

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA
BIODIVERSIDADE**

Comportamento, hormônios fecais e condição energética: uma avaliação sobre como micos-leões-da-cara-dourada lidam com florestas degradadas

[Fn1] Comentário: Revisei um pouco as referências que usei para escrever este projeto, realmente não tem muito sentido falar de balanço energético mas sim de condição energética dos indivíduos.

“Apesar de suas limitações para diferenciar entre tipos de estressores em um meio naturalista, marcadores de estresse energético proporcionam uma importante maneira de verificar nossas suposições sobre como fatores como a disponibilidade de alimento afetam aos primatas”.
(Emery-Thompson, 2016)

Orientador/e-mail: Leonardo de Carvalho Oliveira / leonardoco@gmail.com

Co-orientador/e-mail: Kristel De Vleeschouwer / kristel.devleeschouwer@kmda.org

Nome do Candidato/e-mail: Roberto Fiorini Torrico / beto.torrini@gmail.com

Nível/Ano de ingresso: Doutorado/ 2019

Ilhéus, 5/12/2019

RESUMO

A fragmentação e perda de habitat tem alterado a disponibilidade de recursos alimentares para muitas espécies, o que, junto a outros fatores, determinam a condição energética de um indivíduo e, portanto, sua aptidão. O estado energético de um animal, que resulta do equilíbrio entre aquisição e gasto de energia, é amplamente modulado por fatores comportamentais, psicológicos e ambientais, que por sua vez são afetados por perturbações antrópicas. Em vista do grave estado de conservação de certas populações originado principalmente por tais perturbações, os pesquisadores tem considerado o uso de marcadores fisiológicos não invasivos como um meio de sinalizar a resposta endócrina à mudanças externas no ambiente de um indivíduo. Aqui, propomos analisar os padrões de atividade de mico-leões-de-cara-dourada (MLCDs), *Leontopithecus chrysomelas*, primata endêmico da Mata Atlântica do Sul da Bahia e a fenologia de espécies vegetais de sua dieta para relaciona-los as variações nos níveis de glicocorticoides fecais e triiodotironina fecal e com isso avaliar a condição energética dos indivíduos estudados. Em específico, pretendemos investigar quais estratégias de forrageamento permitem aos MLCDs sobreviver em habitats degradados, assumindo que a variação na disponibilidade de recursos nesses habitats é mais crítica do que em habitats não degradados. Deste modo, examinaremos até que ponto o estresse nutricional pode afetar negativamente a capacidade de um indivíduo adulto para equilibrar a entrada e o gasto de energia, prejudicando futuramente suas chances de sobrevivência e reprodução.

INTRODUÇÃO

Muitas espécies de primatas enfrentam o desafio de acessar fontes de alimento em fragmentos florestais pequenos e isolados (Arroyo-Rodríguez et al., 2005) onde a disponibilidade de alimentos pode ser reduzida. Compreender se os alimentos que os primatas obtêm em seu ambiente é suficiente para suprir suas demandas energéticas é uma das principais preocupações para avaliar o impacto da degradação de um habitat (Gesquiere et al., 2018). Para abordar esta questão podemos estudar a inter-relação entre comportamento de forrageamento, disponibilidade de alimentos e fisiologia nutricional (Birnie-Gauvin et al., 2017). Este tipo de estudo deve documentar o comportamento alimentar em relação às variações na disponibilidade de alimentos (Adeola et al., 2014), explicar os mecanismos para lidar com essas mudanças (Martin, 1987) e a medição do estado fisiológico dos indivíduos deve permitir várias coletas (Emery Thompson, 2016). Um conjunto de marcadores fisiológicos que atende a esses requisitos são hormônios fecais como os glicocorticoides (GCs) e a triiodotironina (T3). Os GCs aumentam os níveis de glicose quando o indivíduo enfrenta um desafio (Emery Thompson, 2016) e têm sido associado ao estresse energético devido à baixa qualidade do habitat (Jaimez et al., 2012) e à escassez sazonal de alimentos (Gesquiere et al., 2018). Enquanto que a T3 participa na regulação do balanço energético em vertebrados, que ajustam sua secreção para reduzir a taxa metabólica basal e poupar energia (Eales, 1988). Apesar da T3 ter uma relação mais próxima à condição energética e não ser influenciada pelo estresse psicológico (Wasser et al., 2010), não tem recebido tanta atenção pela comunidade científica. No entanto, autores aconselham combinar o estudo de ambos os hormônios para poder separar o estresse nutricional do não nutricional (Dias et al., 2017).

Propomos estudar mico-leões-de-cara-dourada (MLCDs), *Leontopithecus chrysomelas* que

por sua distribuição restrita e constante redução do habitat (De Vleeschouwer & Raboy, 2013) estão classificados como Em Perigo de Extinção (IUCN, 2015). Sua dieta consiste principalmente de frutas, insetos e pequenos vertebrados (Raboy & Dietz, 2004). Embora a ausência de uma estação seca acentuada no sul da Bahia possa sugerir a presença contínua de alimentos (Catenacci et al., 2016), Pessoa et al. (2012) encontraram que em florestas mais degradadas a disponibilidade de frutos pode variar significativamente durante o ano, o que poderia provocar estresse nutricional em MLCs que habitam estas áreas. Além disso, existem alguns recursos típicos de florestas avançadas como as bromélias do gênero *Aechmea* (Raboy et al., 2004; Oliveira et al., 2010) utilizadas frequentemente pelos MLCs para obter presas. Os MLCs também podem experimentar restrições energéticas devido ao alto custo de reprodução e cuidado de filhotes (Dietz et al., 1994; Tardif et al., 2002). Particularmente na área de estudo proposta foi encontrado que os MLCs experimentam limitações de espaço e alimento o qual afeta os seu orçamento de atividades (Coutinho, 2018) e acarreta consequências negativas para a sua saúde (Costa, 2019). Por tanto é necessário investigar como a abundância de alimento em fragmentos florestais degradados desencadeia certas respostas comportamentais e fisiológicas em MLCs e se estes mecanismos de resposta são eficientes para enfrentar os desafios ambientais que seu habitat impõe.

OBJETIVOS

A pergunta do presente projeto é: como o estresse em MLCs se relaciona a diferentes aspectos comportamentais e a disponibilidade de alimentos vegetais em uma área de floresta fragmentada? Nosso principal objetivo é avaliar a condição energética ligada ao estresse nutricional através de metabólitos fecais específicos e relacionar suas variações ao comportamento de MLCs e a disponibilidade de alimentos vegetais em uma área de floresta fragmentada de Una no sul da Bahia. Ao fazer isso, pretendemos entender se os MLCs podem efetivamente lidar com os desafios energéticos do habitat perturbado. Para cumprir este objetivo consideramos necessário desenvolver os seguintes passos:

- 1) Validar os testes de GCs e T3 para amostras fecais e diferenciar as concentrações de ambos os hormônios em categorias individuais como sexo, dominância, idade e estado reprodutivo.
- 2) Relacionar as variações nos níveis de hormônios fecais aos comportamentos associados à aquisição e gasto energético e à disponibilidade de alimentos vegetais, para assim identificar como estratégias de forrageamento dos MLCs afetam os níveis de hormônios fecais.
- 3) Finalmente, identificar os itens alimentares que são mais selecionados respeito à disponibilidade total de alimentos, em especial quando os MLCs se encontram baixo estresse ou enfrentam baixa disponibilidade de alimentos vegetais. Assim, determinaremos possíveis recursos-chave que desempenham um papel importante para a provisão energética de indivíduos em ambientes antropizados.

METODOLOGIA

Área e sujeitos de estudo

A amostragem será realizada entre janeiro e dezembro de 2020 em uma área composta por fragmentos florestais secundários e cultivos agrícolas que abrangem aproximadamente 2

Km². Esta área encontrasse contida na área de estudo do Projeto BioBrasil (Figura 1), localizada no sul da Bahia, nordeste do Brasil, no município de Una (15 ° 17' S, 39 ° 08' O). O clima regional é quente e úmido, e caracterizado pela ausência de um período seco sazonal (Mori et al., 1983). A precipitação média é de aproximadamente 2000 mm/ano e as temperaturas médias estão em torno aos 24 °C, com pouca oscilação durante o ano (Thomas et al., 1998). Na área de estudo, 33 exemplares de MLCDs pertencentes a 4 grupos habitados (Ribeiro (RIB; N = 6), Ozawa (OZA; N = 6), Manoel Rosa (MRO; N = 8) e Elias (ELI; N = 13)) são atualmente monitorados, como parte do programa de pesquisa do Projeto BioBrasil. Estes grupos são acompanhados de 1 a 4 dias por semana através do uso de radiotelemetria, durante cada acompanhamento certos parâmetros como padrões de deslocamento, comportamento básico e uso de recursos são registrados. Além disso, os grupos são capturados duas vezes por ano para trocar os rádio colares, verificar as condições dos indivíduos e tomar medidas biométricas, como o peso. Após este procedimento, cada indivíduo novo recebe uma tatuagem numérica e todos recebem uma marca de tinta, a fim de facilitar a sua identificação na floresta.

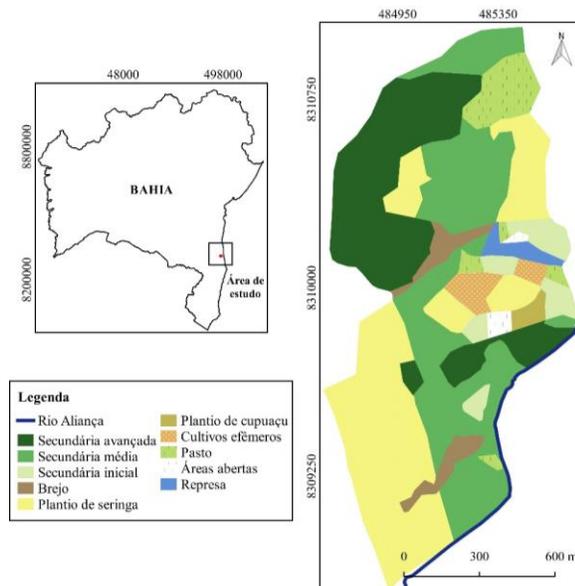


Figura 1. Localização da área de estudo representada pelo ponto vermelho no mapa à esquerda e à direita os diferentes tipos de vegetação e intervenções antrópicas encontradas nessa área (fonte: Coutinho, 2018).

Dado que o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) tende a ser mais sensível à medida que as espécies de mamíferos envelhecem (Sapolsky et al., 1985; Sapolsky & Altmann, 1991), tornando-os mais vulneráveis ao estresse, documentaremos o comportamento e coletaremos amostras fecais apenas de indivíduos adultos de ambos os sexos. Consideraremos 4 indivíduos adultos (dois machos e duas fêmeas) dos grupos OZA, MRO e ELI, tendo em total 12 MLCDs. Outros fatores intrínsecos também influenciam a resposta fisiológica às mudanças

[Fn2] Comentário: Decidi manter 4 indivíduos (entre machos e fêmeas) em cada grupo para assim poder repartir equitativamente o número de focais por indivíduo, além de mais tarde comparar essas variações entre sexo o qual proponho como objetivo. Se considerarmos somente machos (10 em total entre adultos e jovens dos 3 grupos) teríamos um número desigual de indivíduos por grupo.

ambientais e distúrbios antropogênicos (Dantzer et al., 2014). Conseqüentemente, acompanharemos o status reprodutivo das fêmeas e o grau de dominância de ambos os sexos, categorizando as fêmeas como não reprodutoras, lactantes e grávidas (Sheriff et al., 2011) e todos os indivíduos entre dominantes e subordinados. Se a fêmeas fosse a única reprodutora do grupo e o macho o que liderasse as brigas de encontro com outros grupos, além de que ambos apresentassem comportamento de dominantes dentro dos grupos (maior acesso ao indivíduo reprodutor, andar em arco, maior número de montas e perseguição), esses indivíduos estariam classificados como dominantes (French et al., 2003; Bales et al., 2005).

Disponibilidade de alimentos vegetais

Seguindo o procedimento realizado por Coutinho (2018) na nossa área de estudo, propomos estabelecer parcelas de 20X10 m em 5 fitofisionomias. Distribuiremos aleatoriamente entre as 3 áreas de vida dos grupos alvo um total de 44 parcelas; na floresta secundária avançada (SA) estabeleceremos 12 parcelas, na floresta secundária média (SM) 12 parcelas, na floresta secundária inicial (SI) 8 parcelas, em brejos (BR) 6 parcelas, e em plantios (PL) diversos (seringa-cacau, seringa-banana, seringa e cabruca) 6 parcelas. O número de parcelas por fitofisionomia, determinado previamente por Coutinho (2018), define o ponto onde a riqueza de espécies vegetais alcança o número máximo de espécies. Para levar em consideração a influência da borda, colocaremos parcelas a partir de 30 a 50 m do limite entre fitofisionomias, respeitaremos distâncias maiores da borda quando existir maior contraste estrutural e de composição entre fitofisionomias, por exemplo entre SA e PL (Harper et al., 2005). A distância mínima entre parcelas será de 50 m (Pessoa et al., 2016).

Dentro das parcelas mediremos o diâmetro à altura do peito e contaremos todas as árvores com diâmetro maior ou igual a 10 cm. Na etapa de levantamento florístico, marcaremos com etiquetas metálicas codificadas todos os indivíduos das 23 espécies arbóreas alimentícias frequentemente consumidas pelos MLCDs (ver Anexo 1). Os MLCDs consomem uma grande diversidade de plantas mas selecionamos as espécies que no estudo de Catenacci et al. (2016) foram consumidas por um tempo maior ou igual a 5% do tempo total dedicado ao consumo de espécies vegetais em um mês. Então, complementamos esta lista com todas as espécies que no estudo de Coutinho (2018) receberam pelo menos 2% do total de visitas pelos 3 grupos de MLCDs observados.

Após isso, monitoraremos mensalmente durante um ano e simultaneamente com as amostragens de comportamento a fenologia das 23 espécies arbóreas chave. Para isso, avaliaremos a fenofase dessas espécies, examinando o estágio de frutificação ou floração das árvores marcadas através da escala de Fournier (1974) a qual mede a proporção do volume da copa coberto com frutas ou flores. Esta escala varia de 0 a 4 (0 = ausência de frutificação ou floração, 1 = 1 a 25% da copa, 2 = 26 a 50% da copa, 3 = 51 a 75% da copa, 4 = 76 a 100% da copa).

Amostragem comportamental

Conduziremos observações focais por um período de 10 min nos 12 micos-leões adultos dos três grupos selecionados, alternando de indivíduo após 10 min de intervalo. Todos os dias, antes de começar as observações, localizaremos os grupos com ajuda de um assistente de campo e da radio-telemetria e os seguiremos continuamente desde o momento que deixam o

local de dormida até que retornam à um abrigo antes do anoitecer. Neste período, registraremos todas as atividades relacionadas à aquisição e gasto energético das quais depende o nível de estresse nutricional. No entanto, as variações hormonais que desejamos avaliar são provocadas tanto por estressores energéticos como psicológicos, pelo que é importante que o catálogo de comportamentos consiga incluir ambos tipos de estressores. Para fazer isso, nos basearemos no etograma definido por Raboy & Dietz (2004) com algumas alterações seguindo a amostragem comportamental de estudos com questões similares as nossas (Dias et al., 2017; Foerster & Monfort, 2010; Foerster et al., 2012). Ver Anexo 2.

Para estudar o esforço de alimentação e a ingestão de alimentos, cronometraremos o tempo que o indivíduo se encontre forrageando e comendo frutas, forrageando e comendo flores, forrageando e comendo animais (Raboy & Dietz, 2004). Nesta última categoria levaremos em conta o tipo de substrato manipulado. Cada categoria será cronometrada quando percebermos que o indivíduo toca ou começa a procurar o item alimentar. A partir do momento que a atividade de forrageio iniciar, contabilizaremos as vezes em que o indivíduo é observado comendo, mastigando ou segurando na mão o item alimentar, isto para estimar a proporção em que a procura por alimento resulta efetivamente em ingestão. Adicionalmente, quando possível, as espécies vegetais visitadas para alimentação serão identificadas.

Por outro lado registraremos o tempo que o indivíduo se encontra em locomoção, parado ou descansando, estes envolvem gastos energéticos referidos ao custo de deslocamento. Permanecer parado e descansando diferem entre si em que o primeiro registra-se sempre que o indivíduo não estiver se deslocando ou envolvido em qualquer outra atividade (pode se encontrar estático observando ou se coçando), e o segundo sempre que o indivíduo seja observado deitado (inclusive se encontrado sobre outro membro do grupo), descansando sobre o peito ou dormindo (Raboy & Dietz, 2004). É válido esclarecer que o tempo cronometrado na locomoção não inclui o tempo que o indivíduos se desloca para defender o território durante os encontros com outros grupos, dentro de locomoção consideramos o deslocamento realizado para trocar de item alimentar ou sitio de forrageio. Para complementar este conjunto de comportamentos, estimaremos o deslocamento diário do grupo salvando as coordenadas geográficas em um GPS portátil toda vez que iniciarmos o focal de um indivíduo (Coutinho, 2018), ou seja, a cada 20 minutos. Mais tarde, calcularemos a distância percorrida do grupo com os pontos GPS marcados usando ArcGIS 10.7.1.

Para discriminar a influência de estressores psicológicos sobre a resposta endócrina à estressores energéticos, precisamos considerar a contribuição de interações sociais, agressivas e não agressivas. Portanto, registraremos o tempo de conflitos intergrupais que envolvem o indivíduo observado, normalmente este comportamento inicia com a vocalização característica deste comportamento e o deslocamento do indivíduos no intuito de encontrar o outro grupo de MLCDs. Dentro da categoria de interação social não agressiva, cronometraremos os eventos de catação, tanto recebidos como dados e o tempo que o indivíduo brinca perseguindo ou sendo perseguido por outro membro, esta informação é importante para entender a influência de comportamentos empáticos no alívio do estresse.

Este procedimento será repetido após a conclusão da amostragem comportamental dos 12 indivíduos adultos, mais ou menos a cada mês ao longo do ano da amostragem focal.

Coleta e processamento fecal

As amostras fecais serão coletadas no campo imediatamente após sua excreção e armazenadas em tubos de polipropileno de 30 ml, marcados com a data, hora e indivíduo que depositou as fezes. Vamos amostrar apenas fezes frescas não contaminadas por urina, pois isso pode modificar o nível de metabólitos nas fezes (Behringer & Deschner, 2017). Para preservá-las em campo, vamos submergir completamente as amostras em etanol 95 % logo e fechar bem a tampa para evitar vazamentos (Palme, 2005). Ao finalizar o dia, armazenaremos todas as amostras fecais no escuro à temperatura ambiente até serem transferidas para um freezer a -20 °C (Terio et al., 2002). Todas elas, exceto as amostras fecais para validação, serão tomadas em conjunto com as observações comportamentais, para que assim possamos estabelecer paralelismos entre a variação nas concentrações de metabólitos e o comportamento observado. Coletaremos amostras dos 12 indivíduos durante os seus respectivos focais assim como fora deles quando observarmos eles defecar, isto a fim de assegurar um tamanho de amostra de pelo menos duas amostras fecais por indivíduo por mês (Dias et al., 2017).

Depois de completar a amostragem comportamental e a coleta de fezes dos 3 grupos, prosseguiremos com a preservação a longo prazo. Para esta etapa as amostras deverão ser transportadas para as instalações laboratoriais da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), onde iniciaremos o processamento das amostras. Primeiro, abriremos as tampas dos tubos de plástico e deixaremos o etanol evaporar à temperatura ambiente dentro de um exaustor (Terio et al., 2002). Todas as amostras descongeladas serão desidratadas por um processo de liofilização e depois transferidas para pequenas bolsas Mylar (8 x 12 cm) previamente codificados contendo um único saco absorvente de oxigênio. Em seguida, as amostras embaladas serão seladas a vácuo e armazenadas em um refrigerador.

O nosso esforço mensal de amostragem, ao qual designamos com o nome de sessão de amostragem, inclui a amostragem fecal e comportamental, os levantamentos de disponibilidade de alimentos vegetais e as etapas iniciais do processamento das amostras ocorrerão durante o ano 2020. Nos primeiro semestre do ano 2021 será realizada a extração dos metabólitos fecais também na UESC, para isso as amostras desidratadas serão primeiro trituradas com um almofariz e depois peneiradas para remover fibras e sementes grandes (> 2 mm de diâmetro) (Foerster & Monfort, 2010). Tomaremos uma alíquota de 0,2 g da amostra fecal seca, previamente homogeneizada e adicionaremos à ela 5 ml de metanol 80 % para extrair os metabólitos hormonais (Palme et al., 2013; Wark et al., 2016). Em seguida, a alíquota será misturada em um agitador por 1 hora e centrifugada a 2500 RPM por 20 min (Wark et al., 2016). O sobrenadante que contém os metabólitos hormonais será transferido a um pequeno tubo à prova de evaporação e derrame, e armazenado a -20 °C antes da medição dos metabólitos hormonais, a qual deve ocorrer antes de 6 meses a partir da extração hormonal (Galama et al., 2004; Wark et al., 2016).

[Fn3] Comentário: Os assistentes de pesquisa já possuem experiência coletando amostras de fezes. As amostras contaminadas com urina ou com outros materiais serão descartadas.

Validação de GCs e T3 fecal

Pretendemos desenvolver os procedimentos explicados a seguir no Laboratório Interdisciplinar de Análises Clínicas (Interlab-UMU), em Murcia, Espanha no ano de 2021, para o qual realizaremos o cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN, prepararemos um acordo de remessa de material entre o Interlab-UMU e a UESC e obteremos as licenças CITES para a exportação do material do Brasil e importação dos mesmos para Espanha. Para embalagem das amostras seguiremos as normas da Associação Internacional de Transporte Aéreo (IATA).

A fim de assegurar que os ensaios detectem adequadamente as alterações fisiológicas no sistema endócrino, eles precisam ser validado para a espécie e a matriz envolvida no estudo. Portanto, realizaremos a validação analítica e biológica do imunoensaio enzimático (IEE) de GCs e T3 fecais em MLCDs. Para o primeiro tipo de validação, testaremos certos critérios como a sensibilidade (nível mínimo de detecção dos hormônios), precisão (repetibilidade entre ensaios), exatidão (capacidade de detectar o mesmo nível hormonal) e especificidade (especificidade do anticorpo e a influência de substâncias interferentes da matriz) (Hodges & Heistermann, 2011). Para realizar a validação analítica de ambos os metabólitos fecais, revisaremos e seguiremos os procedimentos descritos por Hodges & Heistermann (2011), Sheriff et al. (2011), Andreasson et al. (2015) e Behringer & Deschner (2017).

Quanto a validação biológica, avaliaremos os GCs fecais das amostras coletadas antes e depois das capturas regulares, durante as quais membros treinados da equipe do Projeto BioBrasil capturam e anestesiaram os indivíduos dos grupos de estudo, a fim de trocar os radio colares. Os animais são mantidos durante a noite no laboratório e liberados no dia seguinte no local onde foram capturados (para procedimentos ver Dietz et al., 1996; Catenacci et al., 2016). Como sugerido por Wark et al. (2016) que validou GCs fecais em mico-leões-dourados, a coleta de amostras de todos os indivíduos possíveis será realizada no 5º ou 6º dia antes das capturas, e depois repetida no 9º ou 10º dia após as capturas. Com relação à validação biológica da T3 fecal, compararemos os níveis de T3 fecal em todas as amostras coletadas durante a amostragem comportamental e obteremos uma faixa de concentrações na qual prevemos se encontrem os indivíduos em um estado mais saudável, isto com base nas informações coletadas nos exames veterinários realizados durante as capturas. Ambas as técnicas escolhidas modificam os níveis dos metabólitos fecais em questão e são apropriadas para aferir os imunoensaios que serão utilizados. Devido ao estado ameaçado dos MLCDs, a administração do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e do hormônio estimulante tireoide (TSH) tradicionalmente usado para a validações fisiológicas não seriam éticos no nosso caso.

Imunoensaio enzimático de GCs e T3 fecais

Para a análise de GCs e T3 fecais, colaboraremos com o Interlab-UMU. Propomos para esta fase utilizar em ambos os casos kits de IEE da IBL internacional, mais especificamente ELISA Cortisol (RE52061) e ELISA Triioditironina Total (T3) (RE55251). Seguiremos as instruções de uso e comentários do fabricante, para assim evitar qualquer alteração nos resultados. Os procedimentos para a análise dos hormônios selecionados são semelhantes,

[Fn4] Comentário: Iniciei o procedimento de cadastro com a orientação do aluno Lucas da UESC que enviou amostras de tecido de baleia ao Japão, e entrei em contato com Vanessa para ter um plano B caso a exportação das amostras se complicar demais (obrigado pelo contato!).

exceto por diferenças no volume de reagentes, e tempo e temperatura de incubação, para mais detalhes ver as instruções de uso. Em resumo, seguiremos estes passos: (1) adicionaremos o volume específico de solução padrão, controle e amostras ao número desejado de poços de microtitulação; (2) se estivermos testando T3, distribuiremos o reagente em cada poço, misturaremos e deixaremos incubar; (3) usando uma pipeta adicionaremos a enzima conjugada, misturaremos bem e deixaremos incubar; (4) descartaremos o conteúdo dos poços, enxaguaremos com a solução de lavagem e removeremos todas as gotículas restantes; (5) adicionaremos a solução de substrato e deixaremos incubar; (6) interromperemos a reação com a solução stop; (7) e finalmente, determinaremos a absorbância de cada poço com um fotômetro (IBL International GMBH, 2014; 2016).

Financiamento

Para financiar os gastos do projeto aplicamos a duas fontes de fundos para pesquisa, The Mohamed bin Zayed Species Conservation Fund (Outubro 2019) principalmente para custos laboratoriais e outros e Rufford Small Grant (Dezembro 2019) para custos de campo. Além disso, contamos com o apoio do Centre for Research and Conservation of the Royal Zoological Society of Antwerp o qual proporcionará hospedagem e o sistema de rádio-telemetria para localizar os grupos, também cobrirá gastos que se referem a salários dos assistentes de campo e transporte entre a área de estudo e Ilhéus. Temos previsto aplicar a outras fontes de financiamento no ano 2020 como Morris Animal Foundation, Primate Conservation Inc e People's Trust for Endangered Species.

ANÁLISE DOS DADOS

Índice de disponibilidade de alimento e seletividade

Com as medições sobre vegetação obteremos a área basal total de cada uma das 23 espécies chave respeito da área da parcela (ha) e respeito da área basal de todas as árvores medidas dentro da parcela (dominância relativa), obteremos os valores médios destas duas medidas para cada fitofisionomia por separado. A seguir, multiplicaremos a área basal média por hectare de cada espécie pela porcentagem de frutificação ou floração média em cada fitofisionomia. Logo, o índice de disponibilidade da espécie chave em cada uma das três áreas de vida dos MLCs será calculado a partir da porcentagem que cada fitofisionomia ocupa na respectiva área de vida do grupo. O índice total de disponibilidade de alimento por área de vida é a somatória dos índices individuais de disponibilidade de todas as espécies detectadas nas fitofisionomias que compõe essa área de vida. Como esperamos que certos tipos de alimentos tenham diferentes efeitos sobre as respostas fisiológicas e que a preferência pelo alimento indique de maneira indireta seu valor nutricional. Estudaremos a seletividade através da relação entre o tempo total de forrageio de certo item alimentar e o índice total de disponibilidade de alimento.

Correlações entre hormônios fecais e comportamento

Exploraremos a relação entre as concentrações de GCs e T3, utilizando a correlação de Pearson. De igual maneira, verificaremos a correlação entre as variáveis comportamentais.

Assumindo que a relação não seja linear, analisaremos os padrões de variação temporal nos dados através modelos de regressão não-linear (NLS – nonlinear least squares) onde avaliaremos os efeitos das variáveis comportamentais e da disponibilidade de alimento (variáveis independentes) sobre a variação mensal de GCs e T3 por indivíduo (variáveis dependentes). Ambos modelos incluirão a identidade dos indivíduos como fator aleatório, o sexo, o status reprodutivo em fêmeas e o grau de dominância como fator fixo. Para remover a influência dos diferentes grupos de MLCDs sobre os análises longitudinais centraremos tanto as concentrações de hormônios como as variáveis independentes nas suas respectivas médias mensais por grupo (Foerster et al., 2012). Seleccionaremos os modelos com o conjunto de fatores que expliquem melhor as variações nas concentrações da ambos os hormônios fecais através do Critério de Informação de Akaike (AIC).

IMPACTOS DO ESTUDO PARA A CONSERVAÇÃO

Uma contribuição direta para a conservação da espécie é que será avaliado se as alterações na disponibilidade de frutos e no comportamento dos MLCDs decorrente da degradação do seu habitat afetam de maneira significativa seus níveis de estresse e portanto tem implicações para seu bem estar e saúde. Este tipo de abordagem pode nos ajudar a mensurar o impacto de estratégias de comportamento sobre o fitness da população e é especialmente importante para espécies de vida longa como os MLCDs para os quais as medidas de fitness são difíceis de obter (Foerster & Monfort, 2010). Há uma falta de informação sobre como as alterações na disponibilidade de alimentos em fragmentos de floresta perturbados afetam os MLCDs e se estes fragmentos são capazes de satisfazer suas demandas energéticas. Isto é necessário para estimativas usadas pela IUCN para categorização da espécies já que nem todas as áreas de ocupação do MLCd são ótimas para a persistência da população a longo prazo. Usar metabólitos fecais para preencher essa lacuna requer a articulação da ecologia alimentar e comportamental, como da fisiologia. No entanto, dado o grau de vulnerabilidade ao estresse de certos animais, especialmente aqueles com menos de 1 kg (Schwarzenberger, 2007), o monitoramento endócrino não invasivo é uma maneira eticamente apropriada de responder a perguntas sobre adaptação comportamental de espécies silvestres às mudanças ecológicas. O presente estudo oferece uma maneira objetiva de avaliar a condição energética e o estado nutricional de MLCDs e abre novas perspectivas para diversas aplicações em conservação e manejo da espécie. Por exemplo, ao identificar os itens alimentares chave na atenuação de estresse, esses itens vegetais podem ser sugeridos para programas de restauração ecológica como o estabelecimento de corredores ecológicos para conectar os fragmentos florestais. Além disso, outros estudos sobre o conteúdo nutricional desses recursos chaves podem ser úteis para programas de cria em cativeiro. Adicionalmente, validar a medição de GCs e T3 em MLCDs abre a possibilidade de monitorar o estresse em populações selvagens, habituadas e não habituadas, sem perturba-las e identificar subpopulações sob maior risco ao impacto antrópico.

REFERÊNCIAS

- Adeola A. J., Apapa A. N., Adeyemo A. I., Alaye S. A., Ogunjobi J. A. (2014) Seasonal variation in plants consumption pattern by foraging Olive Baboons (*Papio anubis*. Lesson, 1827) inside Kainji Lake National Park. *J Appl Sci Environ Manag* 18:481–484.
- Andreasson U., Perret-Liaudet A., van Waalwijk van Doorn L. J. C., Blennow K., Chiasserini D., Engelborghs S., Fladby T., et al. (2015) A Practical Guide to Immunoassay Method Validation. *Frontiers in Neurology* 6 (Aug): 1–8. doi:10.3389/fneur.2015.00179.
- Arroyo-Rodríguez V., Mandujano S., Cuende-Fanton C. (2005) Ocupación de parches de selva por monos aulladores *Alouatta palliata mexicana* en tres paisajes con diferente grado de fragmentación en Los Tuxtlas. México: Univ Ciencia II; 23–34.
- Bales K., French J., Hostetler C. & Dietz J. (2005). Social and reproductive factors affecting cortisol levels in wild female golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). *American journal of primatology*. 67. 25-35. 10.1002/ajp.20167.
- Behringer V. & Deschner T. (2017) Non-Invasive Monitoring of Physiological Markers in Primates. *Hormones and Behavior* 91. Elsevier Inc.: 3–18. doi:10.1016/j.yhbeh.2017.02.001.
- Birnie-Gauvin K., Peiman K. S., Raubenheimer D. & Cooke S. J. (2017) Nutritional Physiology and Ecology of Wildlife in a Changing World. *Conservation Physiology* 5 (1). doi:10.1093/conphys/cox030.
- Catenacci L. S., Pessoa M. S., Nogueira-Filho S. L. G. & De Vleeschouwer K. M. (2016) Diet and Feeding Behavior of *Leontopithecus chrysomelas* (Callitrichidae) in Degraded Areas of the Atlantic Forest of South-Bahia, Brazil. *International Journal of Primatology* 37 (2): 136–57. doi:10.1007/s10764-016-9889-x.
- Coutinho A. L. (2018) Ecologia e mobilidade do mico-leão-de-cara-dourada, *Leontopithecus chrysomelas* (Kuhl, 1820) (Primates, Callitrichidae), dentro e entre pequenos fragmentos degradados do Sul da Bahia (Una, Brasil) / Luciana Aschoff Coutinho. – Ilhéus, BA: UESC.
- Dantzer B., Fletcher Q. E., Boonstra R. & Sheriff M. J. (2014) Themed Issue Article: Stress in Vertebrates Measures of Physiological Stress: A Transparent or Opaque Window into the Status, Management and Conservation of Species? *Physiology* 2 (May): 1–18. doi:10.1093/conphys/cou023.
- De Vleeschouwer K. M. & Raboy B. E. (2013) Multi-level and multi-disciplinary approaches to understanding endangered primates in complex landscapes: Golden-headed lion tamarins in Southern Bahia, Brazil. In L. Marsh & C. Chapman (Eds.), *Primates in fragments: Complexity and resilience. Developments in primatology: progress and prospects*. New York: Springer Science+Business Media.
- Dias P. A. D., Coyohua-Fuentes A., Canales-Espinosa D., Chavira-Ramírez R. & Rangel-Negrín A. (2017) Hormonal Correlates of Energetic Condition in Mantled Howler Monkeys. *Hormones and Behavior* 94: 13–20. doi:10.1016/j.yhbeh.2017.06.003.
- Dietz J. M., de Sousa S. N. & Da Silva J. R. O. (1994) Population structure and territory size in golden-headed lion tamarins, *Leontopithecus chrysomelas*. *Neotropical Primates* 2(suppl):21–23. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132006000100012>
- Eales, J. G. (1988) The influence of nutritional state on thyroid function in various vertebrates. *Integrative and Comparative Biology*, 28(2), 351–362. <https://doi.org/10.1093/icb/28.2.351>
- Emery Thompson M. (2016) Energetics of Feeding, Social Behavior, and Life History in Non-Human Primates. *Hormones and Behavior* 91. Elsevier B.V.: 84–96. doi:10.1016/j.yhbeh.2016.08.009.
- Foerster S. & Monfort S. L. (2010) Fecal Glucocorticoids as Indicators of Metabolic Stress in Female Sykes' Monkeys (*Cercopithecus mitis Albogularis*). *Hormones and Behavior* 58 (4). Elsevier Inc.: 685–97. doi:10.1016/j.yhbeh.2010.06.002.
- Foerster, S., Cords, M. & Monfort, S. L. (2012) Seasonal Energetic Stress in a Tropical Forest Primate: Proximate Causes and Evolutionary Implications. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050108>

- Fournier L. A. (1974) Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas en árboles. Turrialba, vol. 24, p. 422-423.
- French J., Bales K., Baker A. & Dietz J. (2003). Endocrine Monitoring of Wild Dominant and Subordinate Female *Leontopithecus rosalia*. *International Journal of Primatology*. 24. 1281-1300. 10.1023/B:IJOP.0000005993.44897.ae.
- Galama W. T., Graham L. H. & Savage A. (2004) Comparison of Fecal Storage Methods for Steroid Analysis in Black Rhinoceroses (*Diceros bicornis*). *Zoo Biology* 23 (4): 291–300. doi:10.1002/zoo.20017.
- Gesquiere L. R., Pugh M., Alberts S. C. & Markham A. C. (2018) Estimation of Energetic Condition in Wild Baboons Using Fecal Thyroid Hormone Determination. *General and Comparative Endocrinology* 260. Elsevier Inc.: 9–17. doi:10.1016/j.ygcen.2018.02.004.
- Harper K., Macdonald S., Burton P., Chen J., Brosofske K., Saunders S., Euskirchen E., Roberts D., Jaiteh M. & Esseen P. (2005). Edge Influence on Forest Structure and Composition in Fragmented Landscapes. *Conservation Biology*. 19. 768 - 782. 10.1111/j.1523-1739.2005.00045.x.
- Hodges J. K. & Heistermann M. (2011) Field Endocrinology: Monitoring Hormonal Changes in Free-ranging Primates. *Field and Laboratory Methods in Primatology: A Practical Guide, Second Edition*, 353–70. doi:10.1017/CBO9780511921643.022.
- IBL International GMBH (2014) Instructions for use: Cortisol ELISA, Enzyme immunoassay for the quantitative determination of Cortisol in human serum and plasma. RE52061
- IBL International GMBH (2016) Instructions for use: Total Triiodothyronine (T3) ELISA, Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Triiodothyronine (T3) in human serum and plasma. RE55251
- IUCN (2015) The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2.
- Jaimez N. A., Bribiescas R. G., Aronsen G. P., Anestis S. A., Watts D.P. (2012) Urinary cortisol levels of gray-cheeked mangabeys are higher in disturbed compared to undisturbed forest areas in Kibale National Park, Uganda. *Animal Conservation*. 15: 242-247. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2011.00508.x>
- Martin T. E. (1987) Food as a limit on breeding birds: a life-history perspective. *Annu Rev Ecol Syst* 18:453–487. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.002321>
- Morelato L.P.C., Alberti L.F. & Hudson I.L. (2010) Applications of circular statistics in plant phenology: a case studies approach. I.L. Hudson, M.R. Keatley (Eds.), *Phenological Research: Methods for Environmental and Climate Change Analysis*. Springer, Heidelberg-New York (2010), pp. 339-359. 10.1007/978-90-481-3335-2_16.
- Mori S. A., Boom B. M., De Carvalho A. M. & Dos Santos T. S. (1983) Southern Bahian moist forests. *Bot. Rev.* 49: 155–232. <https://doi.org/10.1007/BF02861011>
- Oliveira L. C., Hankerson S., Dietz J.M. & Raboy B.E. (2010) Key tree species for the golden-headed lion tamarin and implications for shade-cocoa management in southern Bahia, Brazil. *Animal Conservation* 13: 60-70. 10.1111/j.1469-1795.2009.00296.x.
- Palme R., Touma C., Arias N., Dominchin M. F. & Lepschy M. (2013) Steroid Extraction: Get the Best out of Faecal Samples. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift – Veterinary Medicine Austria* 100: 238–46.
- Pessoa M. S., De Vleeschouwer K. M., Talora D. C., Rocha L. & Amorim A. M. (2012). Reproductive phenology of *Miconia mirabilis* (Melastomataceae) within three distinct physiognomies of Atlantic Forest, Bahia, Brazil. *Biota Neotropical*, 12:49–56. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032012000200006>
- Raboy B. E. & Dietz J.M. (2004) Diet, Foraging, and Use of Space in Wild Golden-Headed Lion Tamarins. *American Journal of Primatology* 63 (1): 1–15. doi:10.1002/ajp.20032.
- Raboy B. E., Christman M. C., Dietz J. M. (2004) The use of degraded and shade cocoa forests by endangered golden-headed lion tamarins, *Leontopithecus chrysomelas*. *Oryx* 38(1):75-83. <https://doi.org/10.1017/S0030605304000122>
- Sapolsky R.M. & Altmann J. (1991) Incidence of hypercortisolism and dexamethasone resistance increases with age

among wild baboons. *Biological Psychiatry* 30, 1008-1016

Sapolsky R. M. (1985) Stress-induced suppression of testicular function in the wild baboon: role of glucocorticoids? *Endocrinology* 116: 2273–2278.

Schwarzenberger F. (2007) The Many Uses of Non-Invasive Faecal Steroid Monitoring in Zoo and Wildlife Species. *International Zoo Yearbook* 41 (1): 52–74. doi:10.1111/j.1748-1090.2007.00017.x.

Sheriff M. J., Dantzer B., Delehanty B., Palme R. & Boonstra R. (2011) Measuring Stress in Wildlife: Techniques for Quantifying Glucocorticoids. *Oecologia* 166 (4): 869–87. doi:10.1007/s00442-011-1943-y.

Tardif S. D., Santos C. V., Baker A. J., Van Elsacker L., Feistner A. T. C., Kleiman D. G., Ruiz-Miranda C. R., Moura A. C., Passos F., Price E. C., Rappaport L. & De Vleeschouwer K. (2002) Infant care and development in lion tamarins. In D. G. Kleiman & A. B. Rylands (Eds.), *Lion tamarins: Biology and conservation* (pp. 213–232). Washington, DC: Smithsonian Institution Press.

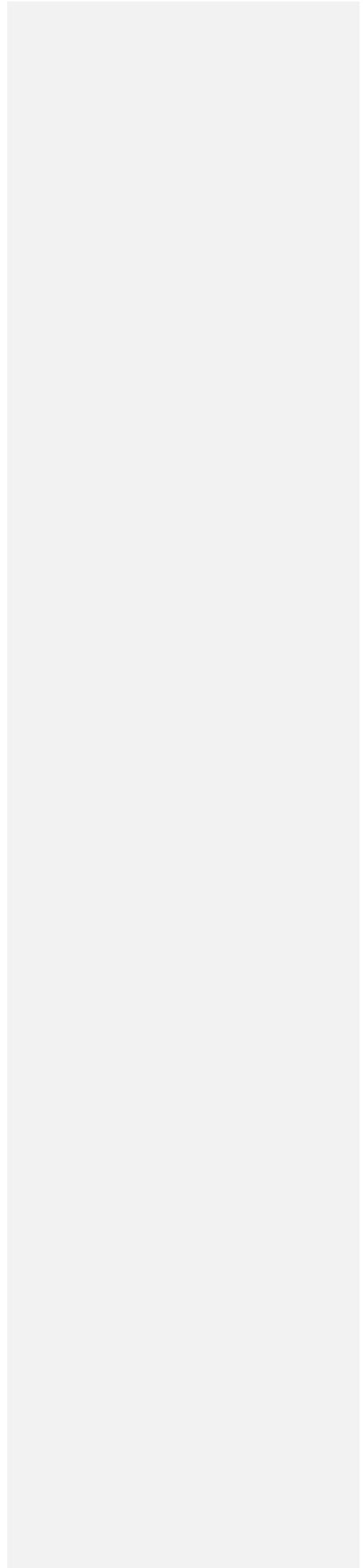
Terio K. A., Brown J. L., Moreland R. & Munson L. (2002) Comparison of Different Drying and Storage Methods on Quantifiable Concentrations of Fecal Steroids in the Cheetah. *Zoo Biology* 21 (3): 215–22. doi:10.1002/zoo.10036.

Thomas W. W., Carvalho A. M. V., Amorim A. M. A., Garrison J. & Arbeláez A. L. (1998) Plant endemism in two forests in southern Bahia, Brazil. *Biodivers. Conserv.* 322: 311–322.

Wark J. D., Amendolagine L., Lukas K. E., Kuhar C. W., Dennis P. M., Snowdon C. T., Schoffner T. & Schook M. W. (2016) Fecal Glucocorticoid Metabolite Responses to Management Stressors and Social Change in Four Species of Callitrichine Monkeys. *Primates* 57 (2). Springer Japan: 267–77. doi:10.1007/s10329-016-0514-6.

Wasser S. K., Cristóbal Azkarate J., Booth R. K., Hayward L., Hunt K., Ayres K., Vynne C., Gobush K., Canales-Espinosa D. & Rodríguez-Luna E. (2010) Non-Invasive Measurement of Thyroid Hormone in Feces of a Diverse Array of Avian and Mammalian Species. *General and Comparative Endocrinology* 168 (1). Elsevier Inc.: 1–7. doi:10.1016/j.ygcen.2010.04.004.

Wingfield J.C., Maney D.L., Breuner C.W., Jacobs J.D., Lynn S., Ramenofsky M., Richardson R.D. (1998) Ecological bases of hormone—behavior interactions: the “emergency life history stage.” *Am. Zool.* 38, 191–206



Anexo 1. 23 espécies chave selecionadas para a avaliação de disponibilidade de alimentos vegetais.

Família	Espécie	Nome vulgar	Habitat (a)	Categoria (a)	% total das visitas (b)	>5% de tempo/mês (c)
Anacardiaceae	<i>Anacardium occidentale</i> L.	Pau-pombo, caju				x
Anacardiaceae	<i>Tapirira guianensis</i> Aubl.	Manga-brava, pau-pombo	C, S, P	3	4.69	
Annonaceae	<i>Annona salzmannii</i> A.DC.	Pinha-do-mato	C	1	3.02	
Clusiaceae	<i>Garcinia macrophylla</i> Mart.	Bacupari			0.10	x
Clusiaceae	<i>Symphonia globulifera</i> L.f.	Alandi, anani	S, P	3	0.52	x
Euphorbiaceae	<i>Mabea brasiliensis</i> Müll.Arg.	Bacupari				x
Fabaceae	<i>Inga thibaudiana</i> DC.	Ingá-tabua	C	1	6.67	x
Melastomataceae	<i>Henriettea succosa</i> (Aubl.) DC.	Mundururu-ferro	C, S, P	3	4.90	x
Melastomataceae	<i>Miconia hypoleuca</i> (Benth.) Triana	Mundururu-pequeno	P	1	5.11	x
Melastomataceae	<i>Miconia mirabilis</i> (Aubl.) L.O.Williams	Mundururu-branco	C, S, P	3	4.80	x
Moraceae	<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.	Jaca	S	3	14.39	x
Moraceae	<i>Helicostylis tomentosa</i> (Poepp. & Endl.) Rusby	Amora-vermelha			3.75	x
Myrtaceae	<i>Eugenia cf. rostrata</i> O. Berg	Murta	C, S, P	3		x
Myrtaceae	<i>Gomidesia langsdorffii</i> O. Berg.	Murta-cumbuca	C, S, P	3		x
Myrtaceae	<i>Myrcia gigantea</i> (O.Berg) Nied.	Murta				x
Myrtaceae	<i>Myrcia vittoriana</i> Kiaersk.	Murta				x
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i> L.	Goiaba	S, P	1	0.42	x
Sapotaceae	<i>Chrysophyllum splendens</i> Spreng.	Abil-da-mata, língua-de-vaca	C, P	3		x
Sapotaceae	<i>Pouteria grandiflora</i> (A. DC.) Baehni	Bapeba-de-nervura	P	1	0.10	x
Sapotaceae	<i>Pradosia lactescens</i> (Vell.) Radlk.	Piacó, cacau-de-caboclo	C, P	3		x
Simaroubaceae	<i>Simarouba amara</i> Aubl.	Amarelinho, marupá	S	1	2.50	
Urticaceae	<i>Pourouma mollis</i> Trécul	Tararanga-vermelha			0.63	x
Urticaceae	<i>Pourouma velutina</i> Mart. ex Miq.	Tararanga-de-lixá	C, S, P	3	11.68	x

(a) Oliveira et al., 2009 (Categoria de importância de menor para maior entre 1 e 3), (b) Coutinho, 2018, (c) Catenacci et al., 2016

Anexo 2. Etograma de comportamentos

Classificação do comportamento	Descrição
Alimentação	Tempo forrageando ou comendo fruta
	Tempo forrageando ou comendo flor
	Tempo forrageando ou comendo animais (identificação do tipo de substrato: madeira, folha seca, piaçava, dendê, emaranhado)
	Número de ingestões (identificação do item alimentar quando de origem vegetal)
Deslocamento	Tempo se locomovendo
	Tempo parado
	Tempo descansando
Interação social	Tempo de conflito intergrupar
	Tempo brincando
	Tempo de catação