonte: Mattern & McLennan (2000 apud Grisolia e Cotulio, 2012)

3.4 A Genética Forense como ferramenta de identificação e conservação

O desenvolvimento e avanço das técnicas moleculares trouxeram grandes avanços para genética forense, permitindo a detecção, quantificação ou genotipagem de diferentes espécies (Hepp & De Nonohay 2016). Entre tais técnicas, está a do DNA Barcoding, que consiste em pequenas sequências de DNA de uma região específica do DNA mitocondrial (mtDNA), possuindo entre 400 e 800 pares de bases, que podem ser amplificadas por PCR e sequenciadas (Kamiguchi, Rocha e Tremori 2023). O mtDNA apresenta uma forma circular que permite degradação mais lenta, sendo abundante nas células somáticas, que o torna favorável nos casos forenses devido a simplicidade com que pode ser obtido a partir de tecidos processados e degradados (Alacs et al., 2010; Lindquist & Wictum, 2016).

Nesse ponto de vista, o uso do mtDNA revela-se como uma importante ferramenta para identificação filogenética do *Herpailurus yagouaroundi* e compreensão das semelhanças e divergências com outros felinos neotropicais, uma vez que estudos recentes envolvendo essa técnica de identificação molecular têm

mostrado eficácia na distinção de espécies geneticamente semelhantes, contribuindo positivamente para os estudos da biodiversidade da fauna e flora. (Carmo, 2011; Jose & Harikrishnan, 2016; Oliveira et al, 2016).

É possível realizar a identificação de espécies por meio da avaliação dos loci mitocondriais, regiões gênicas em que o material genético mitocondrial sofre baixas variações ao longo do processo de transferência de material genético entre os indivíduos, sendo traduzido em uma baixa taxa de recombinação durante os processos celulares de formação de gametas, fazendo com que todo descendente da linhagem de animais portadores de mtDNA específico herde da mãe a mesma sequência nucleotídica mitocondrial (Mitra et al., 2018). Assim, segundo Olson et al. (2009), o mtDNA pode ser utilizado para solucionar as relações que medem períodos de tempo muito longos, devido à alta conservação dos muitos genes localizados no genoma mitocondrial, além de ser relevante em questões que envolvem filogenia e importância taxonômica.

Os principais locus gênicos utilizados em estudos forenses são o do citocromo b (Cyt b) e o citocromo c oxidase (COI), ambos encontrados no genoma mitocondrial, empregados na identificação de diversas espécies animais. A análise de amostras de material genético é realizada por meio da técnica de PCR, em seguida é realizado o sequenciamento da amostra, e por fim é feita a comparação desta com bancos de dados genéticos disponíveis no meio eletrônico (Ardura et al., 2010; Linacre; Tobe, 2011).

4. METODOLOGIA

4.1 Levantamento de dados biológicos

O GenBank do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi utilizado para realizar o levantamento de dados biológicos das espécies de felinos silvestres neotropicais (Tabela 1). O estudo de Li et al. (2016), intitulado “Phylogenomic evidence for ancient hybridization in the genomes of living cats (Felidae)”, disponível no GenBank para a espécie *Herpailurus yagouaroundi*, foi considerado para a busca das sequências de DNA mitocondrial das demais espécies. O critério para a seleção foi a proximidade geográfica, pois pode influenciar no processo de identificação e conservação do *H. yagouaroundi*, devido a coexistência de espécies ecologicamente semelhantes (Santos et al. 2019).

Tabela 1: Dados de espécies de felinos silvestres neotropicais, recuperados por meio da plataforma NCBI

Espécies alvo	Acesso (NCBI)	Extensão (pb)	Brasil
<i>Leopardus colocolo</i>	NC_028314.1	16.650	Sim
<i>Leopardus geoffroyi</i>	NC_028320.1	16.738	Sim
<i>Leopardus guigna</i>	NC_028321	16.773	Não
<i>Leopardus guttulus</i>	NC_085265.1	17.944	Sim
<i>Leopardus jacobita</i>	NC_028322.1	16.610	Não
<i>Leopardus pardalis</i>	NC_028315.1	16.712	Sim
<i>Leopardus tigrinus</i>	NC_028317.1	16.767	Sim
<i>Leopardus wiedii</i>	NC_028318.1	16.704	Sim
<i>Panthera onca</i>	NC_022842.1	17.049	Sim
<i>Puma concolor</i>	NC_016470.1	17.153	Sim
<i>Herpailurus yagouaroundi</i>	NC_028311.1	16.700	Sim

Fonte: GenBank, 2024

4.2 Alinhamento múltiplo dos felinos neotropicais

O alinhamento de sequências múltiplas (MSA) foi realizado na plataforma online do Multiple Alignment with Fast Fourier Transform (MAFFT v.7) (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>). O arquivo contendo as sequências de nucleotídeos do gene da subunidade 1 da citocromo c oxidase (COI) dos felinos neotropicais (Tabela 1) foi inserido no formato FASTA. As configurações padrão da ferramenta foram mantidas (Figura 3). O MAFFT foi escolhido por apresentar diversos recursos para MSA, de forma online e intuitiva. O método utilizado pelo software foi o MAFFT-L-INS-i, considerando o nível de similaridade e a diferença nos comprimentos da sequência (Kato et al., 2019). Utilizou-se o software Jalview v.2 (<https://www.jalview.org/>) para a exportação de trechos do MSA (Figura 3). O MSA foi realizado com a finalidade de analisar as divergências e convergências entre as espécies de felinos neotropicais, a fim de inferir a filogenia e desenhar primers para a identificação do *Herpailurus yagouaroundi*.

4.3 Análise do MSA

Utilizou-se o Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA v.11) (https://www.megasoftware.net/dload_win_gui) para a análise do alinhamento de sequências múltiplas (MSA). As sequências alinhadas foram inseridas na seção “DATA” do MEGA. A escolha desse software está relacionado a sua interface acessível e intuitiva, além de incluir uma grande coleção de métodos e ferramentas para análise evolutiva, permitindo a manipulação de conjuntos de dados de diversos tamanhos (Tamura et al., 2021). Avaliou-se as características das propriedades entre as sequências nucleotídicas, incluindo sítios conservados, sítios polimórficos e gaps.

4.4 Desenho dos primers para identificação do *Herpailurus yagouaroundi*

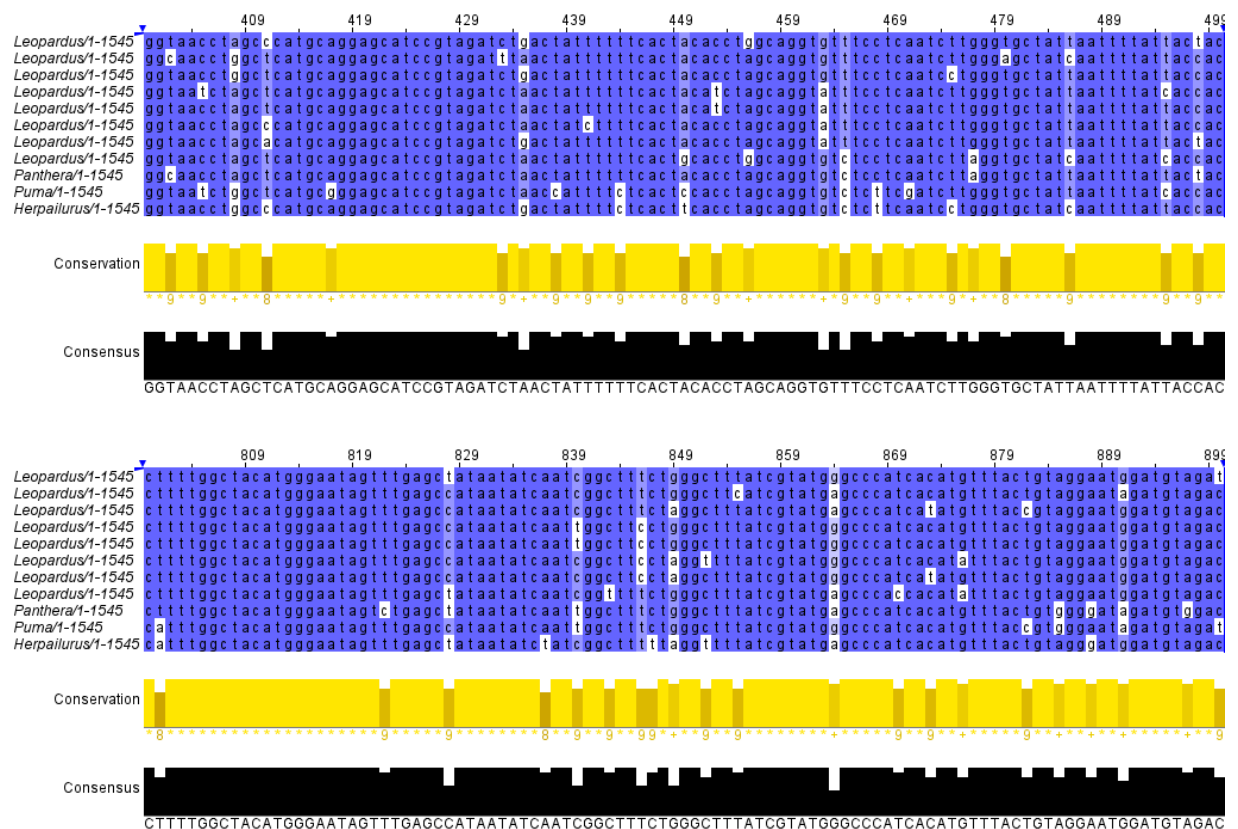
Obteram-se os primers por meio da plataforma online Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), considerando a sequência do gene COI do *H. yagouaroundi* e mantendo as configurações padrão do software. Essa ferramenta oferece gratuitamente uma ampla gama de opções, permitindo a projeção de primers novos e específicos para a espécie alvo em estudo, bem como ajustar o limite de especificidade e outras propriedades do primer (Ye et al., 2012). Os cinco pares de primers desenhados (Direto e Reverso) foram submetidos à um teste *in silico* na plataforma online Sequence Manipulation Suite (https://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html) para uma análise qualitativa. As regiões de pareamento dos pares de primers selecionados foram inseridos no Nucleotide-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a fim de avaliar quais espécies foram identificadas além da espécie alvo, considerando a aplicabilidade dos primers. Por fim, as árvores filogenéticas de felinos neotropicais (Figuras 4 e 5) foram obtidas por meio de duas plataformas online: o IQ-TREE (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>), um algoritmo de busca rápida utilizado para inferir árvores filogenéticas com base no método de máxima verossimilhança (Nguyen et al., 2015); e o ItoI (<https://itol.embl.de/>), ferramenta de fácil gerenciamento, utilizado para a visualização e extração da árvore.

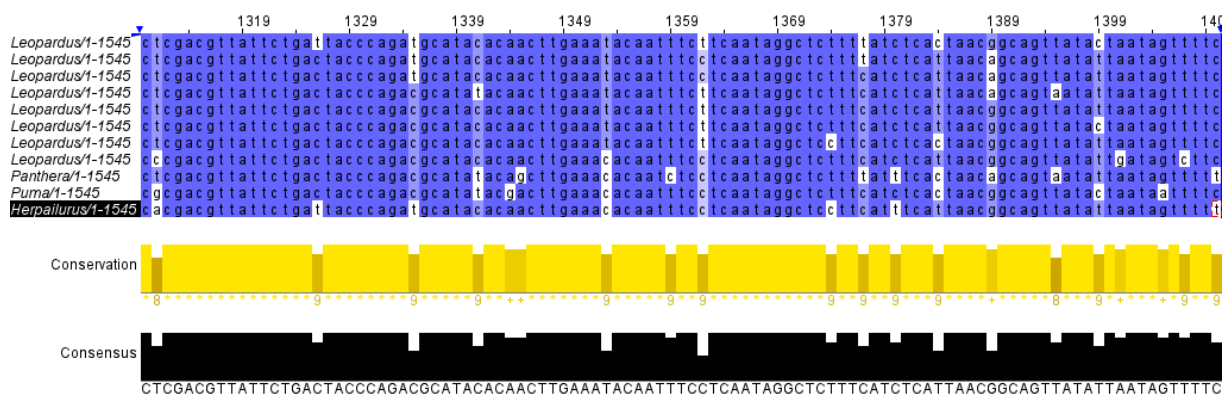
5. RESULTADOS

5.1 Alinhamento múltiplo a partir do gene da subunidade 1 da citocromo oxidase (COI) dos felinos neotropicais

O alinhamento múltiplo das sequências dos genes COI resultou em uma sequência com um comprimento de 1.545 pares de bases (pb), onde se detectou um número considerável de regiões homólogas (Figura 4), com um total de 1.147 sítios conservados e 398 sítios polimórficos. Não foram encontrados gaps no alinhamento.

Figura 3: Trechos do alinhamento múltiplo de *Herpailurus yagouaroundi* em relação a outras espécies de felinos silvestres neotropicais, com destaque para as regiões homólogas





Fonte: Jalview, 2024

5.2 Identificação do *Herpailurus yaguarondi* por meio da PCR in silico

Todos os primers (Tabela 2) projetados nesse estudo, apresentaram uma temperatura de *melting* (Tm) de 58° C no teste in silico. Na análise das demais propriedades físico-químicas dos primers, apenas os pares HF03/HR03 e HF07/HR07 foram considerados adequados para uso na técnica de PCR, uma vez que exibiram recomendações somente na Tm.

Os primers HF01 e HF09 apresentaram mais de três bases autocompletares consecutivas, que podem resultar na formação de estruturas secundárias; assim como ocorreu nos primers HF06 e HF10, que além disso, exibiram excesso nas bases nitrogenadas Guanina e Citosina, podendo formar um acoplamento de sequências ricas em GC em um dos oligonucleotídeos na PCR (GC clamp) de forma indesejável. Destaca-se também o alerta de conteúdo GC nos primers HR01, HF04, HR04, HF05 e HR06. Os primers HF02, HR02, HR05 e HR08 exibiram repetições de bases únicas GC, que tendem a comprometer sua eficiência na PCR (Hirata et al., 2006; Lorenz, 2012).

Tabela 2: Primers desenhados com base na sequência do gene COI do *Herpailurus yaguarondi* por meio da plataforma online Primer-BLAST

Primers	Sequence (5'->3')	Pb	Tm	GC%	Self comp.	Self 3' comp.
HF01	TGACATGGCATTTCCTCCGAA	20	59.96	50.00	7.00	3.00
HR01	CTGTTCATCCAGTTCCCGCT	20	60.04	55.00	3.00	0.00
HF02	TAACGTTCTTCCCCCAGCAC	20	59.96	55.00	6.00	0.00
HR02	GTAGGGAGGGGGACATCCAT	20	60.10	60.00	4.00	2.00
HF03	GAGCGGGAAGCTGGATGAACA	20	60.04	55.00	2.00	2.00
HR03	CAATGGACGAAGCCTCCCAT	20	60.11	55.00	4.00	3.00
HF04	TCCTGATCCGAGCCGAACATA	20	60.11	55.00	4.00	2.00
HR04	CGGGACTAATCAGTTGCCGA	20	59.83	55.00	6.00	2.00
HF05	TCTATTTGGTGCCTGAGCCG	20	60.11	55.00	3.00	2.00
HR05	ATAGTATGGCGGGGGACCAT	20	60.18	55.00	5.00	2.00
HF06	TATATCCGCCCTTAGCCGGT	20	60.25	55.00	4.00	2.00
HR06	ATCAATGGACGAAGCCTCCC	20	59.82	55.00	4.00	1.00
HF07	GGGAGGCTTCGTCCATTGAT	20	59.82	55.00	4.00	2.00
HR07	TCTCGCTTGGATGCAAAAGC	20	59.48	50.00	6.00	2.00
HF08	GCGGGAAGCTGGATGAACAGT	20	60.32	55.00	4.00	3.00
HR08	TAGTATGGCGGGGGACCAT	20	60.40	55.00	4.00	1.00
HF09	CATGCAGGAGCATCCGTAGA	20	59.61	55.00	4.00	0.00
HR09	CCTCCAGCAGGGTCAAAGAA	20	59.60	55.00	5.00	0.00
HF10	CTGACATGGCATTTCCTCCGA	20	60.39	55.00	7.00	1.00
HR10	TTACCGGCTAAGGGCGGATA	20	60.47	55.00	6.00	3.00

Fonte: Primer Blast, 2024

As regiões de ancoragem dos pares de primers HF03/HR03 e HF07/HR07 na sequência do gene COI do Jaguarundi, localizadas nas posições 362-381/1187-1168 e 1170-1189/1442-1423, respectivamente, foram inseridas no Nucleotide-BLAST, buscando avaliar a identificação de espécies, de forma geral, ou seja, sem selecionar espécies de interesse, como também limitando o teste a família Felidae.

Tabela 3: Espécies identificadas utilizando as regiões de ancoragem na sequência COI do *Herpailurus yaguarondi*, dos primers HF03 e HR03, projetados neste estudo por meio da PCR in silico

Filo	Espécie	Identificação via Blast	
Chordata	<i>Herpailurus yaguarondi</i>	HF03	HR03
	<i>Leptailurus serval</i>	HF03	Não
	<i>Cynoscion microlepidotus</i>	Não	HR03
Mollusca	<i>Allenconcha evansorum</i>	HF03	Não
Arthropoda	<i>Hofmannophila pseudospretella</i>	HF03	Não
	<i>Ischnura senegalensis</i>	HF03	Não
	<i>Oxynotus paradoxus</i>	HF03	Não
	<i>Mycodrosophila aff.</i>	HF03	Não
	<i>Lefroyothrips lefroyi</i>	HF03	Não
	<i>Manga melanodonta</i>	HF03	Não
	<i>Copaxa rufotincta</i>	HF03	Não
	<i>Agromyzidae</i>	HF03	Não
	<i>Bourletiella</i>	HF03	Não
	<i>Laparocerus supranubius</i>	HF03	Não
	<i>Tachypeza corticalis</i>	HF03	Não
	<i>Cordulegaster helladica</i>	HF03	Não
	<i>Catocala nubila</i>	HF03	Não
	<i>Cladotanytarsus amandus</i>	HF03	Não
	<i>Branchinecta ferox</i>	HF03	Não
	<i>Zetomimidae</i>	HF03	Não
	<i>Acrapex mondogeneta</i>	HF03	Não
	<i>Sesamia jansei</i>	HF03	Não
	<i>Trithemis kirbyi</i>	HF03	Não
	<i>Eriopinae</i>	HF03	Não
	<i>Sperchon thienemanni</i>	HF03	Não
	<i>Orius insidiosus</i>	HF03	Não
	<i>Chironomidae</i>	HF03	Não
	<i>Boisea trivittata</i>	HF03	Não
	<i>Metanema inatomaria</i>	HF03	Não
Annelida	<i>Gorpiis</i>	HF03	Não

Fonte: Nucleotide-BLAST, 2024.

Vale destacar que diversas espécies foram identificadas com um percentual de identidade de 100% no trecho entre 362 pb e 381 pb (HF03), distribuídos nos filos Chordata, Mollusca, Arthropoda e Annelida (Tabela 3). No filo Chordata, foram identificadas duas espécies da família Felidae: *Herpailurus yaguarondi* e *Leptailurus serval*. Já nas regiões de adesão do par de primer 07, as sete espécies identificadas com um percentual de identidade de 100% em pelo menos um dos trechos restringiram-se ao filo Chordata. Entre elas, cinco pertencem à família Felidae: *Herpailurus yaguarondi*, *Catopuma temminckii*, *Otocolobus manul*, *Lynx rufus* e *Puma concolor* (Tabela 4).

Tabela 4: Espécies identificadas utilizando as regiões de ancoragem na sequência COI do *Herpailurus yaguarondi*, dos primers HF07 e HR07, projetados neste estudo por meio da PCR in silico

Filo	Espécie	Identificação via Blast	
Chordata	<i>Herpailurus yaguarondi</i>	HF07	HR07
	<i>Cynoscion microlepidotus</i>	HF07	Não
	<i>Catopuma temminckii</i>	Não	HR07
	<i>Otocolobus manul</i>	Não	HR07
	<i>Lynx rufus</i>	Não	HR07
	<i>Puma concolor</i>	Não	HR07
	<i>Eptesicus fuscus</i>	Não	HR07

Fonte: Nucleotide-BLAST, 2024.

Das onze espécies de felinos neotropicais (Tabela 1), apenas duas foram identificadas nas regiões de interesse na análise in silico, *Herpailurus yaguarondi* com 100% de similaridade nos trechos de ancoragem dos pares de primers 03 e 07 (HF03/HR03 e HF07/HR07) e *Puma concolor* foi identificada apenas no trecho entre 1.423 pb e 1.442 pb, do primer HR07 (Tabela 4).

Na identificação via Blast utilizando a região de amplificação do primer 03, entre 362 e 1187, limitando a busca a família felidae, foram identificadas seis espécies, entre elas dois felinos Neotropicais, *Herpailurus yaguarondi* e *Puma concolor* (Tabela 5). Na região de amplificação do primer 07, entre 1170 a 1442, foram identificadas duas espécies da família felidae, *Herpailurus yaguarondi* e *Lynx rufus* (Tabela 6).

Tabela 5: Espécies da família Felidae identificadas no BLAST utilizando as regiões de amplificação dos primers HF03 e HR03

Filo	Espécie	Query cover	Per. Ident.
Chordata	Herpailurus yaguarondi	100%	100%
	Puma concolor	100%	90.92%
	Leptailurus serval	100%	90.44%
	Prionailurus bengalensis	98%	90.45%
	Catopuma temminckii	100%	90.07%
	Lynx rufus	99%	90.16%

Fonte: Nucleotide-BLAST, 2024.

Tabela 6: Espécies família Felidae identificadas no BLAST utilizando as regiões de amplificação dos primers HF07 e HR07

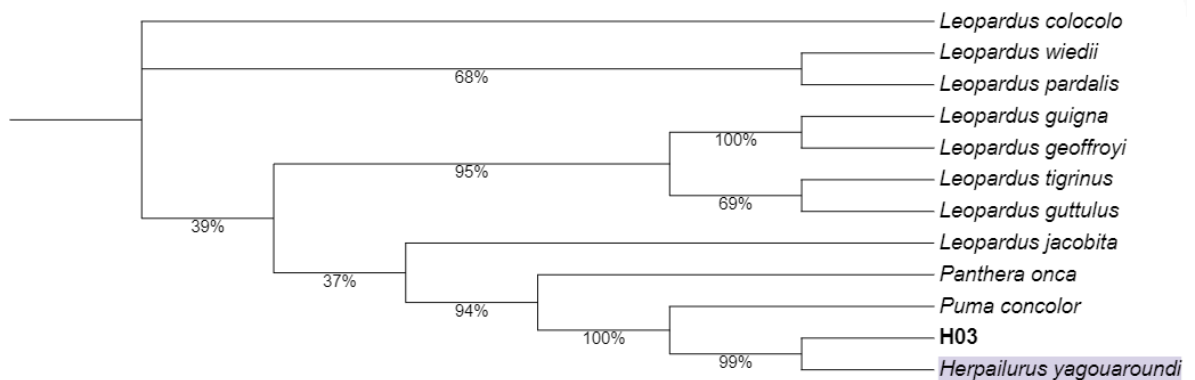
Filo	Espécie	Query cover	Per. Ident.
Chordata	Herpailurus yaguarondi	100%	100%
	Lynx rufus	100%	92.31%

Fonte: Nucleotide-BLAST, 2024.

5.3 Análise filogenética dos Felinos Neotropicais em relação às regiões de interesse

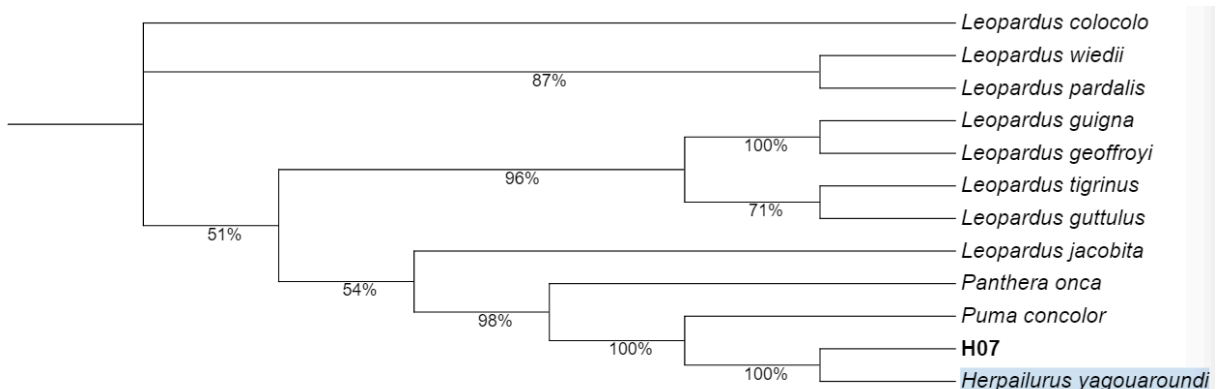
Na análise filogenética, considerando as regiões de amplificação dos primers HF03/HR03 (H03) e HF07/HR07 (H07), ambos os trechos apresentaram proximidade com o jaguarundi (*Herpailurus yaguarondi*), com valor de bootstrap de 99% (Figura 4) e 100% (Figura 5), respectivamente. Em relação às espécies neotropicais, *Puma concolor* possui maior proximidade evolutiva com o *H. yaguarondi*.

Figura 4: Árvore filogenética de felinos neotropicais em relação à região de amplificação do par de primer HF03/HR03 (H03).



Fonte: IQ tree, 2024; Itol, 2024.

Figura 5: Árvore filogenética de felinos neotropicais em relação à região de amplificação do par de primer HF07/HR07 (H07).



Fonte: IQ tree, 2024; Itol, 2024.

6. DISCUSSÃO

Como visto em outros estudos utilizando a subunidade 1 da citocromo oxidase (COI), essa é uma das regiões do mtDNA frequentemente favorecidas como marcador genético na genética forense, por permitir a identificação de espécies por meio de material genético degradado, uma vez que possui diversas cópias por célula devido a herança materna (Hebert et al., 2003; Alacs et al., 2010).

Além disso, considerou-se outras duas importantes características do mtDNA para estudos de caráter genético: a alta variabilidade intraespecífica entre indivíduos da mesma espécie, considerando aspectos evolutivos, como a mutação, quando comparados aos genes nucleares; e a ausência de recombinação entre diferentes moléculas (Avisé, 2000). Nesse sentido, as regiões conservadas e divergentes na sequência do gene COI permitem a discriminação de espécies relacionadas, como é o caso do *Herpailurus yagouaroundi*, permitindo análises filogenéticas (Figura 4), utilização de sua sequência como base para o desenho dos primers (Tabelas 3 e 4) e posterior identificação por meio da PCR e sequenciamento.

A busca por similaridade de sequência entre espécies para identificar sequências homólogas é uma etapa crucial em qualquer análise de sequências recém-estabelecidas. Uma vez identificadas, é possível afirmar por meio de considerações simples de codificação que as sequências compartilham um ancestral comum, devido a similaridade acima do esperado pelo acaso (Pearson, W. 2013; Paetkau, V. 1984). Nesse sentido, na análise *in silico*, a maioria das espécies identificadas não compartilham do mesmo nicho ecológico que o Jaguarundi e estão inseridos em outros filos, como o de Mollusca, Arthropoda, Annelida e Proteobacteria; não interferindo na coleta de amostras da espécie alvo (Tabela 3).

Os pares de primers Forward e Reverse, HF03/HR03 e HF07/HR07, projetados a partir da região do gene COI do mtDNA do Jaguarundi neste estudo, assim como suas regiões de amplificação, entre 362 pb e 1187 pb (H03) e entre 1170 a 1442 (H07) podem ser utilizadas para identificação da espécie em razão da maior especificidade em relação às demais espécies neotropicais. A T_m elevada de 58° C dos respectivos pares de primers no teste *in silico* não é vista como uma limitação no uso para identificação do Jaguarundi por meio da técnica de PCR e sequenciamento, pois o gradiente de temperatura pode ser ajustado se o

experimento não produzir resultados, sendo considerado apenas como parâmetro inicial de referência (Exxtend, 2024).

A identificação de espécies é possível por meio de uma amostragem genética não invasiva, que utiliza primers para uma região de código de barras padrão, como o gene mitocondrial COI, recomendada para predadores de topo e espécies ameaçadas, como o *H. yagouaroundi*, devido ao baixo tamanho populacional, hábitos noturnos e evasivos, tornando a observação em pesquisas de campo difícil (Zemanova, 2021). Além do mais, esse tipo de abordagem garante o bem-estar animal durante a experimentação, uma vez que não exige a captura e perturbação do animal, incluindo quaisquer efeitos no comportamento ou aptidão (Lefort, et al., 2019).

No entanto, a proporção de estudos genéticos que usam amostragem não invasiva ainda é relativamente baixa. A revisão realizada por Zemanova (2021), relatou que uma abordagem genética não invasiva usando amostras fecais permitiu uma identificação de espécies de forma mais precisa do que a morfometria fecal, ou seja, uma análise física e morfológica que pode ser utilizada para a identificação do animal em alguns casos. Outro tipo de amostra que pode ser utilizada é a saliva, sua coleta utilizando swabs bucais mostrou-se mais apropriada.

Além disso, vários estudos nesta revisão relataram que a avaliação genética não invasiva teve custos e/ou requisitos de tempo mais baixos do que outros tipos de abordagem, como a radiotelemetria, a análise micro-histológica, a amostragem letal, a amostragem invasiva e a captura viva. Nesse ponto de vista, a amostragem não invasiva possui um desempenho igualmente bom ou melhor do que outras abordagens e é uma boa alternativa à amostragem invasiva de DNA, sendo considerada adequada, apropriada e amplamente utilizada para o estudo e conservação de carnívoros selvagens.

7. CONCLUSÃO

A Genética Forense, aplicada inicialmente aos humanos, foi rapidamente adaptada para analisar outras amostras biológicas, auxiliando a justiça em casos como ataques de animais e tráfico de espécies. Técnicas como o DNA Barcoding, são eficazes para a identificação de espécies, inclusive a partir de amostras degradadas e não invasivas, solução mais indicada e com menor perturbação, indicado para animais de maior porte. Auxiliando na conservação de espécies ameaçadas, como o jaguarundi (*Herpailurus yagouaroundi*), classificado como Vulnerável no Brasil. Pesquisas específicas sobre essa espécie são essenciais para entender sua densidade demográfica, interações e ameaças, contribuindo para estratégias de conservação eficazes.

REFERÊNCIAS

- ALACS, E. A.; GEORDES, A.; FITZSIMMONS, N. N.; ROBERTSON, J. **DNA detective: a review of molecular approaches to wildlife forensics**. Forensic Science, Medicine, and Pathology, v. 6, n. 3, p. 180-194, 2010.
- ARDURA, A. et al. **DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish**. Biological Conservation, v. 143, p. 1438-1443, 2010.
- ARENAS, M.; PEREIRA, F.; OLIVEIRA, M.; PINTO, N.; LOPES, A. M.; GOMES, V.; CARRACEDO, A.; AMORIM, A. **Forensic genetics and genomics: Much more than just a human affair**. PLoS Genet., 2017 Sep 21;13(9):e1006960. doi: 10.1371/journal.pgen.1006960.
- AVISE, J. C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Cambridge: Harvard University Press, 2000.
- BIANCHI, R. D.; ROSA, A. F.; GATTI, A.; MENDES, S. L. **Diet of margay, Leopardus wiedii, and jaguarundi, Puma yagouaroundi (Carnivora: Felidae), in Atlantic Rainforest, Brazil**. Zoologia, v. 28, p. 127-132, 2011.
- BONJORNE, L.; QUEIROLO, D.; BEISIEGEL, B.; DE OLIVEIRA, T. **Avaliação do estado de conservação do Gato-mourisco Puma yagouaroundi (É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1803) no Brasil**. Biodiversidade Brasileira, v. 3, n. 1, p. 99-106, 2013.
- CARMO, R. R. **Identificação de animais silvestres de interesse criminal da fauna matogrossense por meio de DNA mitocondrial**. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva) – Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, Guarapuava, 2011. 26 p.
- CASO, A. **Diferenças espaciais e evitação local de jaguatirica (Leopardus pardalis) e jaguarundi (Puma yagouaroundi) no nordeste do México**. Tese (Doutorado em Ecologia e Manejo de Vida Silvestre) – Universidade Texas A&M, Kingsville, Texas, 2013.
- CASO, A.; DE OLIVEIRA, T.; CARVAJAL, S. V. **Herpailurus yagouaroundi**. A Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN 2015: e.T9948A50653167. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/species/9948/50653167>. Acesso em: 04 maio 2024.
- CRAWSHAW, P. G. **Comparative ecology of ocelot (Felis pardalis) and jaguar (Panthera onca) in a protected subtropical forest in Brazil and Argentina**. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) – University of Florida, 1995. 190 p.
- CUERVO, A.; HERNADEZ, J.; CADENA, C. **Lista atualizada dos mamíferos da Colômbia: anotações sobre sua distribuição**. Caldásia, v. 15, p. 471-501, 1986.
- DA SILVA, F. **Genética Forense: Uma Ferramenta para a conservação da fauna dos campos gerais do Paraná**. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva) – UEPG, 2022.

DE OLIVEIRA, T. G. **Herpailurus yagouaroundi**. Mammalian Species, v. 578, p. 1-6, 1998.

DE OLIVEIRA, T. G.; CASSARO, K. **Guia de Identificação dos Felinos Brasileiros**. São Paulo: Sociedade de Zoológicos do Brasil, 1997. 60 p.

DE OLIVEIRA, T. G.; TORTATO, M. A.; SILVEIRA, L.; KASPER, C. B.; MAZIM, F. D.; LUCHERINI, M.; JÁCOMO, A. T.; SOARES, J. B. G.; MARQUES, R. V.; SUNQUIST, M. E. **Ocelot ecology and its effect on the small-felid guild in the lowland Neotropics**. In: MACDONALD, D. W.; LOVERIDGE, A. J. (ed.). **Biology and Conservation of Wild Felids**. Oxford: Oxford University Press, 2010. p. 563-574.

DO CARMO, R. R. et al. **Identificação de Espécies de Animais Silvestres por Meio de Sequências Mitocondriais Utilizados no Combate aos Crimes Contra a Fauna – Mato Grosso – Brasil**. Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics, v. 6, p. 378-404, 2017.

DOS SANTOS. **As principais linhas da biologia forense e como auxiliam na resolução de crimes**. Revista Brasileira de Criminalística, v. 7, n. 3, p. 12-20, 2018.

DOTTA, G.; QUEIROLO, D.; SENRA, A. **Distribuição e situação de conservação de pequenos felinos na ecorregião da savana uruguaia, sul do Brasil e Uruguai**. In: HUGHES, J.; MERCER, R. (ed.). **Felid Biology and Conservation Conference**, 17-19 set., 2007.

EXXTEND. **Qual a temperatura de anelamento dos primers para PCR?**.

Disponível em:

<https://www.exxtend.com.br/faq#:~:text=Qual%20a%20temperatura%20de%20anelamento,para%20encontrar%20a%20temperatura%20ideal>. Acesso em: 18 set. 2024.

FACURE, K. G.; GIARETTA, A. A. **Food habits of carnivores in a Coastal Atlantic Forest of Southeastern Brazil**. Mammalia, v. 60, p. 499-502, 1996.

GARRIDO, R. G.; RODRIGUES, E. L. **Contribuições da biologia molecular para a proteção animal e a investigação dos crimes contra a fauna**. Simioses, v. 11, p. 32-38, 2017.

GRISOLIA, A.; COTULIO, V. **Molecular Markers and Genetic Diversity in Neotropical Felids**. ResearchGate, 2012.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J. R. **Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species**. Proceedings of the Royal Society of London - B Biological Sciences, (Suppl.), v. 270, p. S96-S99, 2003.

HIRATA, M. H.; TAVARES, V.; HIRATA, R. D. C. **Da biologia molecular à medicina: métodos comumente utilizados em farmacogenética**. *Medicina (Ribeirão Preto)*, v. 39, n. 4, p. 522-534, 2006.

PORTELLA, T. P. **Armadilhas de pêlos como método de amostragem não-invasiva para felídeos neotropicais**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso

(Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

Proceedings of the Royal Society of London - B Biological Sciences, (Suppl.), v. 270, p. S96-S99, 2003.

HEPP, D.; DE NONOHAY, J. **A importância das técnicas e análises de DNA**. *Scientia Tec: Revista de Educação, Ciência e Tecnologia do IFRS – Campus Porto Alegre*, v. 3, n. 2, p. 114-124, jun./dez. 2016.

JOSE, D.; HARIKRISHNAN, M. **Non-homologous COI barcode regions: a serious concern in decapod molecular taxonomy**. *Mitochondrial DNA Part A*, v. 4, p. 482-492, 2016. DOI: 10.3109/19401736.2015.1137902.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. **Serviço online MAFFT: alinhamento de sequências múltiplas, escolha de sequência interativa e visualização**. *Briefings in Bioinformatics*, v. 20, n. 4, p. 1160–1166, jul. 2019. DOI: 10.1093/bib/bbx108.

KONECNY, M. J. **Movement patterns and food habits of four sympatric carnivore species in Belize, Central America**. In: REDFORD, K. H.; EISENBERG, J. F. (ed.). *Advances in Neotropical Mammalogy*. Florida: Sandhill Crane Press, 1989. p. 243-264.

LAGUARDIA, A.; WANG, J.; SHI, F.-L.; SHI, K.; RIORDAN, P. **Species identification refined by molecular scatology in a community of sympatric carnivores in Xinjiang, China**. *Zoological Research*, v. 36, n. 2, p. 72–78, 2015.

LEFORT, M. C.; CRUICKSHANK, R. H.; DESCOVICH, K.; ADAMS, N. J.; BARUN, A.; EMAMI-KHOYI, A.; RIDDEN, J.; SMITH, V. R.; SPRAGUE, R.; WATERHOUSE, B.; et al. **Sangue, suor e lágrimas: uma revisão da amostragem de DNA não invasiva**. *bioRxiv*, 2019. DOI: 10.1101/385120.

LINACRE, A.; TOBE, S. S. **An overview to the investigative approach to species testing in wildlife forensic science**. *Investigative Genetics*, v. 2, p. 2-9, 2011.

LINDQUIST, C. D.; WICTUM, E. J. **Less is more: optimization of DNA extraction from canine feces**. *Journal of Forensic Sciences*, v. 61, n. 1, p. 212-218, 2016. DOI: 10.1111/1556-4029.12913.

MANZANI, P. R.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. **Notes on the food habits of the jaguarundi, *Felis yagouaroundi* (Mammalia: Carnivora)**. *Mammalia*, v. 53, p. 659-660, 1989.

MATTERN, M. Y.; MCLENNAN, D. **Phylogeny and speciation of felids**. *Cladistics*, v. 16, n. 2, p. 232-253, 2000.

MICHALSKI, F.; CRAWSHAW, P. G. JR.; DE OLIVEIRA, T. G.; FABIAN, M. E. **Notes on home range and habitat use of three small carnivore species in a disturbed vegetation mosaic of southeastern Brazil**. *Mammalia*, v. 70, p. 52-57, 2006.

MICHALSKI, F.; PERES, C. A. **Anthropogenic determinants of primate and carnivore local extinctions in a fragmented forest landscape of southern Amazonia.** *Biological Conservation*, v. 124, p. 383-396, 2005.

MITRA, I.; ROY, S.; HAQUE, I. **Application of molecular markers in wildlife DNA forensic investigations.** *Journal of Forensic Science and Medicine*, v. 4, p. 156-160, 2018.

MONROY-VILCHIS, O.; SANCHEZ, O.; URIOS, V. **Consumption of an adult *Puma yagouaroundi* (Felidae) by the snake *Boa constrictor* (Boidae) in central Mexico.** *Revista Mexicana de Biodiversidad*, v. 82, p. 319–321, 2011.

NAKANO-OLIVEIRA. **Ecologia alimentar de área de vida de carnívoros da Floresta Nacional de Ipanema, Iperó, SP (Carnivora: Mammalia).** 2002. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 2002.

NGUYEN, H.; SCHMIDT, H. A.; HAESLER, A. V.; MINH, B. Q. **IQ-TREE: Um algoritmo estocástico rápido e eficaz para estimar filogenias de máxima verossimilhança.** *Molecular Biology and Evolution*, v. 32, n. 1, p. 268–274, jan. 2015. DOI: 10.1093/molbev/msu300.

NOWAK, R. M. **Walker's carnivores of the world.** The Johns Hopkins University Press, 2005.

NOWELL, K.; JACKSON, P. **Gatos selvagens. Levantamento da situação e plano de ação para conservação.** IUCN/SSC Cat Specialist Group, Gland, Suíça e Cambridge, Reino Unido, 1996.

OLIVEIRA, P. V. et al. **Utilização do DNA Barcoding na ciência animal.** In: *Tópicos especiais em Ciência Animal*. v. 1, Capítulo 3, p. 41-48, 2016.

OLIVEIRA, T. G.; TORTATO, M. A.; SILVEIRA, L.; KASPER, C. B.; MAZIM, F. D.; LUCHERINI, M.; JÁCOMO, A. T.; SOARES, J. B. G.; ROSANE, V. M.; SUNQUIST, M. **Ocelot ecology and its effects on the small-felid guild in the lowland neotropics.** In: MACDONALD, D. W.; LOVERIDGE, A. J. (ed.). *Biology and conservation of wild felids*. Oxford: Oxford University Press, 2010. p. 559-580.

OLIVEIRA, T. G. **Ecologia e conservação de pequenos felinos no Brasil e suas implicações para o manejo.** 2011. Tese (Doutorado em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

OLSON, Z. H.; WHITTAKER, D. G.; RHODES JR., O. E. **The use of molecular markers in wild sheep research in North America: a review.** *Proceeding of the Northern Wild Sheep and Goat Council Biennial Symposium*, v. 16, p. 251–269, 2009.

PAETKAU, V. **Uma nova regra para analisar sequências de codificação homólogas em DNA**. *Pesquisa de Ácidos Nucleicos*, v. 12, n. 1 Pt 1, p. 159-173, 1984. DOI: 10.1093/nar/12.1Part1.159.

PEARSON, W. **An introduction to sequence similarity (“homology”) searching**. *Current Protocols in Bioinformatics*, v. 42, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0301s42>.

ROCHA, E. C.; DALPONTE, J. C. **Composição e caracterização da fauna de mamíferos de médio e grande porte em uma pequena reserva de cerrado em Mato Grosso, Brasil**. *Revista Árvore*, v. 30, p. 669-678, 2006.

SANCHES, A. et al. **Illegal hunting cases detected with molecular forensics in Brazil**. *Investigative Genetics*, v. 3, n. 1, p. 1–5, 2012.

SANCHEZ, O.; RAMIREZ-PULIDO, J.; AGUILERA-REYES, U.; MONROY-VILCHIS, O. **Felid records from the state of Mexico, Mexico**. *Mammalia*, v. 66, p. 289–294, 2002.

SANTOS, M. F.; PELLANDA, M.; TOMAZZONI, A. C.; HASENACK, H.; HARTZ, S. M. **Mamíferos carnívoros e sua relação com a diversidade de habitats no Parque Nacional dos Aparados da Serra, sul do Brasil**. *Iheringia Série Zoologia*, v. 94, p. 235-245, 2004.

SENDAS, P. **Um olhar sobre a coleção de mamíferos do Museu Goeldi**. *Museu Paraense Emílio Goeldi*, 2018. Disponível em: <https://www.museu-goeldi.br/noticias/um-olhar-sobre-a-colecao-de-mamiferos-do-museu-goeldi-3#:~:text=Felinos%20silvestres%20%E2%80%93%20Na%20regi%C3%A3o%20Neotropical,19%20esp%C3%A9cies%20da%20fam%C3%ADlia%20Felidae>. Acesso em: 23 jul. 2024.

SILVEIRA, F. **Fauna Digital do Rio Grande do Sul**. *Bird and Mammal Evolution, Systematics and Ecology Lab - UFRGS*, 2018. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/faunadigitalrs/mamiferos/ordem-carnivora/familia-felidae/>. Acesso em: 20 maio 2024.

SUNQUIST, M.; SUNQUIST, F. **Wild cats of the world**. The University of Chicago Press, 462 p., 2002.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. **MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11**. *Molecular Biology and Evolution*, v. 38, p. 3022-3027, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

TÓFOLI, C. F.; ROHE, F.; SETZ, E. Z. F. **Jaguarundi (*Puma yagouaroundi*) (Geoffroy, 1803) (Carnivora, Felidae) food habits in a mosaic of Atlantic Rainforest and eucalypt plantations of southeastern Brazil**. *Brazilian Journal of Biology*, v. 69, p. 871-877, 2009.

TROLLE, M.; NOSS, A. J.; LIMA, E. D. S.; DALPONTE, J. C. **Camera-trap studies of maned wolf density in the Cerrado and the Pantanal of Brazil**. *Biodiversity and Conservation*, v. 16, p. 1197-1204, 2007.

TROVATI, R. G. **Monitoramento radiotelemétrico de pequenos e médios carnívoros na área de influência da UHE Luiz Eduardo Magalhães/Lajeado – TO**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 72 p., 2004.

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B. C.; REMM, M.; ROZEN, S. G. **Primer3--new capabilities and interfaces**. *Nucleic Acids Research*, v. 40, n. 15, 2012.

WHEELER, Q. D. **The New Taxonomy**. CRC Press, *Systematics Association Special Volumes Series*, v. 76, 237 p., 2008.

ZEMANOVA, M. A. **Noninvasive genetic assessment is an effective wildlife research tool when compared with other approaches**. *Genes*, v. 12, n. 11, p.1672, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes12111672>.