



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**ANÁLISE GENÉTICA E FENOTÍPICA DE  
MACACOS-PREGO DA ILHA DA MARAMBAIA,  
MANGARATIBA, RIO DE JANEIRO**

**DIEGO MATTOS PENEDO**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Denise Monnerat Nogueira**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2016

599.8098153

P398a

T

Penedo, Diego Mattos, 1987-

Análise genética e fenotípica de macacos-prego da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, Rio de Janeiro / Diego Mattos Penedo. - 2016.

90 f.: il.

Orientador: Denise Monnerat Nogueira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal, 2016.

Bibliografia: f. 68-77.

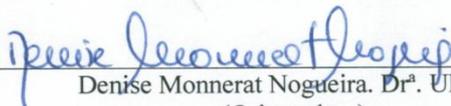
1. Macaco-prego - Marambaia, Ilha da (RJ) - Genética - Teses. 2. Macaco-prego - Marambaia, Ilha da (RJ) - Morfologia - Teses. I. Nogueira, Denise Monnerat, 1961-II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**DIEGO MATTOS PENEDO**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**,  
no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.

Dissertação aprovada em 26/02/2016.



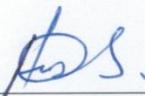
Denise Monnerat Nogueira. Dr<sup>a</sup>. UFRRJ  
(Orientadora)



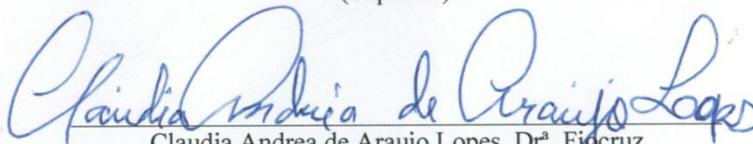
Jorge Luís Azevedo de Armada. Dr. UFRRJ  
(Titular)



Beatriz Goldschmidt. DR<sup>a</sup>. Fiocruz  
(Titular)



Heriberto Dias da Silva. Dr. UFRRJ  
(Suplente)



Claudia Andrea de Araujo Lopes. Dr<sup>a</sup>. Fiocruz  
(Suplente)

A todos aqueles empenhados no estudo e conhecimento da biodiversidade, para que esta não se torne apenas teoria, dedico.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Força que me move, a cada dia, em busca de novas conquistas.

Agradeço aos meus pais, Mara e Paulo, pela educação que me deram, e principalmente pelo amor, carinho e respeito que fizeram de mim quem sou hoje. Agradeço às minhas irmãs, Ana Paula e Daniele pelo apoio, carinho e amor, sempre me incentivando em minhas caminhadas. Agradeço ao meu cunhado Julio pela amizade e companheirismo de tantos anos e apoio pelas novas vitórias. Agradeço, agora também, ao pequeno Davi, sobrinho amado que veio trazer luz e felicidade para nossa família. Aos demais familiares, meus agradecimentos.

Agradeço à minha noiva Carolline, que está sempre ao meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis e que exigem maior foco no trabalho. Sei o quanto é difícil nossas ausências e distâncias, mas em breve dissertações, teses, projetos e artigos serão escritos lado a lado, em uma mesma mesa de estudos.

Agradeço a todos os meus amigos, com os quais encontro menos que gostaria, mas que me proporcionam momentos maravilhosos quando reunidos.

Agradeço à minha querida Universidade Rural por continuar me acolhendo e me encantando, desde 2009.

Agradeço à minha orientadora de longa data, Denise, que desde 2010 me acompanha nessa caminhada pelas ciências, amparando minhas incertezas e iluminando minhas dúvidas. Que essa parceria continue por muitos outros anos.

Agradeço ao Carlos Eduardo Verona (Kadu) que me ensinou nos trabalhos em campo, com toda paciência, os conhecimentos fundamentais para se capturar os espertos macacos-prego. Que esta parceria também seja duradoura.

Agradeço aos colegas de laboratório do Departamento de Genética (Beatriz, Carol, Dálethy, Joana e Monique) pelo companheirismo, as conversas jogadas fora e os vários PCRs retirados ao final do último ciclo. Em especial, agradeço ao Emídio e à Mayara, os quais me fizeram companhia nos trabalhos de campo em busca dos macacos-prego, se sujando e se cortando entre uma ceva e outra.

Agradeço ao assistente de laboratório José Francisco pelo auxílio nas análises citogenéticas e conversas entre uma lâmina e outra e ao professor Jorge Armada, pelas conversas e enriquecimentos do conhecimento ao longo desses anos.

Agradeço ao Angelo Marzano, o fotógrafo extraoficial da equipe, que sempre nos acompanhava nos trabalhos de campo, ajudando nas diversas tarefas realizadas.

Agradeço a todos os moradores da Ilha da Marambaia, principalmente ao Nilton e à Jaqueline, representantes da comunidade que nos auxiliaram nas pesquisas com os moradores, e ao José Carlos (Tio Zé) e Seu Sebastião (Tião), pela amizade construída em minhas visitas à Ilha.

Agradeço ao Professor Roberto de Xerez por intermediar nosso contato com o CADIM e nos dar todo o apoio possível para realização de nosso trabalho na Marambaia.

Agradeço ao comando do Centro de Avaliação da Ilha da Marambaia (CADIM) pelo apoio na logística de transportes de nossos trabalhos de campo pela Ilha da Marambaia e pelas refeições disponibilizadas no quartel para nossa equipe.

Agradeço à Dr<sup>a</sup>. Andrea Oliveira (UERJ) e Dr<sup>a</sup>. Suely dos Santos (UNIRIO), por me auxiliarem em análises laboratoriais e, principalmente, me receberem em seus laboratórios com carinho e atenção.

Agradeço aos componentes da banca, por aceitarem o convite para participação dessa etapa tão importante do trabalho: a avaliação.

Agradeço à agência de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado a mim concedida no período de meu trabalho.

Agradeço à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, assim como à secretária Janaina, pelo suporte ao longo do meu mestrado.

Agradeço àqueles, sem os quais este trabalho não teria sentido, e dos quais sinto saudades quando fico muito tempo sem visitá-los: os macacos-prego da Ilha da Marambaia.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho ou para minha formação, meu sincero agradecimento.

## RESUMO

PENEDO, Diego Mattos. **Análise genética e fenotípica de macacos-prego da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, Rio de Janeiro.** 2016. 90p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Diversos estudos vêm sendo realizados com macacos-prego e caiararas (*Sapajus* e *Cebus*) de modo a entender suas histórias evolutivas pelas Américas do Sul e Central. Análises genéticas, em associação às características de pelagem, auxiliam na identificação das relações entre as espécies e evidenciam a diversidade apresentada por ambos os gêneros. No Brasil, estão distribuídas predominantemente as espécies de *Sapajus*, sendo *S. nigritus* endêmica de Mata Atlântica e característica do sudeste. Na Ilha da Marambaia, importante área com remanescente florestal no estado do Rio de Janeiro, existe uma população de macacos-prego, sem nenhum estudo anterior. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a população de macacos-prego dessa região através de análises fenotípicas e genéticas, incluindo o padrão de pelagem, o sequenciamento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II e a avaliação do cariótipo com coloração convencional e bandamento de heterocromatina constitutiva (banda C). Foram realizadas, também, entrevistas com moradores e militares da região, de modo a identificar a possível origem e isolamento dos primatas. Foram analisados doze espécimes, oito machos e quatro fêmeas. As características de pelagem coincidiram, de modo geral, com o descrito para *S. nigritus*, sendo observada coloração variando de marrom a enegrecida no dorso, membros, cauda e topo da cabeça, além de peito amarelo e face branca ou amarelo-clara, contrastante. Tufos de pelos no topo da cabeça foram observados nos adultos, sendo maiores nas fêmeas. A análise do gene mitocondrial revelou maior proximidade da população da ilha com *S. xanthosternos*, que ocorre na Bahia, e em seguida com *S. cay*, que ocorre em parte do Brasil e no Paraguai. A maior divergência apresentada foi em relação a populações de *S. nigritus* da Argentina. A análise do cariótipo revelou padrão condizente com as espécies de *Sapajus*, com  $2n = 54$  (XX ou XY), embora a morfologia do cromossomo sexual Y, submetacêntrica, fosse divergente do comumente descrito na literatura (acrocêntrica). Apresentaram banda C intercalar os pares cromossômicos 4, 11, 12 e 17. O par 11 mostrou-se com três polimorfismos, todos intercalares e diversificados entre si por processos de deleção e inversão. O padrão deste par foi divergente do descrito, como um pequeno acrocêntrico, para *S. nigritus* em populações da Argentina, apresentando bandamento semelhante ao considerado específico de *S. xanthosternos*. Segundo o levantamento realizado, a população de primatas parece ser natural da ilha, estando provavelmente isolada. De acordo com as divergências genéticas encontradas, a população da Ilha da Marambaia pode ter conservado características ancestrais. O padrão de banda C do par 11 indica que o polimorfismo descrito para populações da Argentina pode não corresponder a toda a distribuição de *S. nigritus*. Estes dados podem auxiliar no entendimento da diversidade e evolução das espécies de *Sapajus*, uma vez que este teria irradiado a partir do sudeste brasileiro. Novos estudos com populações de outras regiões do Rio de Janeiro são necessários para se averiguar o padrão de bandamento de heterocromatina apresentada para o par 11, bem como as relações genéticas demonstradas pelo sequenciamento do gene mitocondrial para a população da Ilha da Marambaia.

Palavras-chave: *Sapajus*, Citocromo Oxidase II, banda C.

## ABSTRACT

PENEDO, Diego Mattos. **Genetic and phenotypic analysis of capuchin monkeys from Ilha da Marambaia, Mangaratiba, Rio de Janeiro.** 2016. 90p. Dissertation (Master Science in Animal Biology). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Several studies have been conducted with capuchin monkeys (*Sapajus* and *Cebus*) in order to understand their evolutionary histories by South and Central America. Genetic analysis, in association with the coat coloration, assist in the identification of the relationships between species and show the diversity presented by both genera. In Brazil, *Sapajus* species are predominantly distributed, being *S. nigritus* endemic to the Atlantic Forest and characteristic of southeast. At Ilha da Marambaia, an important area with forest remaining in the state of Rio de Janeiro, there is a population of capuchin monkeys, but without previous study. The objective of this study was to characterize the population of capuchin monkeys at this region through phenotypic and genetic analyzes, including the coat coloration, the sequencing of the mitochondrial gene cytochrome oxidase II and the evaluation of karyotype with conventional staining and C-band. Interviews with residents and military personnel in the region, were also carried out, in order to identify the possible origin and isolation of the primates. Twelve specimens, eight males and four females, were analyzed. The coat features were consistent with that described for *S. nigritus*, with coloration varying from brown to blackish on the back, limbs, tail and top of the head, in addition to yellow chest and face with white or light yellow, contrasting. Tufts at the top of the head were seen in adults, being greater in females. The analysis of mitochondrial gene revealed closer proximity of this population with *S. xanthosternos*, which occurs at Bahia, and then with *S. cay* that occurs in parts of Brazil and Paraguay. The greatest divergence was in relation to the population of *S. nigritus* in Argentina. The karyotype was consistent with that described for *Sapajus* species, with  $2n = 54$  (XX or XY), although the morphology of the sex chromosome Y, submetacentric, was different from that commonly described in the literature (acrocentric). Presented intercalary C-band the chromosome pairs 4, 11, 12 and 17. The par 11 presented three polymorphisms, all interstitial to euchromatin and diversified from each other by deletion and inversion processes. The pattern of this pair is different from that described, as a small acrocentric, to *S. nigritus* in populations of Argentina, with banding similar to that considered specific for *S. xanthosternos*. According to the survey, the population of primates seems to be native of the island and is currently isolated. According to the genetic divergences found, the population of Ilha da Marambaia may have maintained ancestral characteristics. The C-band pattern of the pair 11 indicates that the polymorphism described for populations of Argentina does not correspond to the entire distribution of *S. nigritus*. These data may help to understand the diversity and evolution of *Sapajus*, since this would have radiated from southeastern Brazil. Further studies with populations from other regions of Rio de Janeiro are needed to verify the C-band pattern presented for the pair 11 as well as the genetic relationships demonstrated by the mitochondrial gene for the population of Ilha da Marambaia.

Keywords: *Sapajus*, Cytochrome Oxidase II, C-band.

## LISTA DE ABREVIACOES

|                 |  |
|-----------------|--|
| $\bar{X}$       | média  |
| $\mu\text{L}$   | microlitro   |
| $\mu\text{M}$   | micromolar   |
| 2n              | número diploide  |
| APA             | rea de Proteo Ambiental   |
| ARQIMAR         | Associao de Moradores Remanescentes Quilombola da Ilha da Marambaia     |
| CADIM           | Centro de Avaliao da Ilha da Marambaia                                  |
| Cc              | comprimento do corpo   |
| Ccd             | comprimento da cauda   |
| cm              | centímetro   |
| COII            | Gene mitocondrial Citocromo Oxidase II                                   |
| CxLxA           | dimensões de comprimento, largura e altura                               |
| d               | ndice de diversidade  |
| DNA             | <i>deoxyribonucleic acid</i>   |
| DP              | desvio padrão  |
| g               | grama  |
| ha              | hectare  |
| IBAMA           | Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis |
| IUCN            | <i>International Union for Conservation of Nature</i>                    |
| Kg              | quilograma   |
| Km <sup>2</sup> | quilmetros quadrados  |
| L               | litro  |
| m               | metro  |
| M               | molar  |
| Ma.             | milhões de anos  |
| MC              | massa corporal   |
| mg              | miligrama  |
| mL              | mililitro  |
| mm              | milímetro  |
| n               | número amostral  |
| mM              | milimolar  |
| ng              | nanograma  |
| nm              | nanmetro  |
| pb              | pares de base  |
| PCR             | <i>polymerase chain reaction</i>   |
| RJ              | Rio de Janeiro   |
| SRY             | <i>Sex Determining Region in Y Chromosome</i>                            |
| U               | unidades   |
| UV              | raios ultravioleta   |
| xg              | força centrífuga relativa  |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Diferenças morfológicas entre *Cebus* e *Sapajus* (Platyrrhini: Cebidae). (A) Ilustração da silhueta da forma grácil ou “gracile” atribuída às espécies de *Cebus* e (B) forma robusta ou “robust” atribuída às espécies de *Sapajus*. Retirado de Lynch Alfaro *et al.* (2012b), desenho de Amisha Gadani.....7
- Figura 2:** Mapas da América Central e do Sul destacando a distribuição das espécies de *Cebus* e *Sapajus* (Platyrrhini: Cebidae). (A) Distribuição dos gêneros indicando em verde as áreas de simpatria, em azul ocorrência apenas das espécies de *Cebus* e em amarelo áreas de ocorrência das espécies de *Sapajus*. Retirado de Lynch Alfaro *et al.*, (2012b). (B) Distribuição aproximada das espécies de *Cebus* (à esquerda) e *Sapajus* (direita). Retirado de Lynch Alfaro *et al.* (2012a).....9
- Figura 3:** Ilustração do início da formação da Restinga da Marambaia, Mangaratiba, Rio de Janeiro. (A) Mapa do Brasil; (B) destaque para o estado do Rio de Janeiro; (C) em detalhe, a formação do cordão arenoso a partir da Ilha da Marambaia que deu origem à Restinga da Marambaia. Adaptado de Roncarati & Menezes (2005) .....12
- Figura 4:** Localização da Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, RJ. (A) Mapa do Brasil; (B) destaque para o estado do Rio de Janeiro; (C) em detalhe, localização da Ilha da Marambaia na Baía de Sepetiba. A faixa de terra que liga a Ilha da Marambaia à cidade do Rio de Janeiro recebe o nome de Restinga da Marambaia.....14
- Figura 5:** Locais de captura de macacos-prego na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. (A) Mapa do Brasil; (B) destaque para o estado do Rio de Janeiro; (C) em detalhe, a Ilha da Marambaia e parte da Restinga da Marambaia. 1. Local de captura (23°3'24.28"S / 43°58'34.40"O) próximo à Vila Militar do CADIM; 2. local de captura próximo à praia da Armação (23°3'0.83"S / 43°57'16.47"O).....16
- Figura 6:** Fruteira de bambu com bananas suspensa com auxílio de cordas, para habituação dos macacos-prego aos locais de captura na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ.....17
- Figura 7:** Armadilha do tipo Tomahawk suspensa com auxílio de cordas e plataforma de bambu para habituação e captura de macacos-prego na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ.....17
- Figura 8:** Padrão de pelagem apresentado por cinco indivíduos de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. (A) Dorso marrom-escuro sem faixa dorsal, com antebraço, pernas e cauda enegrecidos; (B) pelagem do ventre amarela; (C) face contornada por pelos brancos em parte da testa, têmporas e bochechas (esquerda) e costeleta escura partindo do capuz e ligando-se abaixo da mandíbula (direita).....22
- Figura 9:** Tamanhos e formas dos tufo de pelos na cabeça apresentados por machos e fêmeas adultos de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. (A) machos com tufo pequenos voltados para os lados (à esquerda) e tufo de tamanho mediano e eretos (à direita); (B) fêmeas com tufo bastante proeminentes e eretos.....22
- Figura 10:** Características de coloração de pelagem observadas em indivíduos jovens de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. (A) faixa dorsal estendendo-se do capuz até a base da cauda; (B) pelagem do ventre mais clara do que a observada nos indivíduos adultos.....23
- Figura 11:** Padrão de pelagem apresentado por dois machos adultos de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. (A) Dorso, membros e cauda enegrecidos, com capuz ainda mais escuro; (B) pelagem marrom no ventre, com membros e cauda escuros.....23

**Figura 12:** Locais de avistamento dos macacos-prego (Platyrrhini: Cebidae) pelos moradores da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. (A) Mapa do Brasil; (B) destaque para o estado do Rio de Janeiro; (C) em detalhe, a Ilha da Marambaia com os locais de avistamento: 1. Praia do Sino; 2. Pescaria Velha; 3. Praia do Kutuca; 4. Praia Grande; 5. Buraco Quente; 6. Praça Sebastopol; 7. Praia Suja; 8. Praia do Sítio; 9. Praia da Armação.....27

**Figura 13:** Locais correspondentes aos relatos de avistamento dos macacos-prego na Restinga da Marambaia, na região circundante à Baía da Marambaia, próximo à Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. (A) Mapa do Brasil; (B) destaque para o estado do Rio de Janeiro; (C) em detalhe, a localização da base aérea, onde os primatas são avistados (1) e o ponto aproximado de avistamento de um indivíduo na Ponta da Pombeba (2). A linha tracejada representa a região até onde os militares da base do exército, próxima ao continente, afirmam não haverem primatas.....29

**Figura 14:** Filogenia da infraordem Platyrrhini com base em 25 genes autossomais. Os números indicam o tempo aproximado de divergência em milhões de anos. Retirado de Schneider & Sampaio (2013).....40

**Figura 15:** Filogenia da infraordem Platyrrhini com base em sequências de 54 genes nucleares, incluindo o gênero *Aotus* na família Cebidae, proximamente relacionado aos callitrichídeos, com o clado *Cebus-Saimiri* como grupo-irmão. Modificado de Perelman *et al.* (2011).....41

**Figura 16:** Reconstruções filogenéticas realizadas através da análise de genes nucleares confirmando a separação dos macacos-prego (*Sapajus*) e caiararas (*Cebus*) em grupos distintos. (A) divergência entre o grupo com tufos (*Sapajus*) e sem tufos (*Cebus*) demonstrada pelo sequenciamento do gene *SRY*. Modificado de Moreira (2002). (B) Cladograma construído a partir da análise de elementos *Alu*. Modificado de Martins-Jr. *et al.* (2015).....42

**Figura 17:** Árvore filogenética obtida através do sequenciamento dos genes mitocondriais 12S e citocromo b para indivíduos de diversas espécies de *Cebus* e *Sapajus*. Adaptado de Lynch Alfaro *et al.* (2012a).....43

**Figura 18:** Árvore filogenética obtida a partir do sequenciamento do gene COII para 49 espécimes de *Cebus apella*, *C. nigritus* e *C. xanthosternos*. Os ramos terminais com *C. albifrons*, *Saimiri* e *Aotus* representam grupos externos. Adaptado de Ruiz-García *et al.* (2012b).....44

**Figura 19:** Padrão de bandamento G observado para indivíduos de *Sapajus nigritus* da Argentina. Em destaque na caixa, o par cromossômico 11 apresentando-se como um pequeno acrocêntrico, devido à deleção total do bloco heterocromático em homozigose. Retirado de Steinberg *et al.* (2014).....46

**Figura 20:** Árvore filogenética de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), a partir da comparação de sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II, demonstrando a relação de oito indivíduos de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia (*Sequence 1 - Sequence 8*) com outras espécies do gênero. Construída segundo o modelo de dois parâmetros (Kimura, 1980). Os números acima das ramificações correspondem a valores de *bootstrap* (Felsenstein, 1985), com base em 1000 replicações. A escala representa os valores de divergência genética (d).....55

**Figura 21:** Cariótipo em coloração convencional de um indivíduo macho de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae),  $2n = 54, XY$ , da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ.....56

**Figura 22:** Cariótipo de uma fêmea de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae),  $2n = 54, XX$ , da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ, em coloração convencional ressaltando (caixa) a diferença de tamanho entre os homólogos do par 11.....57

- Figura 23:** Cariótipo de um macho de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ, em coloração convencional ressaltando (caixa) a redução de tamanho do par 11 em relação ao 12.....57
- Figura 24:** Pares cromossômicos 4, 11, 12 e 17 de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ, marcados com bandamento C. O par 11 apresentou, em seis indivíduos, homozigose para o bloco heterocromático próximo ao centrômero ocupando aproximadamente 45% do cromossomo.....58
- Figura 25:** Cariótipo com bandamento C de uma fêmea de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ, destacando (caixa) o polimorfismo apresentado no par 11. Um dos homólogos apresentou banda próxima ao centrômero ocupando 45% da cromátide, enquanto o outro possuía tamanho reduzido, com banda intercalar ocupando 30% da cromátide.....59
- Figura 26:** Cariótipo com bandamento C de um macho de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ, destacando (caixa) o polimorfismo apresentado no par 11, com os homólogos apresentando tamanho reduzido quando comparados ao par 12. Um dos homólogos apresentou banda proximal enquanto o outro possuía banda mais distal, ambas ocupando 30% do cromossomo.....59
- Figura 27:** Comparação das marcações de banda C (acima) e G (abaixo) para os pares 11 e 12 de indivíduos de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ, que apresentaram diferença de tamanho do 11 (com polimorfismos 11A e 11B)..... 60
- Figura 28:** Comparação dos padrões de bandamento C e G de indivíduos de *Sapajus xanthosternos* (A) com o polimorfismo 11A apresentado por indivíduos da população de macacos-prego da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ (B). Notar a presença de uma marcação positiva (mais escura) próxima ao centrômero no bandamento G de *S. xanthosternos*, o que diverge dos macacos-prego da Ilha da Marambaia. Adaptado de Seuánez *et al.* (1986).....63
- Figura 29:** Possíveis rearranjos cromossômicos responsáveis pelo polimorfismo de banda C observado no par cromossômico 11 dos macacos-prego (*Sapajus* sp.) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. (A) Deleção parcial do bloco proximal; (B) inversão paracêntrica envolvendo o bloco heterocromático e parte da eucromatina. Os códigos 11A, 11B e 11C identificam os três polimorfismos encontrados para o par na população estudada.....64

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Taxonomia proposta por Lynch Alfaro *et al.* (2014) para os gêneros *Cebus* e *Sapajus* (Platyrrhini: Cebidae).....8
- Tabela 2:** Artigos científicos publicados que incluíram dados de indivíduos ou populações de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini: Cebidae) em diferentes localidades do estado do Rio de Janeiro.....11
- Tabela 3:** Sexo, idade e morfometria dos indivíduos de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ.....20
- Tabela 4:** Valores de divergência genética, com base na amplificação do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II, encontrados para oito indivíduos de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. As análises foram realizadas usando o modelo Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993). A divergência média entre os indivíduos foi  $d = 0,0005$ .....53
- Tabela 5:** Valores de divergência genética encontrados pela comparação de sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II de oito indivíduos de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ com espécimes de outras espécies de *Sapajus*. As análises foram realizadas usando o modelo Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993). A divergência média entre os espécimes analisados foi  $d = 0,0299$ .....54

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Frases de moradores ilustrando as respostas dadas quando questionados desde quando veem macacos na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ.....24
- Quadro 2:** Relato de moradores acerca do aumento dos avistamentos e número de indivíduos de macacos na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ.....25
- Quadro 3:** Frases de moradores ilustrando as respostas dadas quando questionados se os moradores mais velhos já falavam sobre os primatas na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ.....25
- Quadro 4:** Relato de moradores acerca do hábito de caça de macacos na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ, comum em outros tempos, mas visto como algo negativo atualmente.....26
- Quadro 5:** Frases de moradores ilustrando as respostas dadas quando questionados sobre a possibilidade de soltura como origem dos primatas presentes na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ.....27
- Quadro 6:** Frases de moradores ilustrando suas opiniões acerca dos primatas presentes na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ.....28

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>CAPÍTULO I - OS MACACOS-PREGO DA ILHA DA MARAMBAIA, MANGARATIBA, RJ: CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E HISTÓRIA RECENTE COM BASE EM RELATOS DE MORADORES DA COMUNIDADE LOCAL.....</b> | <b>3</b>  |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>2.1 Área de Estudo.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>2.2 Procedimentos de Captura, Identificação Individual e Registro das Características Fenotípicas.....</b>  | <b>15</b> |
| <b>2.2.1 Locais de captura.....</b>  | <b>15</b> |
| <b>2.2.2 Procedimentos pré-captura.....</b>  | <b>16</b> |
| <b>2.2.3 Procedimentos durante a captura, sedação e identificação individual.....</b>  | <b>18</b> |
| <b>2.2.4 Caracterização fenotípica.....</b>  | <b>18</b> |
| <b>2.2.5 Retorno anestésico, soltura e monitoramento pós-soltura.....</b>  | <b>19</b> |
| <b>2.3 Entrevistas com Moradores e Militares.....</b>  | <b>19</b> |
| <b>3 RESULTADOS.....</b>   | <b>20</b> |
| <b>3.1 Descrição Morfológica.....</b>  | <b>20</b> |
| <b>3.2 Entrevistas com os Moradores.....</b>   | <b>24</b> |
| <b>3.3 Entrevistas com Militares e Relatos de Avistamentos na Restinga da Marambaia.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>4 DISCUSSÃO.....</b>  | <b>29</b> |
| <b>5 CONCLUSÕES.....</b>   | <b>35</b> |
| <b>CAPÍTULO II - ANÁLISE DO GENE MITOCONDRIAL CITOCROMO OXIDASE II E DO CARIÓTIPO DOS MACACOS-PREGO DA ILHA DA MARAMBAIA, MANGARATIBA, RJ.....</b>                                   | <b>37</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>40</b> |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>   | <b>47</b> |
| <b>2.1 Coleta de Amostras Biológicas.....</b>  | <b>47</b> |
| <b>2.2 Análise Molecular.....</b>  | <b>48</b> |
| <b>2.2.1 Extração de DNA.....</b>  | <b>48</b> |
| <b>2.2.2 Purificação das amostras de DNA.....</b>  | <b>49</b> |

|               |   |           |
|---------------|---|-----------|
| 2.2.3         | Reação em cadeia da polimerase (PCR).....   | 49        |
| 2.2.4         | Sequenciamento.....   | 50        |
| 2.2.5         | Análises filogenéticas.....   | 50        |
| 2.3           | Análise Citogenética.....   | 51        |
| 2.3.1         | Cultivo celular.....  | 51        |
| 2.3.2         | Coloração convencional.....   | 52        |
| 2.3.3         | Bandamento de heterocromatina constitutiva (banda C).....   | 52        |
| 2.3.4         | Bandamento G.....   | 52        |
| 3             | RESULTADOS.....   | 52        |
| 3.1           | Análise Molecular.....  | 53        |
| 3.2           | Análise Citogenética.....   | 55        |
| 3.2.1         | Coloração convencional.....   | 55        |
| 3.2.2         | Bandamento C.....   | 58        |
| 3.2.3         | Bandamento G.....   | 60        |
| 4             | DISCUSSÃO.....  | 60        |
| 5             | CONCLUSÕES.....   | 65        |
|               | CONCLUSÕES GERAIS .....   | 66        |
|               | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 68        |
| <br>          |   |           |
| <b>ANEXOS</b> |   |           |
|               | <b>Anexo I - Questionário utilizado com os moradores da Ilha da Marambaia.....</b>  | <b>78</b> |
|               | <b>Anexo II - Imagens de primatas mostradas aos moradores da Ilha da Marambaia e militares do exército na Restinga da Marambaia.....</b>  | <b>79</b> |
|               | <b>Anexo III - Questionário utilizado com os militares da Restinga da Marambaia.....</b>  | <b>80</b> |
|               | <b>Anexo IV - Padrão de pelagem dos 12 indivíduos de macaco-prego da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, Rio de Janeiro.....</b>  | <b>81</b> |
|               | <b>Anexo V - Ilustrações das espécies de <i>Sapajus</i> para comparação com o fenótipo encontrado para os indivíduos de macaco-prego da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, Rio de Janeiro. Retiradas de Reis <i>et al.</i> (2015).....</b> | <b>85</b> |
|               | <b>Anexo VI - Sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II obtidas da literatura e utilizadas para comparação.....</b>  | <b>86</b> |
|               | <b>Anexo VII - Sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II obtidas no presente estudo.....</b>   | <b>88</b> |
|               | <b>Anexo VIII - Eletroferograma ilustrando parte do fragmento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II sequenciado para indivíduos de <i>Sapajus</i> sp. da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ.....</b>                                | <b>90</b> |

## INTRODUÇÃO GERAL

A urgência de estudos que promovam o conhecimento da biodiversidade tem sido cada vez mais reconhecida, principalmente em ambientes com elevado grau de degradação, como é o caso da Mata Atlântica. Considerado um *hotspot* de biodiversidade, esse bioma apresenta atualmente 8% da sua distribuição original, abrigando milhares de espécies animais e vegetais em seus fragmentos, além de 72% da população brasileira. A grande pressão antrópica sobre esse ambiente leva à fragmentação do *habitat* e coloca em risco as espécies, muitas delas ameaçadas, favorecendo à extinção e perda de informações relevantes quanto aos processos evolutivos.

Em meio às centenas de espécies animais presentes na Mata Atlântica, os primatas são geralmente usados como 'espécie-bandeira' por campanhas em prol da conservação, devido ao carisma junto ao público. Dentre os primatas dessa região estão os macacos-prego (*Sapajus nigritus*), uma espécie de macaco-do-novo-mundo endêmica da Mata Atlântica e amplamente utilizada em estudos de comportamento animal, principalmente no uso de ferramentas. Sua importância ecológica inclui a manutenção do ecossistema, enquanto dispersora de sementes, além de controlar outras populações animais, como aves e insetos, por ser uma espécie onívora. Sua distribuição inclui os estados do sudeste e sul do Brasil, além de uma parte do nordeste da Argentina, e assim como outras espécies do gênero, enfrenta problemas como caça e perda de habitat devido ao desmatamento. Seu *status* de conservação, segundo a União Internacional para Conservação da Natureza (*International Union for Conservation of Nature* - IUCN), ainda não é alarmante, em comparação a outras espécies do mesmo gênero consideradas "criticamente ameaçadas" (*S. flavius* e *S. xanthosternos*), mas já apresenta decréscimo em suas populações, estando atualmente "quase ameaçada" (*near threatened*).

O gênero ao qual *Sapajus nigritus* pertence foi criado em 2012 e ainda apresenta incertezas quanto às relações entre suas espécies. Ferramentas moleculares, como o sequenciamento de genes mitocondriais, têm se mostrado eficazes no estudo das relações entre espécies próximas e já foram empregadas, em associação à análise fenotípica, para o entendimento da evolução e biogeografia de *Sapajus*. Além destas, análises citogenéticas empregando técnicas de bandamento cromossômico, como a banda C, são amplamente utilizadas em estudos com macacos-prego, contribuindo para descrever padrões, por vezes considerados espécie-específicos, que favorecem para o conhecimento da diversidade e da taxonomia do gênero.

Durante três anos da graduação atuei em projetos de Iniciação Científica (ProIC/UFRRJ e FAPERJ) estudando macacos-prego em cativeiro no Centro de Triagem de Animais Silvestres do Estado do Rio de Janeiro. Ao participar de trabalhos de campo de disciplinas na Ilha da Marambaia, uma região isolada de Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro, me chamou a atenção a existência de uma população de macacos-prego. Em buscas na literatura, entretanto, não encontrava qualquer informação ou relato sobre esses primatas.

A importância de estudos de populações de macacos-prego como esta presente na Ilha da Marambaia, da qual pouco se sabe, tem sido exaltada por estudiosos da primatologia, sendo fundamental para o entendimento da evolução do gênero e conservação das espécies. Essa região conta com a proteção legal de uma Área de Proteção Ambiental, representando um local de grande importância para a conservação desses primatas e, conseqüentemente, para a manutenção de toda a região.

Desse modo, decidimos começar os estudos dessa população através do levantamento de dados iniciais que pudessem caracterizá-la. Conversei com os moradores da região buscando entender sua relação com os macacos-prego, bem como conhecer a dinâmica destes pela ilha. Pude identificar os locais com maior frequência de avistamentos de modo a capturar alguns dos animais para estudos do fenótipo e obtenção de amostras biológicas para análises genéticas.

Os resultados do trabalho estão apresentados nesta dissertação, dividida em dois capítulos. No primeiro capítulo está descrita a caracterização fenotípica dos padrões de pelagem dos primatas da Ilha da Marambaia, utilizada para o auxílio na identificação da espécie, além de dados de morfometria, incluindo massa corporal, comprimento do corpo e da cauda. Apresento, ainda, alguns relatos obtidos por meio de entrevistas dos moradores mais antigos da região e de militares da base do exército na Restinga da Marambaia, os quais contribuíram para estimarmos a origem e distribuição desses primatas na Marambaia. No segundo capítulo estão os resultados do sequenciamento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II, usado de modo a avaliar as relações taxonômicas da população com a espécie de mesma área de distribuição, *S. nigritus*, além de outras, congêneres, de regiões próximas. Foi realizada, ainda, a análise citogenética por coloração convencional e bandamento C para descrição do padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva nos cromossomos. Ao final, as conclusões gerais contemplam os principais achados de ambos os capítulos, incluindo recomendações para trabalhos futuros.

## **CAPÍTULO I**

# **OS MACACOS-PREGO DA ILHA DA MARAMBAIA, MANGARATIBA, RJ: CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E HISTÓRIA RECENTE COM BASE EM RELATOS DE MORADORES DA COMUNIDADE LOCAL**

## RESUMO

As espécies de macacos-prego e caiararas estão amplamente distribuídas pelas Américas do Sul e Central. No Brasil, há predominância do gênero *Sapajus* (macacos-prego), sendo *S. nigrinus* nativo da Mata Atlântica na região sudeste. A pelagem desta espécie é marrom escura à enegrecida na maior parte do corpo, contrastando com os pelos brancos da face, e apresentam tufo no topo da cabeça. Uma população de macacos-prego habita a Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, um importante remanescente de Floresta Atlântica no estado do Rio de Janeiro. Até o momento não existem informações acerca desses primatas, que podem estar isolados do continente há milhares de anos. Os objetivos deste capítulo foram: comparar as características fenotípicas de pelagem dos indivíduos de *Sapajus* sp. da Ilha da Marambaia com as descritas na literatura para *S. nigrinus*, espécie nativa do sudeste do Brasil, visando auxiliar sua identificação; estimar a possível origem e distribuição dessa população na região, através de entrevistas com moradores mais antigos e militares das forças armadas das bases localizadas na Restinga da Marambaia. Após habituação, os animais foram capturados com armadilhas do tipo Tomahawk. Depois de sedados, foram analisadas as colorações de pelagem do dorso, ventre, membros, cauda, topo da cabeça e face. Também foram aferidos a massa corporal e o comprimento do corpo e da cauda. Os questionários possuíam perguntas abertas e foram realizados de forma direta, de modo a avaliar os conhecimentos dos moradores e militares acerca dos primatas da região. Foram capturados 12 indivíduos (8 machos e 4 fêmeas) entre novembro de 2014 e setembro de 2015. A massa corporal média dos machos adultos foi de 3,09 Kg, e para as fêmeas adultas de 2,16 Kg. O comprimento médio do corpo dos machos adultos foi de 39,4 cm e das fêmeas adultas foi de 35,0 cm. A média do comprimento da cauda dos machos adultos foi de 40,3 cm e das fêmeas, 40,8 cm. Foram observados dois padrões de pelagem. Um apresentava coloração do dorso marrom, com faixa dorsal somente nos jovens, peito amarelo, antebraço, membros pélvicos e cauda enegrecidos. O topo da cabeça era enegrecido com a face branca ou amarelada contrastante. No outro padrão, a coloração era enegrecida no dorso, membros, cauda e topo da cabeça. O ventre era marrom e a face branca ou amarelada. Foram observados tufo de pelos na cabeça para a maioria dos adultos, sendo mais proeminentes nas fêmeas. O padrão fenotípico encontrado, inclusive a variação apresentada, corresponde ao descrito para *Sapajus nigrinus*, o que pode sugerir ser esta a espécie dos macacos-prego da Ilha da Marambaia. Os valores médios de biometria estão, no geral, abaixo do descrito para esta espécie, embora não tenha sido possível confirmar estatisticamente devido à falta de dados na literatura para comparação. Através das entrevistas com moradores e militares foi possível identificar que os primatas estão na ilha há pelo menos 130 anos, provavelmente isolados atualmente. Mais indivíduos desta e de outras populações do Rio de Janeiro devem ser estudados para confirmação dos dados obtidos.

Palavras-chave: Primates, Cebidae, *Sapajus* sp.

## ABSTRACT

The capuchin monkeys species (*Cebus* and *Sapajus*) are widely distributed across South and Central America. In Brazil, *Sapajus* is predominant, being *S. nigritus* native of the Atlantic Forest in southeast. The coat coloration of this species is dark brown to blackish on the most parts of the body, in contrast with the white face, presenting tufts on the top of the head. Capuchin monkeys are present at Ilha da Marambaia, Mangaratiba city, an important remnant of Atlantic Forest in Rio de Janeiro state. Until now there is no information about any aspect of these primates, which can be isolated for thousands of years. The objectives of this chapter were: to compare the phenotypic characteristics of coat coloration presented by the capuchin monkeys from Ilha da Marambaia with those described in the literature for *S. nigritus*, the native species in southeastern Brazil, in order to aid in the identification; to estimate its possible origin and distribution through reports from the oldest inhabitants and army military personnel at the bases located at Restinga da Marambaia. After habituation, the animals were caught in Tomahawk traps. After sedation, were analyzed the coat coloration of the back, belly, limbs, tail, top of the head and face, as well as measured body mass, and the size of body and tail. The questionnaire contained open questions and were carried out directly, in order to characterize the knowledge of the inhabitants and military personnel about the primates in the region. Twelve animals were caught (eight male and four female), between november 2014 and september 2015. The average body mass for adult males was 3.09 kg, and for adult females was 2.16 kg. The average body length of adult males was 39.4 cm, while for adult females was 35.0 cm. The tails of adult males presented an average of 40.3 cm, and for females 40.8 cm. Two patterns of coat coloration were observed. One was brown back, with dorsal stripe only in young, yellow chest, and blackish forearm, pelvic limbs and tail. The top of the head was blackish with contrasting white or yellowish face. In the another pattern, individuals presented blackish coloration on the back, limbs, tail and top of the head. The belly was brown and face was white or yellowish. The tufts on the head were observed for most adults, but for females were more prominent. The phenotypic pattern found, including the variation shown, corresponds to that described for *Sapajus nigritus*, which can suggests it is probably the species of capuchin monkeys of Ilha da Marambaia. The biometric values obtained are, in general, lower than described for this species, although it was not possible to confirm statistically due to lack of data in the literature for comparison. Through interviews with residents and military personnel it was possible to identify that these primates are present on the island for at least 130 years, and seem to be currently isolated. A larger number of individuals from this and others populations from Rio de Janeiro should be studied to confirm the data presented.

Keywords: Primates, Cebidae, *Sapajus* sp.

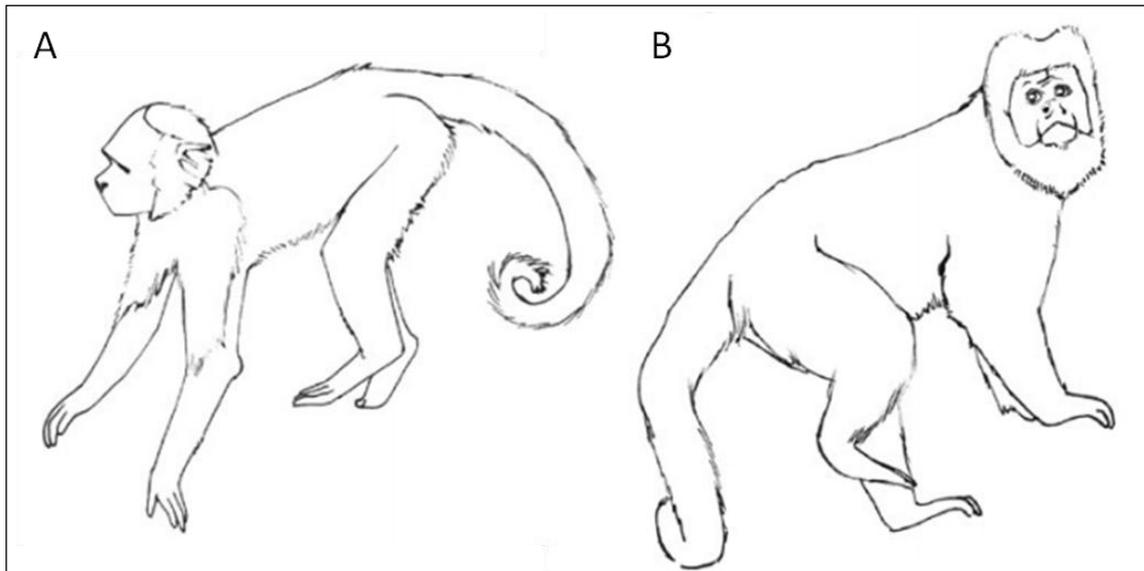
## 1 INTRODUÇÃO

A classificação das espécies de macacos-prego e caiararas (gêneros *Sapajus* Kerr, 1792 e *Cebus* Erxleben, 1777 - Platyrrhini: Cebidae) é uma das mais controversas da ordem Primates, devido às variações de pelagem influenciadas por fatores como idade, sexo e região geográfica (Hill, 1960). A sistemática fundamentada no fenótipo levou a variadas propostas de organização (Hershkovitz, 1949; Cabrera, 1957; Hill, 1960; Groves, 2001; Silva Jr., 2001), que agrupavam as espécies em um único gênero (*Cebus*), separando-as conforme a divisão proposta por Elliot (1913), baseada na presença ou ausência de tufos de pelos na cabeça.

Uma das classificações mais utilizadas, proposta por Groves (2001), agrupava *Cebus apella*, *C. libidinosus*, *C. xanthosternos* e *C. nigrinus* no grupo com tufos, enquanto *C. capucinus*, *C. albifrons*, *C. olivaceus* e *C. kaapori* compunham o grupo sem tufos. Silva Jr. (2001), através de análises morfológicas, propôs a divisão desses grupos ao nível taxonômico, indicando *Sapajus* e *Cebus* como subgêneros de *Cebus*, representando as espécies com e sem tufos, respectivamente. Neste caso, não houve mudança com relação à divisão das espécies proposta por Groves (2001), apenas incluindo *C. robustus*, *C. macrocephalus* e *C. cay* no grupo com tufos (*Sapajus*).

Lynch Alfaro *et al.* (2012a; 2012b), com base em dados de morfologia, ecologia, comportamento, biogeografia e de biologia molecular confirmaram a divisão proposta por Silva Jr. (2001), considerando *Cebus* e *Sapajus* grupos monofiléticos com tempo de divergência aproximado de 6.2 milhões de anos (Ma.) e elevaram ambos os táxons ao nível de gêneros. Segundo os autores, a forma do corpo é a característica que melhor retrata a diferença entre os gêneros (Figura 1), tendo sido citada pela primeira vez por Hill (1960). As espécies de *Sapajus* são descritas com porte corporal mais compacto e robusto quanto à cauda, membros, mandíbula e crânio, e designadas como "robust", enquanto as espécies de *Cebus* possuem corpo esguio ou delgado, com membros mais longilíneos, recebendo a denominação "gracile" (Alfaro *et al.*, 2012b). A classificação proposta por estes autores inclui *C. albifrons*, *C. capucinus*, *C. olivaceus* e *C. kaapori* no gênero *Cebus*, e *S. apella*, *S. macrocephalus*, *S. cay*, *S. libidinosus*, *S. nigrinus*, *S. robustus*, *S. xanthosternos* e *S. flavius*, (esta redescoberta por Oliveira & Langguth, 2006), no gênero *Sapajus*. Esta será a classificação adotada nesta dissertação.

Estima-se que a divergência entre os ancestrais de *Cebus* e *Sapajus* tenha ocorrido na bacia amazônica, sendo a origem do Rio Amazonas, há aproximadamente 7 Ma., a causa da vicariância. Os ancestrais das atuais espécies de *Cebus* teriam ficado restritos à região das Guianas e posteriormente radiado pela Amazônia, Andes, norte da Colômbia, Venezuela e América Central. Os ancestrais de *Sapajus*, por sua vez, teriam migrado para a Mata Atlântica, onde permaneceram a maior parte de sua história evolutiva, somente retornando para Amazônia há aproximadamente 400 mil anos, onde estabeleceram áreas de simpatria com espécies de *Cebus*. Ambos os clados teriam iniciado sua diversificação na transição Plio-Pleistoceno, há aproximadamente 2,7 Ma. para *Sapajus* e 2,1 Ma. para *Cebus* (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a).



**Figura 1:** Diferenças morfológicas entre *Cebus* e *Sapajus* (Platyrrhini: Cebidae). (A) Ilustração da silhueta da forma grácil ou “gracile” atribuída às espécies de *Cebus* e (B) forma robusta ou “robust” atribuída às espécies de *Sapajus*. Retirado de Lynch Alfaro *et al.* (2012b), desenho de Amisha Gadani.

Nascimento *et al.* (2015), ao analisarem os dados publicados por Lynch Alfaro *et al.* (2012a), questionam o cenário biogeográfico proposto por estes autores, criticando o que chamam de "technical shortcomings" (deficiências ou limitações técnicas) a respeito da coleta de dados, identificação de espécimes e processamento das amostras de DNA. Os autores propõem cenários diferentes, situando na Mata Atlântica a origem do ancestral comum a *Cebus* e *Sapajus* em concordância com a hipótese da origem africana dos primatas neotropicais (Schrage & Russo, 2003 *apud* Nascimento *et al.*, 2015). Outra possibilidade apresentada seria a origem de *Sapajus* na Mata Atlântica, enquanto *Cebus* teria se originado na porção oeste da Floresta Amazônica. Entretanto, os autores relatam que não se pode descartar a hipótese da origem de *Sapajus* na Floresta Amazônica e expansão de sua distribuição para Mata Atlântica, com subsequente e completa eliminação dos ancestrais do gênero nessa região. Embora assumam que seus resultados estejam sujeitos a incertezas, principalmente pela dificuldade de amostragens representativas de todos os locais de ocorrência dos gêneros, Nascimento *et al.* (2015) afirmam que o cenário apresentado por Lynch Alfaro *et al.* (2012a) não deve ser considerado confiável e sugerem a análise de variados genes e de um maior número de indivíduos por espécie, para uma melhor resolução da história evolutiva do grupo.

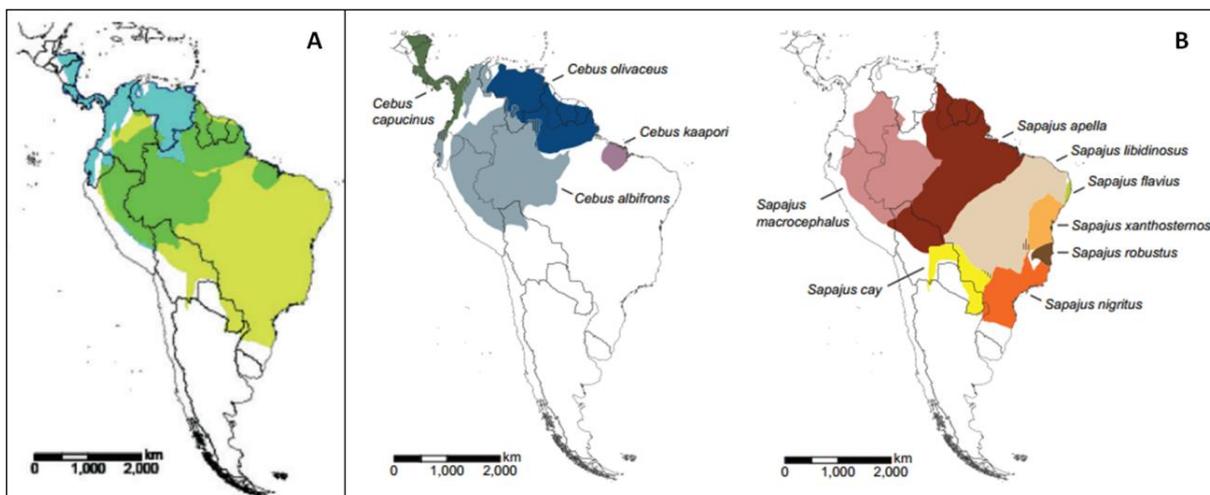
Após a proposta de uma nova classificação para macacos-prego e caiararas, Lynch Alfaro *et al.* (2014) destacaram que ainda não há conhecimento suficiente sobre *Sapajus* e *Cebus* para sabermos quantas espécies realmente existem. Por conseguinte, optaram por uma avaliação conservadora para estimativa dos táxons que os compunham, seguindo as recomendações da União Internacional para a Conservação da Natureza (*International Union for Conservation of Nature* - IUCN) para grupos com classificação incerta. Com base nos dados de Groves (2001), Boubli *et al.* (2012) e Rylands *et al.* (2013), os autores consideraram a existência de 25 táxons ou unidades evolutivamente significativas, citando 14 espécies para *Cebus*, sendo uma delas com 2 subespécies, e 8 espécies para *Sapajus*, com duas delas apresentando duas subespécies cada (Tabela 1).

A distribuição atual das espécies de *Cebus* abrange a América Central e grande parte da região norte da América do Sul, enquanto as espécies de *Sapajus* estão presentes desde o nordeste da Argentina e região sul do Brasil, até o norte da América do Sul, onde se encontram em simpatria com *Cebus* em grandes áreas da Amazônia (Figura 2 - Vilanova *et al.*, 2005; Lynch Alfaro *et al.*, 2012a; Lynch Alfaro *et al.*, 2012b).

**Tabela 1:** Taxonomia proposta por Lynch Alfaro *et al.* (2014) para os gêneros *Cebus* e *Sapajus* (Platyrrhini: Cebidae).

| Gênero <i>Cebus</i> Erxleben, 1777 | Gênero <i>Sapajus</i> Kerr, 1792 |
|------------------------------------|----------------------------------|
| <i>Cebus capucinus</i>             | <i>Sapajus apella apella</i>     |
| <i>Cebus imitator</i>              | <i>S. apella margaritae</i>      |
| <i>Cebus leucocephalus</i>         | <i>Sapajus macrocephalus</i>     |
| <i>Cebus cesarae</i>               | <i>Sapajus flavius</i>           |
| <i>Cebus versicolor</i>            | <i>Sapajus libidinosus</i>       |
| <i>Cebus aequatorialis</i>         | <i>Sapajus cay</i>               |
| <i>Cebus albifrons</i>             | <i>Sapajus xanthosternos</i>     |
| <i>Cebus yuracus</i>               | <i>Sapajus robustus</i>          |
| <i>Cebus cuscinus</i>              | <i>Sapajus nigritus nigritus</i> |
| <i>Cebus unicolor</i>              | <i>S. nigritus cucullatus</i>    |
| <i>Cebus malitiosus</i>            |                                  |
| <i>Cebus brunneus</i>              |                                  |
| <i>Cebus olivaceus olivaceus</i>   |                                  |
| <i>C. olivaceus castaneus</i>      |                                  |
| <i>Cebus kaapori</i>               |                                  |

No Brasil há predominância do gênero *Sapajus* (Figura 2b), com ocorrência de todas as espécies (Lynch Alfaro *et al.*, 2014). Silva Jr. (2001), através de análises morfométricas, subdividiu o gênero em três grupos geográficos: espécies amazônicas (*S. macrocephalus* e *S. apella*); espécies do Cerrado e Mata Atlântica ao norte do Rio Doce (*S. libidinosus*, *S. cay*, *S. robustus* e *S. xanthosternos*); e *S. nigritus* como a única da Mata Atlântica ao sul do Rio Doce. A espécie *S. flavius* não foi mencionada por ter sido redescoberta posteriormente (Oliveira & Langguth, 2006), mas provavelmente seria incluída no segundo grupo, uma vez que ocorre no nordeste do Brasil (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a).



**Figura 2:** Mapas da América Central e do Sul destacando a distribuição das espécies de *Cebus* e *Sapajus* (Platyrrhini: Cebidae). (A) Distribuição dos gêneros indicando em verde as áreas de simpatria, em azul ocorrência apenas das espécies de *Cebus* e em amarelo áreas de ocorrência das espécies de *Sapajus*. Retirado de Lynch Alfaro *et al.*, (2012b). (B) Distribuição aproximada das espécies de *Cebus* (à esquerda) e *Sapajus* (direita). Retirado de Lynch Alfaro *et al.* (2012a).

No sudeste do Brasil encontra-se, de forma predominante, *Sapajus nigrinus* (Goldfuss, 1809). Esta espécie, endêmica da Mata Atlântica, inicia sua distribuição ao sul do Rio Doce (Minas Gerais e Espírito Santo), estendendo-se aos estados da região sul do Brasil e nordeste da Argentina, estando delimitada ao sul pelos municípios de Porto Alegre e Santa Cruz (Rio Grande do Sul), além do oceano Atlântico a leste e Rio Paraná a oeste (Printes *et al.*, 2001; Fragaszy *et al.*, 2004; Vilanova *et al.*, 2005). Lynch Alfaro *et al.* (2014) consideram duas distribuições relacionadas às subespécies de *S. nigrinus*, estando *S. n. cucullatus* presente nos estados brasileiros de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, além de Iguazu, na Argentina, enquanto *S. n. nigrinus* teria sua distribuição restrita ao Brasil, nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro.

Conhecidos popularmente como macacos-prego-pretos (em inglês, *black horned capuchin*), os indivíduos de *S. nigrinus* apresentam pelagem marrom-escura ou cinza, ou até mesmo enegrecida, com listra dorsal vaga ou ausente. Os membros são mais escuros que o restante do corpo e o peito possui tom avermelhado. A face é branca, em contraste com o restante do corpo. O capuz é escuro e os tufos são evidentes, podendo ser eretos, voltados para os lados ou para frente (Fragaszy *et al.*, 2004). Como as características fenotípicas para macacos-prego e caiararas são variáveis de modo intraespecífico (Hill, 1960), distintos padrões de pelagem podem ser encontrados, inclusive em uma mesma população. Em um levantamento de fenótipos para uma população de *S. nigrinus* em um Parque Ecológico em São Paulo, Vieira & Oliveira (2014) identificaram dois fenótipos, descritos como "preto brilhante" e "marrom", com predominância (78%) do primeiro.

Na natureza, indivíduos de *S. nigrinus* são encontrados formando grupos de 6 a 30 indivíduos, vivendo em densidade média de 24,5 indivíduos/Km<sup>2</sup>, em áreas que podem variar de 0,56 a 2,9 Km<sup>2</sup> (Freese & Oppenheimer, 1981; Fragaszy *et al.*, 2004; São Bernardo & Galetti, 2004; Ludwig *et al.*, 2005). A massa corporal média nos animais adultos é de aproximadamente 3,25 Kg para os machos e 2,30 Kg para fêmeas, com comprimento do corpo variando de 38,0 a 56,0 cm nos machos e entre 34,0 e 48,0 cm nas fêmeas (Aguiar,

2006; Silveira *et al.*, 2008; Mittermeier *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2015). A cauda sempre-prensil é tão grande quanto o corpo, com média geral de 48,2 cm (Silveira *et al.*, 2008).

O *status* de conservação da espécie, segundo a IUCN é “quase ameaçado” (*Near Threatened*), devido ao declínio contínuo das populações remanescentes fragmentadas (Kierulff *et al.*, 2015). Esse fato decorre da caça e perda de hábitat por desmatamento ou desertificação enfrentada por todas as espécies de macacos-prego (Lynch Alfaro *et al.*, 2014), além da elevada pressão antrópica na Floresta Atlântica (Jones, 2001). Por ser uma espécie onívora com grande adaptabilidade a ambientes alterados, *S. nigritus* pode sobreviver em fragmentos florestais degradados, desde que tenha acesso a fontes alimentares, podendo tornar-se uma praga para produtores rurais (Rocha, 2000; Ludwig *et al.*, 2005).

Diversos estudos vêm sendo publicados sobre esta espécie nas áreas de ecologia, comportamento, genética e taxonomia, com amostras ou populações do Brasil e da Argentina (Amaral *et al.*, 2005; Ludwig *et al.*, 2005; Gonçalves, 2006; Gomes, 2006; Lynch Alfaro, 2007; Rímoli *et al.*, 2008; Santana *et al.*, 2008; Brocardo *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2010; Nieves *et al.*, 2011; Garber *et al.*, 2012; Ruiz-García *et al.*, 2012b; Tokuda, 2012; Steinberg *et al.*, 2014; Vieira & Oliveira, 2014), mas poucos são aqueles realizados com *S. nigritus* no estado do Rio de Janeiro (Tabela 2). Nem mesmo os levantamentos realizados por Gonçalves (2006), com estudos *in situ* de *S. nigritus* no Brasil em diversas áreas do conhecimento, e por Lynch Alfaro *et al.* (2014), com ecologia e comportamento para todas as espécies de *Cebus* e *Sapajus*, incluíram referências que tenham utilizado dados de *S. nigritus* provenientes do estado do Rio de Janeiro.

Grupos de macacos-prego habitam a região da Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, um importante remanescente de Floresta Atlântica no estado do Rio de Janeiro (Pereira *et al.*, 2008; Bueno *et al.*, 2009). Entretanto, até o momento, não existe informação alguma acerca de qualquer aspecto da população ali presente, inclusive a confirmação da espécie a qual pertencem.

A região da Marambaia estende-se pelos municípios de Itaguaí, Mangaratiba e Rio de Janeiro e inclui uma estreita faixa arenosa, com cerca de 40 km de comprimento, conhecida como Restinga da Marambaia, além de uma extremidade montanhosa a oeste, com 3,5 km de largura, conhecida como Ilha da Marambaia (Roncarati & Menezes, 2005).

Acompanhando o histórico de oscilações do nível marinho ao longo da história geológica, é possível afirmar que entre 123.000 e 7.000 anos (transição Pleistoceno-Holoceno), período em que o nível do mar estava mais baixo que o presente (regressão), as atuais ilhas presentes nas baías de Sepetiba e de Ilha Grande, como a Ilha da Marambaia e Ilha Grande, não existiam, e toda a área compreendida por essas baías encontrava-se coberta por Mata Atlântica. Com o aumento do nível do mar (transgressão), essas ilhas foram formadas, sendo a Ilha Grande a primeira a se desconectar do continente, seguida pela Ilha da Marambaia e Ilha de Itacuruçá, permanecendo assim até o presente (Belo *et al.*, 2002; Pereira, 2010). Posteriormente ao estabelecimento da Ilha da Marambaia houve a formação da Restinga da Marambaia, originada a partir do final da última transgressão, na qual o mar teria atingido cerca de 5 m acima do nível atual, ocorrido entre 7.000 e 5.200 anos atrás. Correntes marítimas vindas a oeste do Pico da Marambaia, que à época formava uma ilha e atualmente é o ponto mais alto da Marambaia com 641m de altura, depositaram sedimentos na sua porção leste, iniciando a formação de um cordão arenoso (Figura 3). Com deposições posteriores no sentido oeste-leste, indo em direção à Ponta de Guaratiba, o cordão arenoso foi-se estendendo,

isolando parcialmente do mar aberto a então enseada (e hoje baía) de Sepetiba, processo completado há aproximadamente 1500 anos atrás (Roncarati & Menezes, 2005).

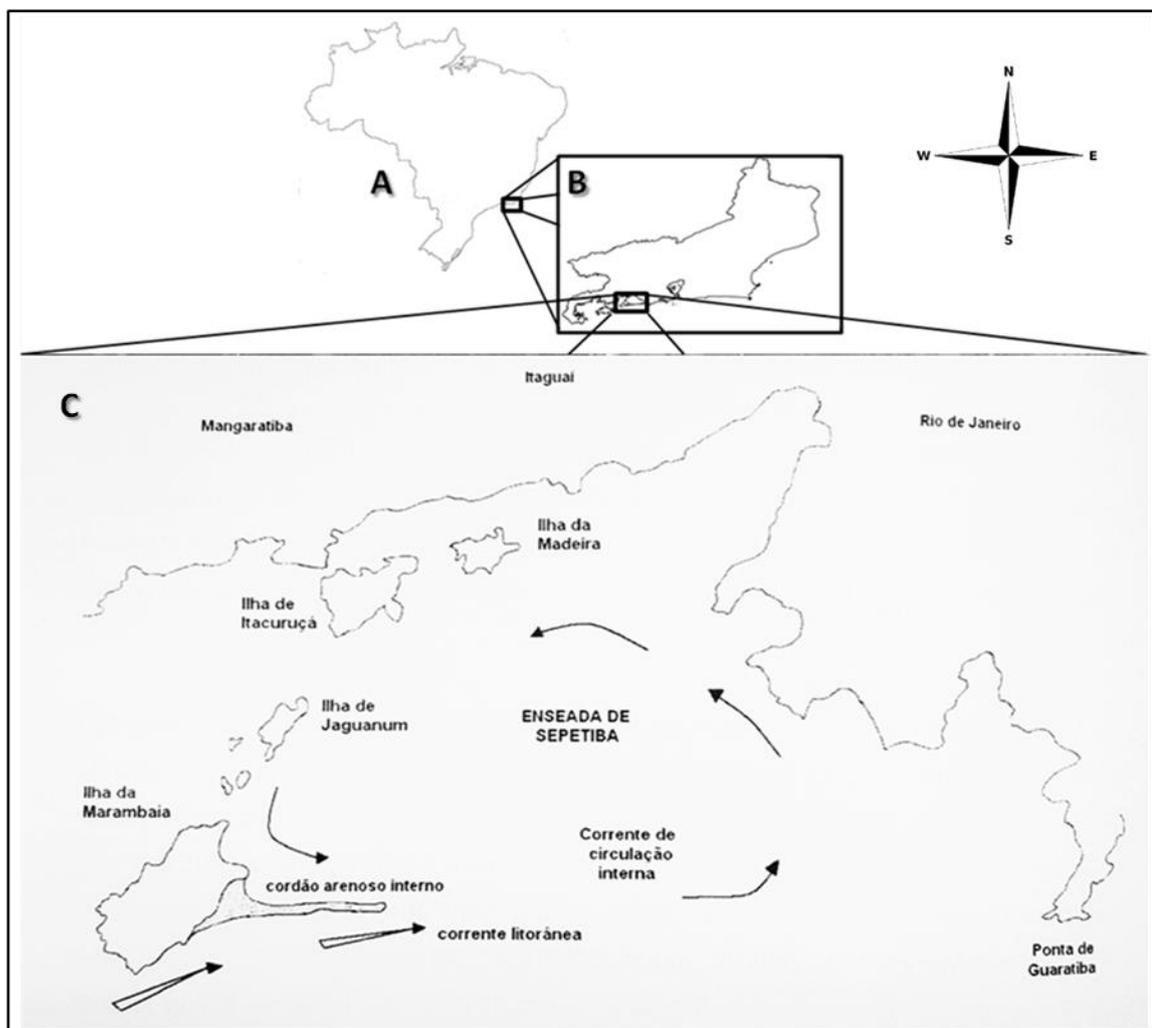
**Tabela 2:** Artigos científicos publicados que incluíram dados de indivíduos ou populações de *Sapajus nigritus* (Platyrrhini: Cebidae) em diferentes localidades do estado do Rio de Janeiro.

| <b>Tipo de trabalho</b>                                       | <b>Local</b>                                | <b>Referência</b>                  |
|---|---|------------------------------------|
| Amostra de seis espécimes para análise citogenética           | Não especificado                            | Matayoshi <i>et al.</i> , 1987     |
| Levantamento da ocorrência de primatas                        | Itatiaia                                    | Loretto & Rajão, 2005              |
| Levantamento de mamíferos coletados e depositados em coleções | Paraty                                      | Vaz, 2005                          |
| Observação preliminar sobre uso de habitat e dieta            | Jardim Botânico da cidade do Rio de Janeiro | Cunha <i>et al.</i> , 2006         |
| Levantamento da densidade de mamíferos                        | Silva Jardim e Casimiro de Abreu            | Araújo <i>et al.</i> , 2008        |
| Levantamento da ocorrência de mamíferos                       | Campos dos Goytacazes e Silva Jardim        | Pessôa <i>et al.</i> , 2010        |
| Amostra de um espécime para análise molecular                 | Angra dos Reis                              | Lynch Alfaro <i>et al.</i> , 2012a |
| Relato de morte por agressão entre indivíduos                 | Jardim Botânico da cidade do Rio de Janeiro | Rangel <i>et al.</i> , 2013        |
| Amostra de um espécime para análise molecular                 | Angra dos Reis                              | Nascimento <i>et al.</i> , 2015    |

Atualmente, há uma necessidade urgente do estudo de populações de macacos-prego e caiararas em todos os tipos de hábitat ao longo de suas distribuições e em áreas onde se conhece pouco sobre a população presente (Lynch Alfaro *et al.*, 2014), como é o caso da Ilha da Marambaia.

Como até o momento nenhum estudo foi realizado com a população de macacos-prego presente nessa região, a qual pode estar isolada desde a formação da ilha, a associação dos conhecimentos da comunidade local à pesquisa científica pode fornecer informações valiosas

sobre sua origem que, de certa forma, não poderiam ser obtidas em outras fontes (Huntington, 1998; Gonçalves, 2006).



**Figura 3:** Ilustração do início da formação da Restinga da Marambaia, Mangaratiba, Rio de Janeiro. (A) Mapa do Brasil; (B) destaque para o estado do Rio de Janeiro; (C) em detalhe, a formação do cordão arenoso a partir da Ilha da Marambaia que deu origem à Restinga da Marambaia. Adaptado de Roncarati & Menezes (2005).

A comunidade que hoje reside na Ilha da Marambaia é em grande parte descendente de escravos da fazenda de café do Comendador José Joaquim de Souza Breves, que comandava o entreposto de recebimento e triagem de escravos da Marambaia, iniciado no século XVIII e mantido até o fim da década de 1880 (Nóbrega, 2004; da Silva, 2005). Com a abolição da escravatura, em 1888, e a morte do Comendador, em 1889, as fazendas entraram em decadência, sendo vendidas pelos herdeiros. Os ex-escravos e seus descendentes continuaram na Ilha, tendo importante papel no processo de ocupação, voltando-se para atividades de subsistência como plantio familiar e pesca (Nóbrega, 2004). No início do século XX, a Ilha foi comprada pela União e nela instalada, em 1908, pela Marinha, a Escola de Aprendizes Marinheiros. Esta foi transferida para o município de Campos dos Goytacazes dois anos depois, retornando apenas em 1981 com a instalação do Centro de Adestramento e Instrução dos Fuzileiros Navais (Nóbrega, 2004; Conde *et al.*, 2005), que atualmente recebe o

nome de Centro de Avaliação da Ilha da Marambaia (CADIM). Várias transições políticas e proprietárias da Ilha da Marambaia ocorreram ao longo da história, assim como alterações de costumes e modos de vida da população, mas algumas tradições e, principalmente, os conhecimentos transmitidos através das gerações ainda persistem na comunidade (Nóbrega, 2004; da Silva, 2005).

Atualmente, a população residente da Ilha da Marambaia é composta por aproximadamente 430 moradores, distribuídos em 170 famílias, segundo levantamento feito pela própria comunidade em 2014 e informado pelo líder da Associação de Moradores Remanescentes Quilombola da Ilha da Marambaia (ARQIMAR), Sr. Nilton Alves.

Também fazem parte da comunidade da Marambaia os militares que trabalham nas bases da Marinha, da Aeronáutica e do Exército, as quais ocupam, respectivamente, a ilha, a porção central da restinga (à leste da ilha) e a porção final da restinga, próximo ao continente. Muitos dos militares que trabalham nessas bases participam de treinamentos que envolvem incursões por toda a extensão da ilha e da restinga, o que propicia um conhecimento bastante aprofundado da região.

Os objetivos deste capítulo foram: comparar as características fenotípicas de pelagem dos macacos-prego da Ilha da Marambaia com as descritas para *Sapajus nigritus*, que ocorre no Rio de Janeiro, de modo a auxiliar na identificação da população; estimar a possível origem da população de macacos-prego da ilha através de relatos dos moradores mais antigos da região; e averiguar a ocorrência dos macacos-prego nos arredores da ilha para avaliar se a população está isolada na região, através de relatos e entrevistas com militares das bases da aeronáutica e do exército, na Restinga da Marambaia.

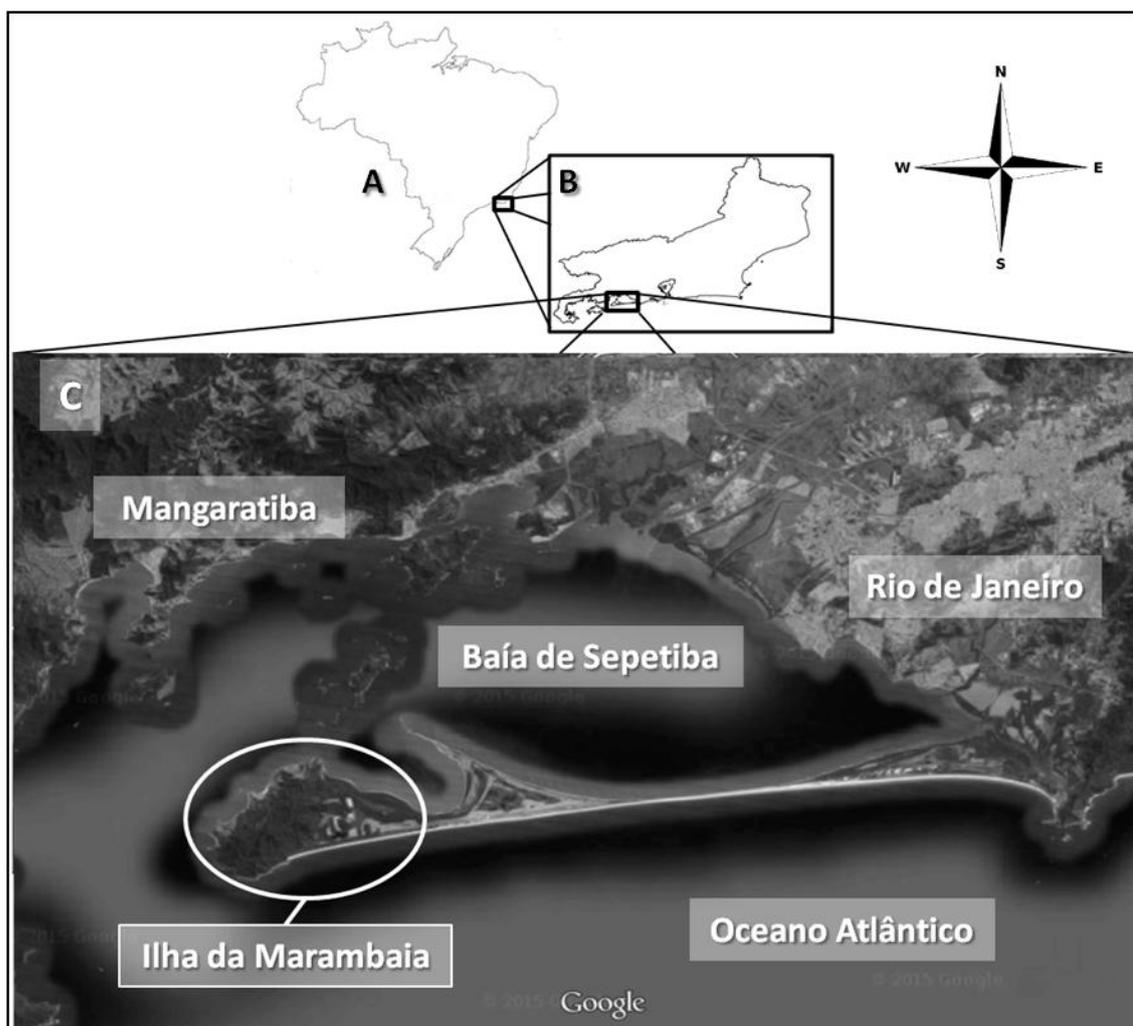
Para cada objetivo, foram levantadas duas hipóteses. Em relação ao fenótipo:  $H_0$  - os macaco-prego da Ilha da Marambaia apresentam fenótipo semelhante ao descrito para *Sapajus nigritus*, por se tratar da espécie que ocupa a respectiva área de ocorrência;  $H_1$  - o fenótipo diverge do descrito para a espécie em sua área de ocorrência. Em relação à origem da população, com base nos relatos dos moradores:  $H_0$  - a população de macacos-prego da Ilha da Marambaia é nativa da região, havendo relatos históricos dos moradores locais, passados por gerações;  $H_1$  - a população foi introduzida na região, sendo avistada pelos moradores a partir do período de sua introdução. E em relação à ocorrência dos primatas fora da ilha:  $H_0$  - os macaco-prego estão restritos à área da Ilha da Marambaia e suas proximidades;  $H_1$  - os macacos-prego são avistados por toda a extensão da Restinga da Marambaia, transitando livremente entre a ilha e o continente.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Área de Estudo

O presente estudo foi realizado na Ilha da Marambaia (23°04'S e 43°53'W), município de Mangaratiba, sul do estado do Rio de Janeiro (Figura 4). Com aproximadamente 42 Km<sup>2</sup>, essa área apresenta relevo montanhoso, tendo como ponto mais alto o Pico da Marambaia, com 641 m de altitude (Pereira *et al.*, 1990). Entre a Ilha da Marambaia e o continente está presente uma estreita faixa arenosa de 40 km de extensão, a Restinga da Marambaia (Conde *et al.*, 2005; Roncarati & Menezes, 2005). Ilha e restinga encerram, na porção sul, a Baía de Sepetiba (Carvalho *et al.*, 2007).

A cobertura vegetal é constituída por um importante remanescente de Floresta Atlântica no Estado do Rio de Janeiro, com área de 21,25 Km<sup>2</sup>, havendo predominância de mata secundária com sub-bosque denso, além de vegetação de Restinga e Mata Pluvial Costeira (Pereira *et al.*, 1990; Conde *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2008). O dossel, de um modo geral, alcança 12 m de altura, embora árvores emergentes de até 30 m sejam frequentes (Conde *et al.*, 2005).



**Figura 4:** Localização da Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, RJ. (A) Mapa do Brasil; (B) destaque para o estado do Rio de Janeiro; (C) em detalhe, localização da Ilha da Marambaia na Baía de Sepetiba. A faixa de terra que liga a Ilha da Marambaia à cidade do Rio de Janeiro recebe o nome de Restinga da Marambaia.

O macroclima da região é considerado tropical, segundo o sistema de classificação climática Köppen, com verão chuvoso, inverno seco e médias mensais de temperatura sempre acima de 20°C (Silva *et al.*, 2008; Paula *et al.*, 2009). A umidade relativa do ar durante todo o ano é próxima a 81%, diminuindo pouco no inverno (Paula *et al.*, 2009).

Assim como boa parte da costa brasileira, a Ilha da Marambaia apresenta longa história de ocupação humana (Kneip & Oliveira, 2005), principalmente nos séculos XVIII e XIX, período no qual estavam em atividade lavouras de café e entrepostos de acolhimento e triagem de escravos (Pereira *et al.*, 1990; Conde *et al.*, 2005; da Silva, 2005). Ainda assim,

algumas regiões são consideradas relativamente bem preservadas, como a face da ilha voltada para o Oceano Atlântico, enquanto outras apresentam diferentes estágios de regeneração (Conde *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 1990).

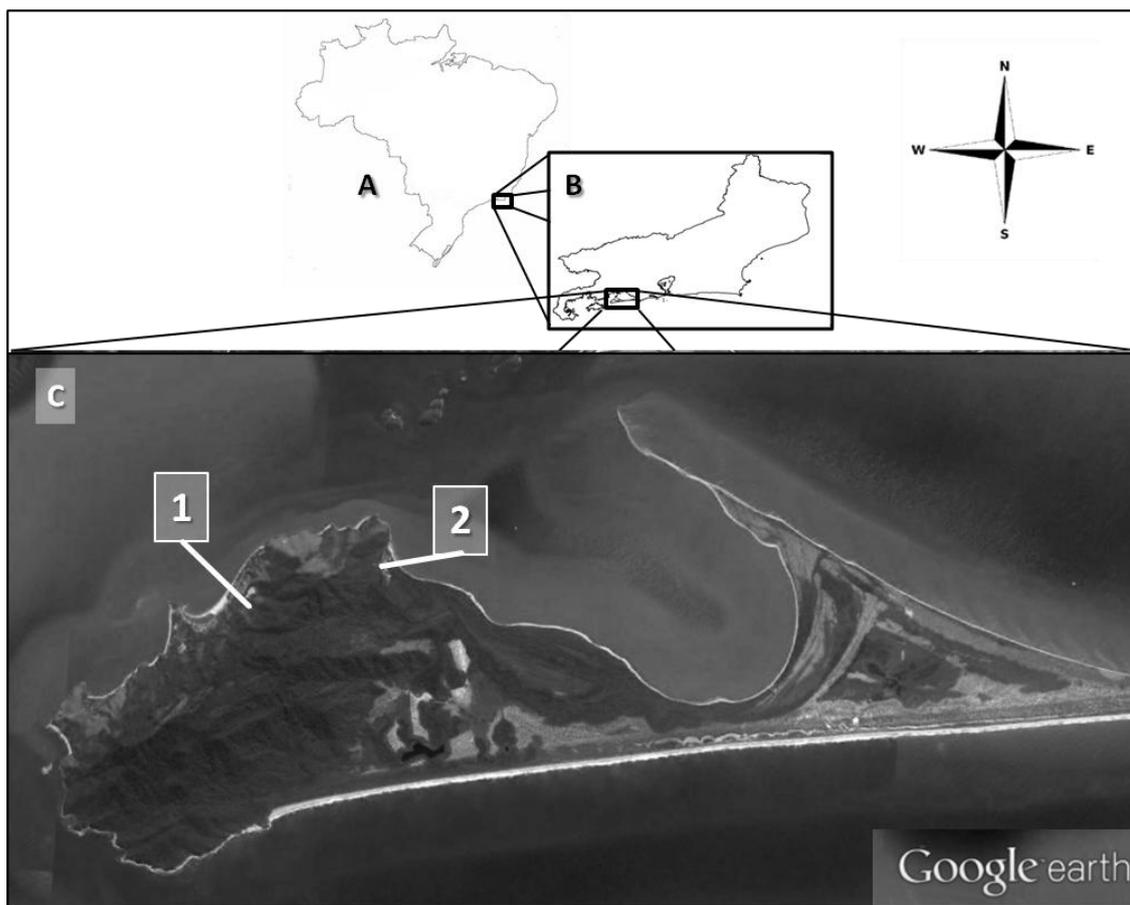
A ilha apresenta pouca pressão antrópica, tanto em termos de ocupação do solo quanto de extrativismo (Conde *et al.*, 2005) e é utilizada como território de treinamento militar pela Marinha do Brasil com o Centro de Avaliação da Ilha da Marambaia (CADIM), ordenando o uso dos recursos naturais por parte dos moradores e visitantes (da Silva, 2005). A Ilha da Marambaia conta com proteção legal, estando incluída na Área de Proteção Ambiental de Mangaratiba, instituída pelo Decreto estadual 9.802/87 (Rio de Janeiro, 1987), o que aumenta a garantia de conservação (Lourenço *et al.*, 2010).

## **2.2 Procedimentos de Captura, Identificação Individual e Registro das Características Fenotípicas**

### **2.2.1 Locais de captura**

Dentre os meses de março a maio de 2014 foi empregado esforço em identificar locais com maior frequência de avistamento de grupos de macacos-prego por meio de conversas com os moradores, além de percorridas algumas das trilhas presentes da região. Com base neste levantamento, foram estabelecidos dois locais de captura: um próximo à Vila Militar no CADIM - 23°3'24.28"S / 43°58'34.40"O - e um mais afastado da área habitada, na porção nordeste da ilha, próximo à Praia da Armação - 23°3'0.83"S / 43°57'16.47"O - (Figura 5).

Na área habitada, as armadilhas foram posicionadas no local onde os animais eram avistados com maior frequência, segundo os relatos dos moradores e posterior confirmação através de observações. Na região próxima à Praia da Armação, na porção nordeste da Ilha, as armadilhas foram posicionadas junto a uma antiga trilha utilizada pelos militares para passagem de veículos, denominada Estrada Velha, mas que atualmente encontra-se fechada pela mata e sem uso. Nesta localidade está presente uma quantidade significativa de exemplares de Dendê (*Elaeis guineensis*), uma planta introduzida no século XVII que se transformou em mata espontânea (Ribeiro, 2009). Próximo ao local existe uma casa cujo morador já havia confirmado a grande frequência de avistamentos.



**Figura 5:** Locais de captura de macacos-prego na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. (A) Mapa do Brasil; (B) destaque para o estado do Rio de Janeiro; (C) em detalhe, a Ilha da Marambaia e parte da Restinga da Marambaia. 1. Local de captura ( $23^{\circ}3'24.28''S$  /  $43^{\circ}58'34.40''O$ ) próximo à Vila Militar do CADIM; 2. local de captura próximo à praia da Armação ( $23^{\circ}3'0.83''S$  /  $43^{\circ}57'16.47''O$ ).

### 2.2.2 Procedimentos pré-captura

Após selecionados os locais de captura, fruteiras de bambu com bananas foram colocadas nos pontos onde os animais passavam habitualmente (Figura 6), de modo a manter a frequência onde, posteriormente, seriam colocadas as armadilhas.

O período de habituação dos animais ao local de captura estava concluído quando os grupos eram avistados com frequência diária. Neste momento, armadilhas do tipo Tomahawk foram posicionadas com as portas abertas e desarmadas, suspensas por cordas em plataformas de bambu (Figura 7). Diariamente, bananas eram repostas visando à habituação dos animais com as armadilhas. Foram utilizadas 4 armadilhas com as dimensões 70x40x40cm (CxLxA), sempre dispostas de modo a cobrir a área antes ocupada pelas fruteiras.

Ao verificar que os indivíduos estavam habituados a entrar nas armadilhas e comer as bananas, a captura era marcada para o dia seguinte.



**Figura 6:** Fruteira de bambu com bananas suspensa com auxílio de cordas, para habituação dos macacos-prego aos locais de captura na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ.



**Figura 7:** Armadilha do tipo Tomahawk suspensa com auxílio de cordas e plataforma de bambu para habituação e captura de macacos-prego na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ.

### 2.2.3 Procedimentos durante a captura, sedação e identificação individual

A coleta de dados morfológicos assim como das amostras biológicas foi feita no mesmo local da captura, tendo sido montada uma mesa para procedimentos em um ambiente coberto em um galpão na praia da Armação e na varanda de uma casa na Vila Militar.

As armadilhas foram armadas com bananas nos gatilhos, mantendo-se a observação constante, de longe, até a captura ser efetivada.

Com os indivíduos dentro das armadilhas, as mesmas foram trazidas ao solo cuidadosamente, cobertas com pano, na tentativa de diminuir o estresse provocado aos animais, e levadas ao local onde os procedimentos foram realizados.

Para a sedação os animais foram imobilizados em um dos lados da armadilha, com auxílio de hastes de ferro presas em suportes de madeira. Os animais foram sedados por um veterinário, ainda nas armadilhas, com anestésico dissociativo (cloridrato de cetamina e midazolam - 20mg/Kg e 0,05 a 0,1 mg/Kg, respectivamente) via intramuscular, com seringas de 3mL e agulha de 20 x 5,5mm, com tempo de ação de aproximadamente 60 minutos. Após avaliado o efeito da sedação, os animais foram retirados das armadilhas e colocados na mesa de procedimentos.

A identificação dos indivíduos foi feita com tatuagem na face interna da coxa esquerda, contendo número sequencial, utilizando-se dermopigmentador Mei-Cha® portátil. Previamente à tatuagem foi feita tricotomia e antissepsia com álcool 70%. Após completado o procedimento, a região tatuada era limpa novamente com álcool 70%.

Posteriormente, foram coletados dados morfológicos, além de amostras de sangue, para análise citogenética e de genética molecular (descritas nos itens 2.2 e 2.3 do Capítulo II).

### 2.2.4 Caracterização fenotípica

Inicialmente foi verificado o sexo e estimada a idade do animal, neste caso, de acordo com tamanho dos dentes caninos e porte corporal. De cada animal, foram registrados a massa corporal (MC), comprimento do corpo (Cc) e comprimento da cauda (Ccd) além das características de pelagem. A massa corporal foi aferida com balança digital (capacidade máxima de 50Kg e precisão de 10g) antes da sedação, diminuindo o peso da armadilha do total obtido. As medidas do corpo dos animais foram aferidas com fita métrica. Para o comprimento do corpo, foram realizadas medidas do topo da cabeça até a base da cauda. Para o registro da coloração de pelagem os animais foram fotografados com máquina digital Sony Cyber-shot® de 14.1 mega pixels, de corpo inteiro em decúbito ventral e dorsal, além da cabeça, em detalhe. Foram avaliadas a coloração da pelagem do dorso, a presença ou ausência de faixa dorsal mais escura, a coloração do peito, dos membros, da cauda, do topo da cabeça e da face, incluindo a presença ou ausência e o formato dos tufo de pelos no topo da cabeça. Foram realizadas análises estatísticas de comparação de médias para os valores de massa corporal, comprimento do corpo e da cauda, através do Teste *T*, utilizando o programa GraphPadPrism6®. As comparações foram efetuadas para todas as medidas entre machos e fêmeas adultos da população da Ilha da Marambaia. Foram realizadas, também, comparações dos machos e fêmeas adultos desta população com dados publicados para *S. libidinosus* e *S. flavius*, apenas para massa corporal, uma vez que somente para estas espécies e esta medida corporal foram apresentados na literatura os dados de média, desvio padrão e número amostral, permitindo a comparação.

### **2.2.5 Retorno anestésico, soltura e monitoramento pós-soltura**

Após o retorno completo dos reflexos e tônus muscular, ainda dentro das armadilhas, os animais eram alimentados e levados para a soltura nos mesmos locais onde haviam sido capturados. Após a soltura os animais continuavam sendo observados para certificação de que estavam com seus reflexos normais. Todos os procedimentos referentes à sedação, identificação, coleta de amostras biológicas e avaliação clínica dos animais foram realizados por pelo menos um veterinário, tendo sido aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob o protocolo nº 014/2014.

### **2.3 Entrevistas com Moradores e Militares**

As entrevistas na Ilha da Marambaia foram realizadas de forma direta, utilizando-se questionário com perguntas abertas e fechadas, de modo a registrar os conhecimentos dos moradores mais antigos da comunidade remanescente quilombola da Ilha da Marambaia em relação aos primatas presentes na região (Anexo I). Primeiro, foram registrados os dados relativos ao tempo de moradia no local, tanto dos entrevistados quanto das suas famílias. Para certificação da espécie de primata da ilha, foram apresentadas 4 imagens, retiradas da *internet*, representando um bugio (*Alouatta* sp.), um sagui (*Callithrix* sp.) e dois macacos-prego (sendo um *S. flavius* e um *S. nigritus* - Anexo II). Foi pedido ao entrevistado que indicasse qual das figuras melhor representava o macaco avistado na região. Confirmado o avistamento, foram colhidas informações sobre o(s) local(is) e desde quando via o tipo de macaco indicado na foto. Outras questões abordadas foram a quantidade de macacos que costumam avistar, em qual parte do dia e se havia um período do ano que apareciam mais. De modo a estimar há quanto tempo os macacos habitam a ilha, foi perguntado a esses moradores se seus pais ou demais parentes (caso fossem moradores da ilha) já falavam ou contavam histórias sobre os macacos. Também foi perguntado se já haviam visto algum pesquisador estudando os macacos da ilha, bem como se sabiam de alguma soltura de macacos realizada no local. Por fim, foi questionada a opinião dos moradores sobre a presença dos macacos na Ilha (sua possível importância, ou, talvez, importunação em algum aspecto de suas vidas).

Foram realizadas, ainda, entrevistas com militares do Centro de Avaliação do Exército (CAEx), localizado na porção leste da Restinga da Marambaia, próximo ao continente, de modo a avaliar a presença dos macacos-prego na extensão da restinga. Foi elaborado um questionário para entrevista direta (Anexo III), de modo a avaliar o tempo de vivência dos militares na restinga, em que área realizam seus trabalhos e as suas observações acerca da presença de primatas na região. Primeiro, foram registrados dados relativos ao tempo de trabalho na Restinga da Marambaia e se este envolvia incursões na mata. Foi questionado se os militares já haviam avistado algum primata na região da restinga e, caso a resposta fosse afirmativa, seriam apresentadas fotos de algumas espécies (Anexo II) para certificação dos primatas que ocorrem na Restinga da Marambaia. Por fim, em caso de já terem visto alguma espécie de primatas, seriam perguntados sobre a frequência, os locais e desde quando ocorrem os avistamentos, além do tamanho dos grupos.

### 3 RESULTADOS

Foram capturados 12 indivíduos de macacos-prego entre os meses de Novembro de 2014 e Setembro de 2015. Dentre eles, 8 eram machos (5 adultos e 3 jovens) e 4 fêmeas (2 adultas e 2 jovens). O esforço de captura empregado foi de aproximadamente 300 horas, em 5 excursões de campo com aproximadamente 8 dias de duração cada, contando com os preparativos em campo e colocação das armadilhas, tempo de ceva e dias de captura efetiva.

#### 3.1 Descrição Morfológica

A massa corporal dos indivíduos da Ilha da Marambaia variou de um modo geral, entre 1,26 e 3,94 Kg. Dentre os machos adultos ( $n = 5$ ) a variação foi de 2,15 a 3,94 Kg, com média de 3,09 Kg (DP = 0,80), enquanto para os jovens ( $n = 3$ ) a variação foi de 1,26 a 2,10 Kg, com média de 1,80 Kg (DP = 0,47). As fêmeas adultas ( $n = 2$ ) pesavam 1,63 e 2,68 Kg, com média de 2,16 Kg (DP = 0,74), enquanto as jovens ( $n = 2$ ) pesavam 1,56 e 1,75 Kg, com média de 1,66 Kg (DP = 0,13 - Tabela 3).

Em relação às medidas corporais, houve variação do comprimento do corpo entre 30,5 e 41,0 cm. Os machos adultos apresentaram medidas variando entre 37,0 e 41,0 cm, com média de 39,4 cm (DP = 1,52), enquanto os jovens mediam de 30,5 a 38,0 cm, com média de 33,8 cm (DP = 3,82). Ambas as fêmeas adultas mediam 35,0 cm (DP = 0,00), enquanto as jovens apresentaram 31,5 e 33,0 cm de comprimento corporal, com média de 32,3 cm (DP = 1,06). Quanto ao comprimento da cauda, os machos adultos apresentaram variação de 38,0 a 43,0 cm, com média de 40,3 cm (DP = 2,05), enquanto para os jovens essa variação foi de 39,0 a 43,0 cm, também com média de 40,3 cm (DP = 2,31). As fêmeas adultas apresentaram 38,0 e 43,5 cm de cauda, com média de 40,8 cm (DP = 3,89), enquanto as jovens possuíam 38,5 e 39,5, com média de 39,0 cm (DP = 0,71 - Tabela 3).

**Tabela 3:** Sexo, idade e morfometria dos indivíduos de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ.

| Sexo | Idade  | MC (Kg) | $\bar{X}$ | DP   | Cc (cm) | $\bar{X}$ | DP   | Ccd (cm) | $\bar{X}$ | DP   |
|------|--------|---------|-----------|------|---------|-----------|------|----------|-----------|------|
| M    | Adulto | 2,15    |           |      | 37,0    |           |      | 38,5     |           |      |
| M    | Adulto | 2,36    |           |      | 40,0    |           |      | 41,0     |           |      |
| M    | Adulto | 3,26    | 3,09      | 0,80 | 39,0    | 39,4      | 1,52 | 38,0     | 40,3      | 2,05 |
| M    | Adulto | 3,73    |           |      | 40,0    |           |      | 43,0     |           |      |
| M    | Adulto | 3,94    |           |      | 41,0    |           |      | 41,0     |           |      |
| M    | Jovem  | 1,26    |           |      | 30,5    |           |      | 39,0     |           |      |
| M    | Jovem  | 2,03    | 1,80      | 0,47 | 33,0    | 33,8      | 3,82 | 39,0     | 40,3      | 2,31 |
| M    | Jovem  | 2,10    |           |      | 38,0    |           |      | 43,0     |           |      |
| F    | Adulta | 1,63    |           |      | 35,0    |           |      | 38,0     |           |      |
| F    | Adulta | 2,68    | 2,16      | 0,74 | 35,0    | 35,0      | 0,0  | 43,5     | 40,8      | 3,89 |
| F    | Jovem  | 1,56    |           |      | 33,0    |           |      | 39,5     |           |      |
| F    | Jovem  | 1,75    | 1,66      | 0,13 | 31,5    | 32,3      | 1,06 | 38,5     | 39,0      | 0,71 |

M: macho; F: fêmea; MC: massa corporal; Cc: comprimento do corpo; Ccd: comprimento da cauda.  $\bar{X}$  = média; DP = desvio padrão.

Através do Teste *T* de diferenças entre médias, foram comparados os valores de massa corporal média, além de médias de comprimento do corpo e da cauda, entre machos adultos e fêmeas adultas. Em relação à massa corporal e ao comprimento da cauda, não houve diferença estatisticamente significativa ( $P \leq 0,05$ ), diferente do encontrado para tamanho do corpo, que apresentou diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ), sendo os machos, em média, maiores que as fêmeas.

Comparando os valores referentes a massa corporal observadas para machos (3,09 Kg, DP = 0,80 e n = 5) e fêmeas (2,16 Kg, DP = 0,74 e n = 2) da população da Ilha da Marambaia com aqueles publicadas para machos (3,17 Kg, DP = 0,40 e n = 22) e fêmeas (2,05 Kg, DP = 0,36 e n = 22 - Valença-Montenegro *et al.*, 2009a) de *S. libidinosus*, assim como para machos (2,76 Kg, DP = 0,37 e n = 9) e fêmeas (2,12 Kg, DP = 0,32 e n = 10 - Montenegro, 2011) de *S. flavius*, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $P \leq 0,05$ ).

Os indivíduos adultos apresentaram dois padrões de pelagem. Para cinco deles (três machos e duas fêmeas) o dorso era marrom uniforme (sem faixa dorsal), cobrindo também a parte superior dos braços. O antebraço, além dos membros pélvicos e cauda eram enegrecidos (Figura 8a). O ventre possuía pelagem amarelada (Figura 8b). O capuz preto cobria toda a parte superior e posterior da cabeça, atravessando as laterais como uma costeleta e se ligava abaixo da mandíbula. A face era contornada por pelos que variavam de branco a amarelo-claro, cobrindo parte da testa, têmporas e bochechas (Figura 8c). Dois machos apresentaram tufo, sendo que em um deles os pelos eram pequenos e voltados para os lados e no outro, um pouco mais proeminentes e eretos (Figura 9a). Ambas as fêmeas apresentaram tufo bastante proeminentes e eretos (Figura 9b).

Os cinco indivíduos jovens (três machos e duas fêmeas) apresentaram o mesmo padrão de pelagem que o grupo anterior, com exceção da pelagem do ventre mais clara (amarelo claro) e a presença de faixa dorsal estendendo-se do capuz até a base da cauda (Figura 10). Nenhum dos indivíduos jovens apresentou tufo de pelos na cabeça.

Os dois indivíduos restantes, que eram machos adultos, apresentaram outro padrão de pelagem corporal, com dorso, membros e cauda enegrecidos, embora não fossem tão escuros quanto o capuz (Figura 11a). O ventre era mais escuro que o observado para o grupo anterior, com coloração marrom (Figura 11b). O padrão de coloração do capuz e dos pelos da face eram os mesmos observados nos grupos anteriores. Ambos os indivíduos possuíam pequenos tufo de pelos na cabeça, voltados para os lados, do mesmo modo como ilustrado para um indivíduo do primeiro grupo (Figura 9a - esquerda).



**Figura 8:** Padrão de pelagem apresentado por cinco indivíduos de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. (A) Dorso marrom-escuro sem faixa dorsal, com antebraço, pernas e cauda enegrecidos; (B) pelagem do ventre amarela; (C) face contornada por pelos brancos em parte da testa, têmporas e bochechas (esquerda) e costeleta escura partindo do capuz e ligando-se abaixo da mandíbula (direita).



**Figura 9:** Tamanhos e formas dos tufos de pelos na cabeça apresentados por machos e fêmeas adultos de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. (A) machos com tufos pequenos voltados para os lados (à esquerda) e tufos de tamanho mediano e eretos (à direita); (B) fêmeas com tufos bastante proeminentes e eretos.



**Figura 10:** Características de coloração de pelagem observadas em indivíduos jovens de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. (A) faixa dorsal estendendo-se do capuz até a base da cauda; (B) pelagem do ventre mais clara do que a observada nos indivíduos adultos.



**Figura 11:** Padrão de pelagem apresentado por dois machos adultos de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. (A) Dorso, membros e cauda enegrecidos, com capuz ainda mais escuro; (B) pelagem marrom no ventre, com membros e cauda escuros.

Para visualização do padrão de pelagem dos 12 indivíduos de macaco-prego da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, Rio de Janeiro, ver anexo IV.

### 3.2 Entrevistas com os Moradores

Foram entrevistados treze moradores, sete homens e seis mulheres, com idades variando de 60 a 77 anos, sendo que a maioria (dez) tinha entre 70 e 77 anos, todos nascidos na Ilha da Marambaia. Doze desses moradores relataram que suas famílias já moram na região há várias gerações, com descendência dos escravos que habitavam a ilha, enquanto para apenas um entrevistado, os pais haviam se mudaram pouco antes de seu nascimento.

Todos os entrevistados afirmaram já terem visto macacos na Ilha da Marambaia, tendo sido relatado por um morador que "*É o que a gente vê mais... é o que mais tem*". Onze deles indicaram corretamente a foto correspondente ao macaco-prego-preto (*Sapajus nigritus*), enquanto dois indicaram a foto representando um bugio (*Alouatta* sp.), sendo justificado por um entrevistado por este ser mais "*marronzinho*".

Quando questionados desde quando veem, na ilha, o tipo de macaco indicado na figura, dez relataram se lembrarem dos avistamentos desde criança, dois não se lembram de terem visto enquanto criança, mas que sabiam da existência dos primatas na mata (Quadro 1) e um só lembra de ver os macacos quando adulto.

**Quadro 1:** Frases de moradores ilustrando as respostas dadas quando questionados desde quando veem macacos na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ.

#### **Lembram ver macacos desde criança**

*"Muito tempo, desde criança. Sempre teve".*

*"Desde que eu nasci"*

#### **Não lembra ver, mas sabiam da existência**

*"Sabia que tinha, existia. Mas lá na floresta. Aqui, descer assim, eles não desciam não".*

*"Quando era criança não via, porque eles não vinham aqui embaixo. Eles já existiam, só que mais distantes".*

Alguns moradores relataram ainda, espontaneamente, um aumento dos avistamentos e número dos primatas na Ilha da Marambaia entre as décadas de 70 e 90 até o presente (Quadro 2).

Quando questionados se os mais antigos (sejam parentes ou conhecidos) já relatavam sobre os primatas na ilha, os moradores foram unânimes em afirmar que seus pais, tios, avós, bisavós ou até mesmo vizinhos e conhecidos, falavam sobre a presença dos primatas na ilha e lhes contavam histórias sobre eles (Quadro 3).

**Quadro 2:** Relato de moradores acerca do aumento dos avistamentos e número de indivíduos de macacos na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ.

**A partir da década de 70**

*"A maior força de macaco vem de 76 pra cá. Sempre teve macaco na Ilha, mas igual essa macacada miúda... de 76 pra cá".*

**A partir do final da década de 90, início dos anos 2000**

*"Uns 15 anos pra cá eles estão descendo muito".*

**Sem definição de época**

*"Antes aparecia só 1. Não aparecia tanto quanto agora. Agora tá aparecendo bastante".*

**Quadro 3:** Frases de moradores ilustrando as respostas dadas quando questionados se os moradores mais velhos já falavam sobre os primatas na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ.

*"Aquela época falam sim. (...) Eles falavam que tinham macaco grandão, pra meter medo na gente".*

*"Desde que o povo começou a habitar aqui já existia alguma coisa [macacos]".*

*"Tenho histórias de muito e muito e muitos longos tempos. Isso [os macacos] já vem de berço (...), foi nativo da Marambaia".*

Alguns moradores ainda relataram, espontaneamente, o hábito de caça dos moradores na ilha, comum em tempos mais antigos, segundo eles, mas que podem ocorrer ainda, embora essa prática pareça ser vista como algo errado (Quadro 4).

Ao serem questionados sobre o local de avistamento dos primatas, a maioria dos moradores relatou a ocorrência próximo às suas casas, embora alguns mencionem outros locais, como caminhos utilizados para deslocamento na ilha. Foram citados, no total, nove locais de avistamentos dos primatas (Figura 12).

Em relação à frequência anual dos avistamentos nas proximidades de suas casas, seis moradores relataram que os primatas costumam aparecer no período que chamam de "época de frutas", compreendido nos meses de outubro a março. Quatro moradores disseram que a frequência, apesar de oscilar, se dá em todo o ano, enquanto os outros três moradores não souberam precisar, mas afirmam que existe um período de maior frequência.

Quanto ao período do dia, seis moradores relatam a ocorrência dos animais a qualquer hora do dia, até aproximadamente 18h. Outros seis recebem a visita dos primatas somente na parte da manhã e apenas uma pessoa afirmou que os primatas só aparecem em sua casa no período da tarde.

**Quadro 4:** Relato de moradores acerca do hábito de caça de macacos na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ, comum em outros tempos, mas visto como algo negativo atualmente.

*"Os caçadores todos comiam macaco"*

*"Na época passada, o pessoal só vivia da caça do mato. Todo mundo comia macaco... Tudo quanto era bicho".*

*"Antigamente, as pessoas matavam [os macacos] na plantação para comer".*

*"Era meu avô, e pessoal que morava aqui. Eles falavam que só comiam macaco".*

*"O pessoal antigo até comiam. Viviam de caça... era mais peixe e caça. Não tinha esse negocio de IBAMA. Pra comer podia".*

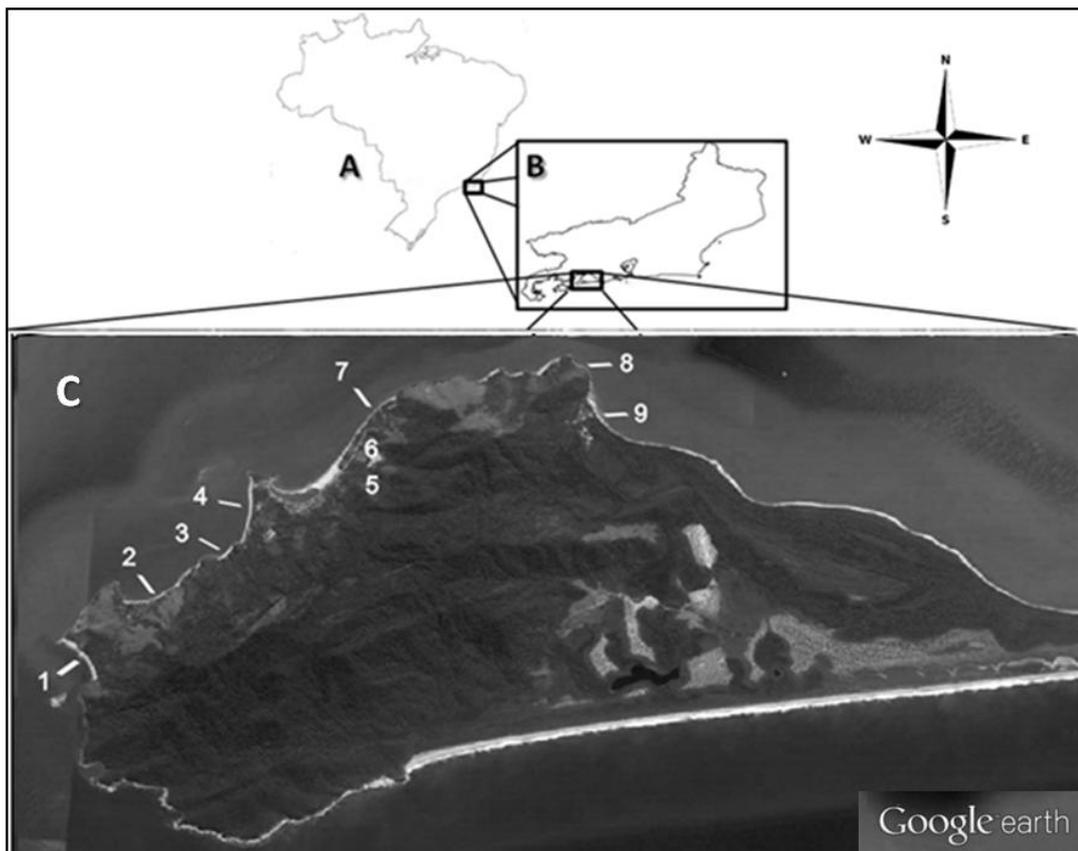
*"Meu avô comia macaco pra caramba. Vivia mais de caça. Hoje não pode caçar aqui".*

*"Tinha muito costume de caçar, e ainda tem (...) antes era mais, agora o pessoal tá mais civilizado".*

*"Pra falar a verdade, já comi até macaco".*

O tamanho dos grupos descritos pelos moradores nos avistamentos próximos às suas casas variou de indivíduos isolados ou em dupla a grandes grupos, compostos por até trinta indivíduos. Quatro moradores relataram avistarem sempre grupos pequenos, entre um e seis indivíduos, enquanto os demais afirmam que há uma variação entre grupo pequenos até grupos grandes, que atingem geralmente dez e quinze indivíduos, mas que já contaram entre vinte e trinta animais.

Questionados sobre a possibilidade de soltura dos primatas na ilha como sua origem, os moradores dizem desconhecer qualquer soltura realizada na região. Cinco deles ainda afirmaram que os primatas da Ilha da Marambaia estão presentes há muito tempo e são originários da ilha (Quadro 5). Segundo os moradores, esta foi, inclusive, a primeira vez que um grupo de pesquisa chegou à ilha para realizar um estudo com os primatas da região.



**Figura 12:** Locais de avistamento dos macacos-prego (Platyrrhini: Cebidae) pelos moradores da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. (A) Mapa do Brasil; (B) destaque para o estado do Rio de Janeiro; (C) em detalhe, a Ilha da Marambaia com os locais de avistamento: 1. Praia do Sino; 2. Pescaria Velha; 3. Praia do Kutuca; 4. Praia Grande; 5. Buraco Quente; 6. Praça Sebastopol; 7. Praia Suja; 8. Praia do Sítio; 9. Praia da Armação.

**Quadro 5:** Frases de moradores ilustrando as respostas dadas quando questionados sobre a possibilidade de soltura como origem dos primatas presentes na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ.

*"Não. Eles são nativos da Ilha. Já vem de gerações e mais gerações, e daí por diante".*

*"Não. São nativos daqui. O povo de antigamente dizia que eles iam na roça e comiam milho. Eles são antigos mesmo. Só não desciam pra cá porque não tinha essas plantas que tem hoje aqui em baixo. Mas já é nativo daqui".*

*"Esses macacos são daqui mesmo. São criados daqui mesmo".*

Ao final da entrevista, quando foram estimulados a expressarem suas opiniões sobre os primatas da região, seis moradores disseram que os macacos não atrapalham ou não tem relevância em suas vidas. Os outros sete moradores relataram, entretanto, a impossibilidade de cultivo de vegetais nos quintais das suas casas, embora essa fala, na maioria das vezes, tenha sido colocada de forma atenuada (Quadro 6).

**Quadro 6:** Frases de moradores ilustrando suas opiniões acerca dos primatas presentes na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ.

**Dizem não atrapalhar ou incomodar**

*"Os macacos não prejudicam em nada não. É divertimento... o pessoal gosta muito de ficar vendo. O pessoal fica só olhando eles. Não atrapalham em nada não".*

*"Não atrapalham em nada. Só vêm tirar coco. Não pode é o pessoal tentar caçar, matar..."*

**Relatam que os primatas atacam as plantações**

*"A gente acha eles engraçados. Eles vão para a roça do pessoal aí, chupa cana, arranca fruta, pinta e borda".*

*"Só me atrapalha que eu quero plantar cana e não consigo. Coloquei duas touceiras lá em cima. Quando foi semana passada fui lá ver, comeram tudo".*

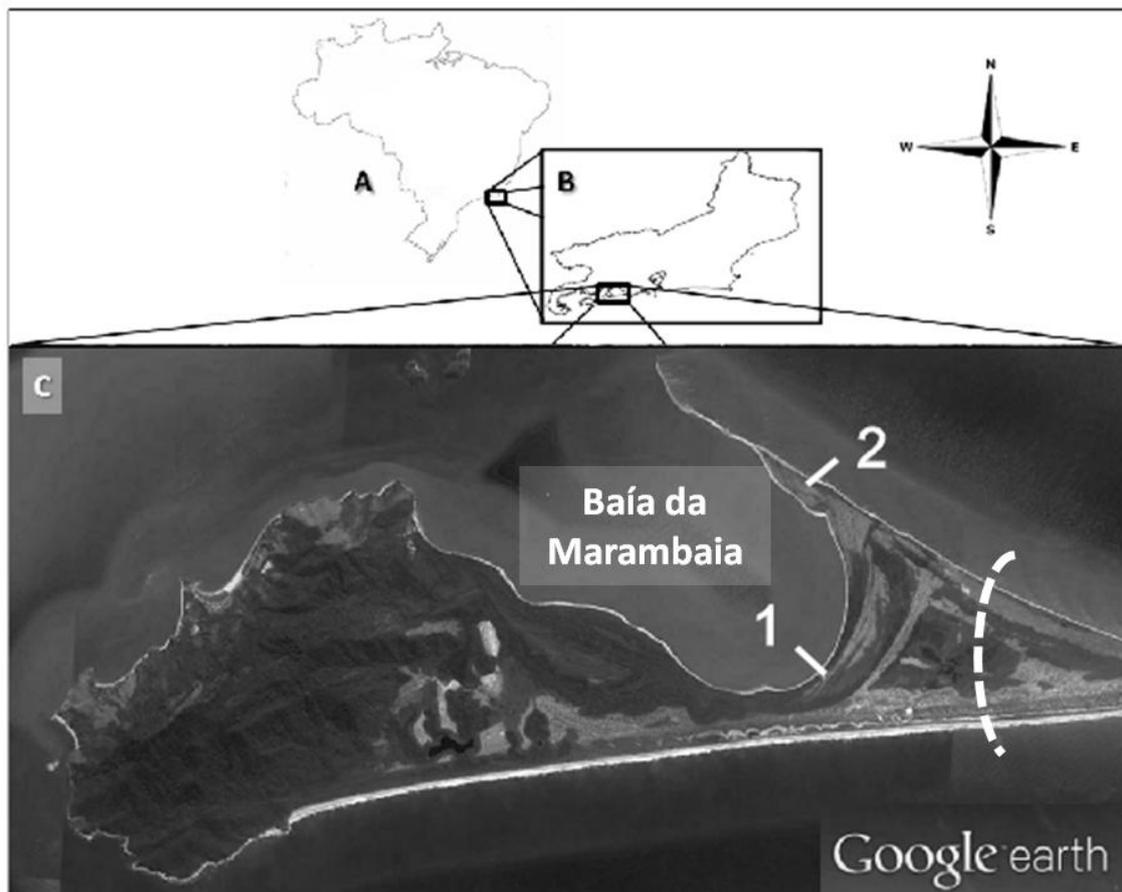
*"É tanto macaco que não pode mais plantar fora de casa. Se você plantar um bocado de milho aqui ele vem e corta tudo".*

*"A produção [de macacos] foi tanta, tanta, tanta, que eles estão atacando tudo".*

### 3.3 Entrevistas com Militares e Relatos de Avistamentos na Restinga da Marambaia

Foram entrevistados quatro militares, com tempos de serviço na base militar do exército (CAEx) variando de 5 a 12 anos. Todos relataram trabalharem em treinamentos com incursões por toda a extensão da restinga, inclusive na região próxima à ilha, mas afirmaram nunca terem visto qualquer espécie de primatas na região. Através da observação das fotos (Anexo II) os militares demonstraram reconhecer os exemplares de macaco-prego (*Sapajus nigritus*) do Rio de Janeiro e sagui (*Callithrix* sp.), já tendo visto indivíduos em outros bairros da cidade. Afirmaram, ainda, que sabem da existência dos macacos-prego na ilha, reforçando que nunca os viram na Restinga da Marambaia. Fizeram, inclusive, suposições sobre a ausência dos macacos-prego na região, associando à vegetação rasteira, composta principalmente pelo que chamaram de buriri (possivelmente a espécie *Allagoptera arenaria*, da família Arecaceae, também denominada caxandó, purunã ou buri-de-praia), que se estende por aproximadamente 20 km. Ainda segundo os militares, a vegetação mais frondosa é encontrada apenas próximo ao quartel, resultado de plantações realizadas pelo próprio exército a partir da década de 1940.

Foram obtidos, ainda, relatos de militares da aeronáutica na base aérea da Restinga da Marambaia, próximo à ilha, na região que circunda a Baía da Marambaia (Figura 13). Segundo eles, é constante a presença dos macaco-prego próximo ao prédio. Também foi avistado, em 2015, um indivíduo forrageando em uma árvore na Ponta da Pombeba, (Nogueira, DM, comunicação pessoal - Figura 13).



**Figura 13:** Locais correspondentes aos relatos de avistamento dos macacos-prego na Restinga da Marambaia, na região circundante à Baía da Marambaia, próximo à Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. (A) Mapa do Brasil; (B) destaque para o estado do Rio de Janeiro; (C) em detalhe, a localização da base aérea, onde os primatas são avistados (1) e o ponto aproximado de avistamento de um indivíduo na Ponta da Pombeba (2). A linha tracejada representa a região até onde os militares da base do exército, próxima ao continente, afirmam não haverem primatas.

#### 4 DISCUSSÃO

A obtenção de dados básicos para espécies de macacos-prego e caiararas em locais com pouco ou nenhum estudo anterior é de grande importância, como passo inicial, para somar conhecimento e favorecer a conservação das espécies (Lynch Alfaro *et al.*, 2014). A urgência de estudos é enfatizada ao notarmos que valores fundamentais de biometria, como massa corporal e tamanho individual, ainda são escassos na literatura para *Sapajus*, uma vez que a maioria das informações vêm de publicações que utilizavam a classificação de *Cebus apella*, com todas as espécies hoje consideradas para *Sapajus* inclusas (Fragaszy *et al.*, 2015).

Desse modo, embora tenham sido amostrados poucos indivíduos adultos (5 machos e 2 fêmeas), os valores de biometria obtidos neste estudo podem complementar a literatura para *Sapajus nigritus* com dados de indivíduos capturados no estado Rio de Janeiro e somar informações para comparações com as demais espécies do gênero.

Quanto à massa corporal, os machos adultos deste estudo parecem estar, em média, abaixo do descrito para *Sapajus nigritus*. Enquanto a massa corporal média dos machos adultos de macacos-prego da Ilha da Marambaia foi de 3,09 Kg ( $\pm 0,80$ ), os valores médios da literatura variam de 3,19 a 3,33 Kg (Aguiar, 2006; Silveira *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2015). Do mesmo modo, a massa corporal média das fêmeas adultas foi de 2,16 Kg ( $\pm 0,74$ ), abaixo do descrito na literatura, onde os valores são de 2,29 e 2,30 Kg (Aguiar, 2006; Silveira *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2015). Entretanto, se considerarmos individualmente, três machos e uma fêmea estão dentro ou acima da média descrita na literatura (Tabela 3). A falta de dados mais substanciais na literatura, que não incluam apenas valores de média, mas também número amostral e desvio padrão, dificulta a comparação mais precisa, uma vez que não é possível saber se há diferença estatisticamente significativa entre as populações.

A média de massa corporal obtida para os indivíduos machos da população da Ilha da Marambaia também parece estar abaixo do publicado por Fragaszy *et al.* (2015) para *S. libidinosus*, que apresenta variação entre 3,4 e 3,6 Kg (com média de 3,5 Kg /  $n = 4$ ) em indivíduos subordinados (ou seja, aqueles que não são machos alfa) e entre 3,8 e 4,4 Kg ( $n = 3$ ) para machos alfa. Este trabalho citado é o único a fazer distinção hierárquica dentre os machos, o que não foi realizado no presente estudo. A diferença encontrada para os machos amostrados na população da ilha, com dois deles apresentando 2,15 e 2,36 Kg e três variando de 3,26 a 3,94 Kg (Tabela 3), pode estar associada a essa organização social e sua distinção diminuiria a variação em torno da média. Em relação às fêmeas adultas, entretanto, o valor médio de massa apresentado (2,16 Kg  $\pm 0,74$ ) parece ligeiramente superior ao descrito para fêmeas adultas de *S. libidinosus*, que variam de 1,8 a 2,6 Kg (com média de 2,1 Kg /  $n = 7$ ) para o trabalho publicado por Fragaszy *et al.* (2015). Entretanto, quando comparadas as médias de massa corporal para ambos os sexos com os dados publicados por Valença-Montenegro *et al.* (2009a), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação a essa espécie.

Em comparação com *S. flavius*, os machos adultos da Ilha da Marambaia apresentam massa corporal aparentemente superior ao publicado na literatura, 2,76 Kg (Montenegro, 2011) e 2,69 Kg (DP = 0,71 - Valença-Montenegro *et al.*, 2009b). Contudo, não foi detectada diferença estatisticamente significativa, pelo Teste *T*, ao comparar com os dados de Montenegro (2011). O mesmo foi observado para as fêmeas dessa espécie, que apesar da aparente superioridade em termos de massa corporal, com médias de 2,12 Kg (Montenegro, 2011) e 2,03 Kg (DP = 0,21 - Valença-Montenegro *et al.*, 2009b), não foi detectada diferença estatisticamente significativa em relação aos dados de Montenegro (2011).

Para *S. xanthosternos*, a massa corporal média dos machos adultos é de 2,95 Kg (DP = 0,67 - Valença-Montenegro *et al.*, 2009b), e para *S. cay* é de 2,8 Kg ( $n = 12$  - Aguiar, 2006), que são aparentemente inferiores àquelas obtidas para os indivíduos da Ilha da Marambaia. Valor de massa corporal média aparentemente maior também foi observado para as fêmeas adultas da Ilha da Marambaia, quando comparado a *S. xanthosternos*, que apresentam média de 1,91 Kg (DP = 0,10 - Valença-Montenegro *et al.*, 2009b). Entretanto, em relação a fêmeas adultas de *S. cay*, a massa corporal média é aparentemente inferior, visto o valor descrito por Aguiar (2006), de 2,61 Kg. Nestes casos, não foi possível avaliar se existe diferenças estatisticamente significantes.

Em termos de tamanho do corpo, os valores obtidos para os indivíduos da Ilha da Marambaia se enquadram no descrito por Silveira *et al.* (2008) para *Sapajus nigritus*, mas estão abaixo de outros valores publicados para esta espécie (Mittermeier *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2015). Os machos adultos apresentaram média corporal de 39,4 cm ( $\pm 1,52$  cm), com

tamanho mínimo de 37,0 e máximo de 41,0 cm, estando a maioria deles dentro da variação de 38,0 a 44,0 cm (Silveira *et al.*, 2008). Entretanto, se compararmos a outros valores descritos para machos adultos de *S. nigritus*, com média de 47,2 cm (variando de 43,9 a 51,0 cm - Martins *et al.*, 2015), ou variação de 42,0 a 56,0 cm, sem descrição de média (Mittermeier *et al.*, 2013), veremos que os machos adultos da Ilha da Marambaia são aparentemente menores que os de outras populações. Para fêmeas adultas, o valor médio de comprimento do corpo foi de 35,0 cm (DP = 0,0), estando dentro da variação de 34 a 40 cm (Silveira *et al.*, 2008). Da mesma forma que para os machos, o tamanho do corpo das fêmeas da Ilha da Marambaia é aparentemente menor que o descrito por outros autores para *S. nigritus*, como o valor médio de 42,2 cm (com variação de 39,0 a 45,0 cm - Martins *et al.*, 2015), ou variação de 42,0 a 48,0 cm, sem descrição de média (Mittermeier *et al.*, 2013). Em relação à cauda, foi encontrada para *S. nigritus* apenas a descrição de valor médio 48,2 cm (Silveira *et al.*, 2008), sem distinção entre machos e fêmeas. Ainda assim, a população da Ilha da Marambaia apresenta valores abaixo do descrito, sendo a média de 40,3 cm ( $\pm 2,05$ ) para machos adultos e 40,8 cm ( $\pm 3,89$ ) para fêmeas adultas. O valor máximo encontrado foi para uma fêmea adulta, cuja cauda media 43,5 cm (Tabela 3). Do mesmo modo que foi colocado para a massa corporal, não é possível saber se há diferenças estatisticamente significantes, ou seja, se os indivíduos são realmente menores que o descrito para a espécie, uma vez que valores como desvio padrão e número amostral não são apresentados na literatura. Outro fator que dificulta a comparação dos dados com a literatura é não haver informações se os dados foram obtidos a partir de populações de vida livre ou em cativeiro. Neste último caso, a alimentação e o manejo dos animais pode influenciar em suas medidas corporais.

A média de comprimento corporal obtida para os machos adultos presentes na Ilha da Marambaia, entretanto, parece ser superior ao publicado para machos adultos de *S. libidinosus*, que apresentam comprimento do corpo médio de 37,8 cm (DP = 4,32), embora o comprimento médio da cauda aparente ser menor, descrito o valor de 45,2 cm (DP = 2,97) para esta espécie. Em relação às fêmeas adultas, o tamanho corporal médio publicado para *S. libidinosus* (35 cm / DP = 3,52) foi o mesmo que o encontrado para a população da Ilha da Marambaia, embora nesta não tenha havido variação (DP = 0,0) devido ao baixo número amostral. As fêmeas adultas da ilha apresentam, entretanto, valor médio da cauda aparentemente menor que o descrito para fêmeas adultas de *S. libidinosus* (41,4 cm / DP 2,46 - Valença-Montenegro *et al.*, 2009b).

A diferença estatística entre o comprimento do corpo de machos adultos e fêmeas adultas de macacos-prego amostrados na Ilha da Marambaia pode indicar dimorfismo sexual. Entretanto, o mesmo não foi observado para a massa corporal e para o tamanho da cauda. Desse modo, não se pode descartar a possibilidade de que a diferença estatística encontrada para o comprimento do corpo esteja sob influência do baixo número amostral, principalmente das fêmeas adultas, que não apresentaram variação entre si (DP = 0,00).

Em relação à pelagem, os indivíduos amostrados na Ilha da Marambaia apresentaram padrão semelhante ao descrito para *Sapajus nigritus* (Fragaszy *et al.*, 2004). A exceção foi a coloração do ventre, que não apresentou-se avermelhada, mas sim amarela ou marrom para os adultos e amarelo-claro para os jovens (Figuras 8, 10 e 11). No anexo V são mostradas ilustrações das espécies de *Sapajus*, para comparação. A variação das tonalidades da pelagem de forma intrapopulacional encontrada por Vieira & Oliveira (2014) em uma população de *S. nigritus* no estado de São Paulo também foi observada para a população da Ilha da Marambaia, embora com algumas diferenças nos padrões de pelagem. Os cinco primeiros indivíduos apresentados, com coloração mais clara (Figura 8), assemelharam-se aos

espécimes descritos por Vieira & Oliveira (2014) com fenótipo "marrom", embora não tenha sido observada a coloração "marrom avermelhada" no dorso, mas sim marrom. Do mesmo modo, a descrição "marrom avermelhado forte" para o ventre não foi condizente, tendo sido observada pelagem amarela. A parte superior dos braços, descrita como "marrom enegrecida" também parece diferir do encontrado para os indivíduos na Ilha da Marambaia, que apresentavam o mesmo padrão marrom do dorso. A coloração mais escura presente no antebraço, pernas e cauda, assim como a pelagem branca ou amarela na face parecem coincidir. Em relação ao fenótipo mais escuro, descrito pelos autores como "preto brilhante" e o observado para dois indivíduos deste trabalho (Figura 11) com fenótipo enegrecido, parece haver maior semelhança. As exceções são a pelagem descrita como "preta brilhante com pelos brancos" no ventre, que para os dois indivíduos da Ilha da Marambaia era marrom, e a presença de pelos brancos na parte interna dos braços e das coxas. A coloração escura do capuz, do dorso, dos membros e da cauda é semelhante.

As formas dos tufos observadas para a maioria dos indivíduos adultos da Ilha da Marambaia estão dentro da variação descrita na literatura para *S. nigritus* (Fragaszy *et al.*, 2004), embora não tenham sido observados tufos voltados para frente. Miranda (2008) realizou um estudo do tamanho dos tufos em algumas espécies de *Sapajus* presentes em museus e encontrou para indivíduos machos de *S. nigritus*, uma variação desde tufos pequenos até bem desenvolvidos, e para fêmeas da mesma espécie apenas tufos pequenos e medianos. Esse padrão difere do observado para os indivíduos da Ilha da Marambaia nos quais, apesar de ser uma pequena amostra, as fêmeas adultas aparentam possuírem tufos mais proeminentes que os machos adultos. Esse autor encontrou, ainda, a presença de tufos pequenos dentre os indivíduos jovens de *S. nigritus*, o que não foi observado nos indivíduos capturados na Ilha da Marambaia. Miranda (2008) relata não ter verificado dimorfismo sexual quanto aos tufos em *S. cay*, *S. robustus* e *S. nigritus*, mas apenas uma tendência das fêmeas apresentarem tufos mais desenvolvidos que os machos, estando o desenvolvimento dos tufos diretamente relacionado à idade dos indivíduos. Isso pode ser confirmado para os indivíduos da Ilha da Marambaia, uma vez que apenas indivíduos adultos (com a exceção de um macho) apresentaram tufos.

Trabalhos envolvendo a comunidade local onde espécies de *Cebus* e *Sapajus* estão presentes são altamente recomendados para o auxílio na conservação (Lynch Alfaro *et al.*, 2014). Em relação aos moradores entrevistados, o fato de viverem há pelo menos 60 anos na ilha e serem descendentes de outros que viveram no local há gerações, faz com que suas experiências e conhecimentos sejam de fundamental importância para o estudo dos macacos-prego da Ilha da Marambaia.

Embora dois desses moradores tenham indicado a foto representando um bugio (*Alouatta* sp.), não foi observada a presença de outra espécie de primata na região. Esses moradores possivelmente enganaram-se no reconhecimento, baseando-se na cor de pelagem dos espécimes.

O fato da maioria dos moradores se lembrar de ver os macacos-prego na Ilha da Marambaia desde criança indica que esses primatas estão no local há, pelo menos, seis décadas. Quando consideramos os relatos acerca dos primatas que foram passados a eles por seus parentes de gerações anteriores, como pais, avós e bisavós, podemos estimar que os primatas habitam a ilha há muito mais tempo. Se levarmos em consideração um morador com 70 anos e supondo que seus bisavós, avós e pais tenham gerado seus filhos com aproximadamente 25 anos, podemos considerar que os bisavós desses moradores entrevistados, que já falavam dos macacos-prego na ilha, nasceram entre 1860 e 1880, ou

seja, há pelo menos 130 anos . Reforçando este fato, os moradores dizem desconhecer ou até mesmo afirmam que não houve soltura dos primatas na região, e que estes são naturais da ilha. Entretanto, não podemos descartar uma introdução mais antiga, que os relatos dos bisavós não deem conta, como a possibilidade dos primatas terem sido trazidos no início da colonização da Ilha da Marambaia, a partir de outra área de ocorrência de *S. nigritus*, visto as características fenotípicas observadas.

O aumento dos avistamento de macacos-prego na Ilha da Marambaia, relatado por alguns moradores, pode ter dois fundamentos. O primeiro seria o aumento da densidade desses primatas na ilha, propiciado pela diminuição do hábito de caça, relatada pelos moradores, associada à possibilidade de não haverem predadores para esses primatas na região. Somando-se a isto, a maior disponibilidade de alimentos propiciada pelas plantações pode ter favorecido a proliferação. Um estudo com *S. nigritus* no Paraná revelou que o aumento da população pode estar associado à predação de plantas cultivadas pela comunidade, como soja e milho (Rocha-Mendes *et al.*, 2005). A segunda hipótese seria uma alteração no comportamento dos animais sem necessariamente ter ocorrido aumento da densidade, havendo simplesmente uma aproximação da área de vida dos macacos-prego às casas dos moradores. Essa proximidade pode estar associada à facilidade de predação e abundância encontrada no cultivo familiar de frutas e verduras, como também foi relatado pelos moradores. A maior frequência de observações nas proximidades das residências associada à época de frutificação pode corroborar para essa argumentação.

Em relação ao hábito de caça, os discursos foram sempre no pretérito, mencionando um hábito que talvez não ocorra mais. Parece haver, pelo menos em relação aos macacos-prego, uma conscientização da ilegalidade dessa atividade, evidenciada na fala de um dos moradores, com o relato de que antes "*não tinha esse negócio de IBAMA. Pra comer podia*", e agora não é permitido.

A fala de um dos moradores, com 77 anos e décadas de conhecimento acumulado em trabalhos pela mata na Ilha da Marambaia, sintetiza bem os temas abordados quanto ao aumento dos avistamentos dos primatas e o hábito de caça que existia na população: "*Do jeito que tá indo a produção [de macacos]... se não houver batedor... tá crescendo muito. Não tinha tanto assim. De 76 pra cá começou essa macacada porque o povo parou de abater. Parou de comer, eles começaram a aumentar. Era todo dia, toda hora. Não era um só nem dois que comiam não. Era a Marambaia inteira, esse pessoal que vivia no mato... Era o que tinha para comer. Paca, tatu, gambá, lagarto, capivara... caça. Tanto caça rasteira, quanto caça de árvore. Mas não era pássaro não... macaco! Nós vivíamos disso. Eu também vivi disso*".

Os relatos dos locais de avistamentos dos primatas permitiram identificar que os animais estão distribuídos por toda a face norte da Ilha da Marambaia (Figura 12), voltada para Baía de Sepetiba, onde também estão concentradas as casas dos moradores (da Silva, 2005). Levando em consideração os avistamentos próximo à base da aeronáutica e na Ponta da Pombeba, pode-se estimar que a população além da face norte da ilha também utiliza uma área da restinga adjacente e que se estende circundando a Baía da Marambaia. É possível que não haja restrição espacial, e que os primatas possam estar distribuídos por toda a ilha, havendo a necessidade de maiores investigações.

Em relação ao período do dia para atividade dos primatas próximo às casas, a maior frequência dos avistamentos se deu pela manhã, levando-se em conta os relatos que mencionaram somente esse período (seis moradores) e os que mencionaram qualquer hora do

dia (outros seis moradores), e confrontado com o relato único de avistamento mais frequente a tarde. Isto pode estar relacionado à maior atividade relatada para os macacos-prego nesse período do dia, necessitando de mais alimentos (Araújo *et al.*, 2010).

Os tamanhos dos grupos relatados pela maioria dos moradores, variando de um ou dois até quinze indivíduos é compatível com o descrito para as espécies de macacos-prego (Silveira *et al.*, 2008), já tendo sido registrado, para *S. nigritus* em uma parque estadual de São Paulo, tamanhos de grupos semelhantes, variando de um a quinze indivíduos (Izar & Ferreira, 2007).

Trabalhos que abordem as concepções dos moradores de comunidades locais em relação aos macacos-prego que as cercam são de grande relevância para o auxílio na conservação desses primatas (Lynch Alfaro *et al.*, 2014). Desse modo, foi dado espaço para que os moradores falassem o que achavam sobre os macacos-prego da Ilha da Marambaia, tendo sido levantado o problema dos ataques às plantações. Esse fato é crescente, de uma forma geral para os macacos-prego, como resultado de mudanças na dieta e comportamento dos animais que vivem próximos a humanos (Freitas *et al.*, 2008), sendo considerados, inclusive, como pragas florestais (Rocha, 2000; Ludwig *et al.*, 2005). Esse conflito é expresso nos relatos dos moradores da Ilha da Marambaia, embora ainda não aparente ser algo alarmante. Na fala de um dos moradores ficou evidente a insatisfação e tentativa de mudança dessa situação: "*Eu queria que alguém pesquisasse para diminuir a população, né?*". Conflitos entre humanos e primatas podem culminar, em casos mais extremos, na extinção de populações locais (Freitas *et al.*, 2008), sendo necessárias medidas que visem solucionar ou amenizar o problema causado pelos primatas, mas que contemplem os interesses preservacionistas para a população de macacos-prego (Rocha, 2000).

O tipo de vegetação rasteira relatada para maior parte da Restinga da Marambaia, e associada pelos militares do exército como a causa para a ausência dos macacos-prego na região, pôde ser confirmada. Por toda a extensão mais estreita da Restinga da Marambaia (Figura 4) predominam os tipos de formação vegetal herbácea e arbustiva (Goés *et al.*, 2005). Formações florestais são encontradas nas proximidades da ilha, inclusive nos locais dos relatos de avistamento dos primatas (Figura 13), e também ao redor do quartel do exército, na região da restinga próxima ao continente. As espécies de macacos-prego são caracterizadas pela utilização de todos os estratos arbóreos e, embora possam caminhar no solo de forma facultativa, utilizam preferencialmente estratos arbóreos médios e inferiores em florestas, optando por galhos com mais de três centímetros de diâmetro, em média, nos quais podem utilizar a cauda como apoio (Fleagle & Mittermeier, 1981; Biondi, 2010). Para animais frugívoros, de modo geral, o maior grau de deslocamento ocorre em função da disponibilidade fragmentada de recursos alimentares, quando estes estão distribuídos em manchas no ambiente (Pinto, 2006). Assim sendo, é pouco provável que os macacos-prego presentes na Ilha da Marambaia atravessem, mesmo que de forma esporádica, os 40 km de vegetação rasteira da restinga, tendo como destino final uma grande concentração de casa no município de Guaratiba, Rio de Janeiro. Deste modo, a população de macacos-prego da Ilha da Marambaia estaria, atualmente, isolada.

Resta saber, entretanto, há quanto tempo esses primatas estão restritos à Ilha da Marambaia, caso não sejam oriundos de introdução. Se levarmos em consideração o tempo de formação da ilha, esta população está isolada há aproximadamente 5.200 -7.000 anos.

## 5 CONCLUSÕES

De acordo com as características fenotípicas apresentadas pelos macacos-prego amostrados, não se rejeita  $H_0$ , ou seja, a população presente na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, Rio de Janeiro, apresenta o padrão de pelagem semelhante ao descrito para *Sapajus nigritus*. Com base nessa característica, pode-se sugerir que a população da ilha provavelmente pertença a esta espécie.

A observação de dois padrões de pelagem encontrados no presente estudo, um mais claro (marrom) e outro mais escuro (enegrecido), corrobora com as informações da literatura para *S. nigritus*, caso seja esta a espécie presente na Ilha da Marambaia, sendo uma característica que varia de forma intrapopulacional.

A presença de faixa dorsal somente em indivíduos jovens pode indicar que esta característica esteja associada à idade, sem relação ao sexo ou componentes ecológicos. Pode-se dizer o mesmo para a presença de tufos, observada somente em indivíduos adultos.

Devido à ausência de informações na literatura, não é possível avaliar, quanto à massa corporal, tamanho do corpo e cauda, se há diferenças estatisticamente significantes entre a população da Ilha da Marambaia e os dados publicados por outros autores para *S. nigritus*.

As médias de massa corporal, tamanho do corpo e cauda dos indivíduos amostrados na Ilha da Marambaia foram estatisticamente iguais, através do teste  $T$ , em comparação a *S. libidinosus* e *S. flavius*.

A única medida morfométrica que diferiu significativamente entre os sexos em indivíduos adultos foi o comprimento corporal, maior para os machos, e pode ser indicativo de dimorfismo sexual.

Em relação à origem da população, não se rejeita  $H_0$ , uma vez que, de acordo com os relatos e o resgate histórico dos moradores, associados às características fenotípicas observadas, a população de macacos-prego da Ilha da Marambaia é provavelmente nativa do local.

A população de macacos-prego da Marambaia pode ter ficado isolada após a formação da ilha, entre 5.200 e 7.000 anos atrás. Entretanto, não é possível desconsiderar por completo a possibilidade de introdução dos animais em um período anterior à 1860.

Quanto à distribuição atual dos primatas na Marambaia, não se rejeita  $H_0$ , ou seja, os macacos-prego estão provavelmente isolados na Ilha da Marambaia, uma vez que, através dos relatos dos militares do exército, foi possível identificar que os animais não são encontrados atravessando a Restinga da Marambaia.

Na Ilha da Marambaia, a população de macacos-prego habita a face norte, ocupando também parte da restinga adjacente, na região que se estende ao redor da Baía da Marambaia. Não é possível afirmar, entretanto, sua presença por toda a extensão da Ilha da Marambaia, sendo necessários estudos futuros.

O tamanho dos grupos de macacos-prego da Ilha da Marambaia varia de dois e quinze indivíduos, segundo os relatos dos moradores, o que coincide com os dados da literatura.

Um trabalho de educação ambiental junto à comunidade e voltado para preservação da biodiversidade da Marambaia deve ser realizado, de modo a prevenir possíveis comportamentos de caça a animais silvestres que podem, inclusive, colocar em risco a saúde dos moradores.

## **CAPÍTULO II**

### **ANÁLISE DO GENE MITOCONDRIAL CITOCROMO OXIDASE II E DO CARIÓTIPO DOS MACACOS-PREGO DA ILHA DA MARAMBAIA, MANGARATIBA, RJ**

## RESUMO

Análises genéticas fornecem informações que auxiliam na sistemática de grupos complexos, como é o caso dos macacos-prego e caiararas (*Sapajus* e *Cebus*). O sequenciamento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II (COII) tem sido amplamente empregado em estudos de filogenia com primatas, contribuindo para o entendimento das relações taxonômicas intragenéricas e intraespecíficas. A análise citogenética permite avaliar, através de técnicas de bandamento, polimorfismos cromossômicos decorrentes de processos evolutivos e, muitas vezes, considerados espécie-específicos. Até o momento, não há nenhuma informação científica sobre a população de macacos-prego da Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, RJ, inclusive a espécie a qual pertence. Os objetivos deste capítulo foram comparar as sequências do gene COII obtidas para os macacos-prego da Ilha da Marambaia com as publicadas para espécies de *Sapajus*, visando avaliar as relações taxonômicas, além de descrever o complemento cromossômico e a distribuição da heterocromatina constitutiva (banda C) dos indivíduos. Foi sequenciada uma região de aproximadamente 690 pares de base do gene COII de oito indivíduos utilizando os *primers* descritos por Ruvolo *et al.* (1991) e realizada análise citogenética por coloração convencional e banda C (Sumner, 1972) de doze espécimes de macaco-prego da Ilha da Marambaia. O sequenciamento do gene COII demonstrou maior similaridade genética dessa população com *S. xanthosternos*, seguida por *S. cay*, e sendo mais divergente em relação à espécie com mesma área de ocorrência, *S. nigrinus*. A análise do cariótipo revelou  $2n = 54$ , XX ou XY, sendo o cromossomo sexual Y um submetacêntrico ao invés de acrocêntrico, descrito para a maioria das espécies. Através do bandamento C foram identificadas marcações intercalares nos pares 4, 11, 12 e 17. O par cromossômico 11 apresentou três polimorfismos de banda C: um bloco heterocromático próximo ao centrômero ocupando aproximadamente 45% da cromátide; um bloco proximal, porém ocupando 30% da cromátide, com tamanho do cromossomo reduzido; e um bloco intercalar ocupando 30% da cromátide, também de tamanho reduzido. A divergência apresentada pela população da Ilha da Marambaia em relação às espécies comparadas foi maior que aquelas apresentadas de forma interespecífica em *Sapajus* e outros gêneros. Dessa forma, a maior similaridade genética em relação à *S. xanthosternos* não indica que a população da Ilha da Marambaia pertença a esta espécie. A divergência entre a população da Ilha da Marambaia e as sequências obtidas no GenBank para *S. nigrinus* da Argentina pode indicar distanciamento evolutivo entre as populações. Do mesmo modo, a banda C intercalar para o par 11 diverge do descrito para *S. nigrinus* da Argentina, que apresenta um pequeno par acrocêntrico sem heterocromatina, mas assemelha-se ao descrito para *S. xanthosternos*, o que corrobora a similaridade encontrada com a análise do gene COII. A deleção total da heterocromatina constitutiva do par cromossômico 11, descrito como específico de *S. nigrinus*, pode ser uma característica local para populações da Argentina. A análise de novos genes para esta população, bem como análises genéticas de *S. nigrinus* ao longo de toda sua área de distribuição serão importantes para auxiliar no entendimento da evolução das espécies de *Sapajus*.

Palavras-chave: Primates, banda C, polimorfismo.

## ABSTRACT

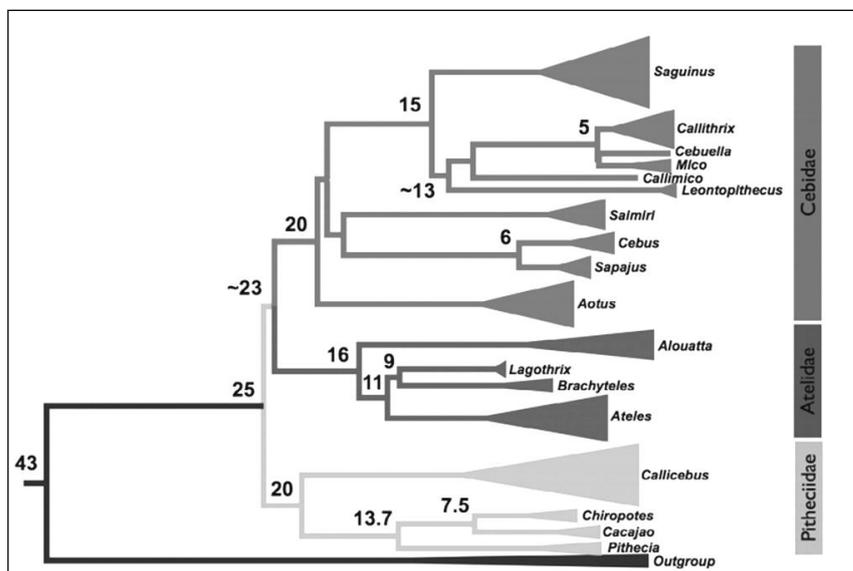
Genetic analyzes provide information that assist in the systematic of complex groups, such as the case of capuchin monkeys (*Sapajus* and *Cebus*). Sequencing the mitochondrial gene Cytochrome Oxidase II (*mtCOII*) has been widely used in phylogenetic studies among primates, favoring a better understanding of intrageneric and intraspecific taxonomic relationships. Cytogenetic analysis, in your turn, allows evaluating, through special banding techniques, chromosomal polymorphisms resulting from evolutionary processes and often considered specific. Until now, there is no scientific information about the population of capuchin monkeys from Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ, including the species to which it belongs. The objectives of this chapter were to compare the sequences of the *mtCOII* gene obtained for the population of capuchin monkeys from Ilha da Marambaia with those published for *Sapajus* species, in order to assess the taxonomic relationships, and describes the karyotype and banding pattern of constitutive heterochromatin (C-band) of individuals. Was sequenced a region of approximately 690 base pairs of the *mtCOII* gene from eight individuals using the primers described by Ruvolo *et al.* (1991) and carried out cytogenetic analysis with conventional staining and C-band (Sumner, 1972) for twelve specimens of capuchin monkeys from Ilha da Marambaia. The analysis of the *mtCOII* gene showed a higher similarity of Marambaia's population with *S. xanthosternos*, and then with *S. cay*, and being more divergent in relation to the species with the same area of occurrence, *S. nigritus*. Karyotype analysis revealed  $2n = 54$ , XX or XY, with the sexual chromosome Y as a submetacentric, in contrast to what is generally described, as acrocentric. Through the C-band, intercalary bands have been identified in pairs 4, 11, 12 e 17. The chromosome pair 11 presented three C-band polymorphisms: one heterochromatic block near the centromere occupying approximately 45% of the chromatid; a proximal block, although occupying 30% of the chromatid with reduced size of the chromosome; and an intercalary block occupying 30% of chromatid, also reduced in size. The divergence found for the population of Ilha da Marambaia in relation of the species compared was higher to those presented in a interspecific way for *Sapajus* and other genera. Thus, the genetic similarity to *S. xanthosternos* does not indicate that the population of Ilha da Marambaia belongs to this species. The divergence between the population of Ilha da Marambaia and sequences obtained from GenBank to *S. nigritus* in Argentina may indicate evolutionary detachment between the populations. In the same way, the intercalary C band for the pair 11 differs from that described for *S. nigritus* from Argentina, which has a small acrocentric without heterochromatin, but is similar to that described for *S. xanthosternos*, which corroborates the similarity found with *mtCOII* gene analysis. The total deletion of the heterochromatic block in the chromosome 11, described as specific of *S. nigritus*, can be a local feature for populations of Argentina. The analysis of new genes for this population, as well as genetic analyzes of *S. nigritus* throughout their distribution area will be important to help understand the evolution of *Sapajus* species.

Keywords: Primates, C-banding, polymorphism.

# 1 INTRODUÇÃO

Análises moleculares para resolução da sistemática de táxons de primatas do novo mundo (infraordem Platyrrhini) têm sido realizadas desde o início da década de 1990 (Schneider *et al.*, 2001), sendo bastante informativas para caracterização das relações taxonômicas e essenciais para a conservação das espécies (Pecon-Slattery, 2014). O sequenciamento de genes nucleares tem possibilitado a identificação de divergências filogenéticas que ocorreram em uma escala maior de tempo, como a relação entre gêneros, enquanto análises de DNA mitocondrial têm fornecido reconstruções mais confiáveis de táxons recentemente derivados, levando-se em consideração a maior taxa de substituição nucleotídica que ocorre no genoma mitocondrial (Seuánez *et al.*, 2005).

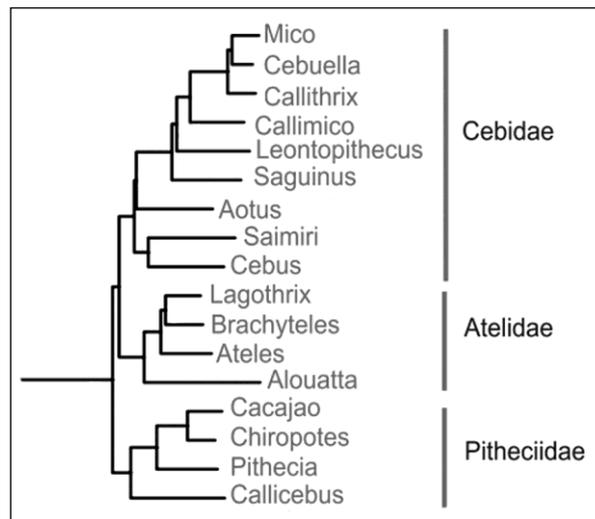
Com base no sequenciamento de 25 genes nucleares autossomais, Schneider & Sampaio (2013) reanalisaram e atualizaram os dados de Perelman *et al.* (2011) para a infraordem Platyrrhini, esclarecendo a divisão dos gêneros entre as famílias Pitheciidae, Atelidae e Cebidae (Figura 14). Segundo essa filogenia, a família Pitheciidae é a mais basal da infraordem e o agrupamento de Atelidae e Cebidae forma um clado bem suportado, estando somente incerta a relação do gênero *Aotus* com os demais cebídeos (Schneider & Sampaio, 2013). Para Perelman *et al.* (2011), o gênero *Aotus* parece estar proximamente relacionado aos callitrichídeos (*Saguinus*, *Callithrix*, *Cebuella*, *Mico*, *Callimico* e *Leontopithecus*), tendo o clado *Cebus-Saimiri* (incluindo o recente gênero *Sapajus*), como grupo-irmão (Figura 15). Esta foi a mesma reconstrução realizada por Pecon-Slattery (2014), atualizando os dados de Perelman *et al.* (2011) de acordo com as recomendações da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) e incluindo o gênero *Sapajus* no mesmo clado que *Cebus*.



**Figura 14:** Filogenia da infraordem Platyrrhini com base em seqüências de 25 genes autossomais. Os números indicam o tempo aproximado de divergência em milhões de anos. Retirado de Schneider & Sampaio (2013).

Embora a posição de *Aotus* dentre os cebídeos ainda não esteja definitivamente estabelecida, a relação que os gêneros *Cebus* e *Sapajus* possuem com *Saimiri* parece estar

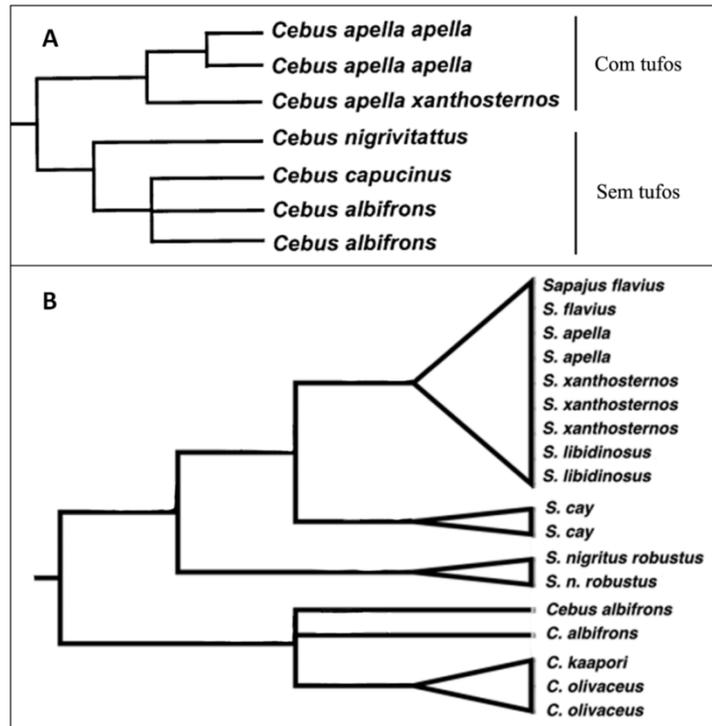
bem definida, com tempo de separação estimado entre 16 e 20 milhões de anos (Opazo *et al.*, 2006; Perelman *et al.*, 2011; Schneider & Sampaio, 2013; Pecon-Slattery, 2014).



**Figura 15:** Filogenia da infraordem Platyrrhini com base em seqüências de 54 genes nucleares, incluindo o gênero *Aotus* na família Cebidae, proximoamente relacionado aos callitrichídeos, com o clado *Cebus-Saimiri* como grupo-irmão. Modificado de Perelman *et al.* (2011).

Com relação ao gênero *Cebus* (antes da proposição de *Sapajus*), Moreira (2002) já havia confirmado a separação das espécies com e sem tufos, através do sequenciamento de fragmentos com 850 pares de base (pb) do gene nuclear *SRY* (*Sex Determining Region of the Y Chromosome*), presente no cromossomo Y e relacionado à diferenciação gonadal em machos (Figura 16a). Essa divisão foi também confirmada por Martins-Jr. *et al.* (2015) através da análise de elementos *Alu* (*Arthrobacter luteus*), um grupo de transposons específicos de primatas usado como marcador molecular para análises cladísticas (Schneider & Sampaio, 2013), demonstrando uma seqüência específica para *Cebus*, uma para *Sapajus* e outra comum a ambos, tendo outros gêneros de Cebidae, além de *Alouatta*, como grupo externo (Figura 16b).

A separação entre os grupos foi ainda confirmada através da análise de genes mitocondriais, os quais apresentam maior taxa de mutação em comparação ao DNA nuclear, o que permite avaliar de forma mais precisa a relação entre táxons de primatas proximoamente relacionados (Brown *et al.*, 1982; Seuánez *et al.*, 2005). Com base no sequenciamento dos genes 12S e citocromo b (Figura 17), foi estimado o tempo de divergência entre *Cebus* e *Sapajus* de aproximadamente 6,2 Ma., além de descritas as histórias biogeográficas para ambos os grupos, considerando-os como gêneros distintos (Lynch Alfaro *et al.*, 2012a - mais detalhes na introdução do Capítulo I).

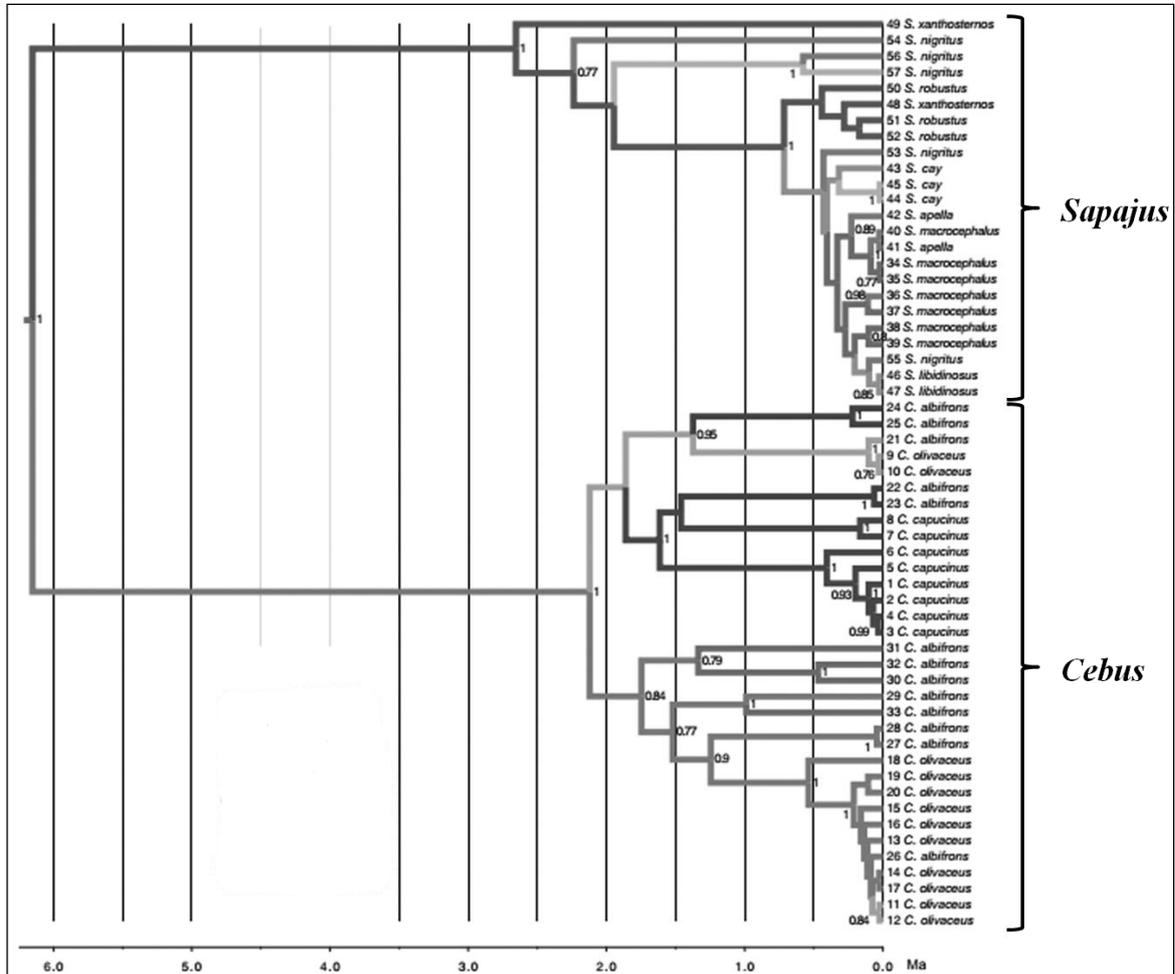


**Figura 16:** Reconstruções filogenéticas realizadas através da análise de genes nucleares confirmando a separação dos macacos-prego (*Sapajus*) e caiararas (*Cebus*) em grupos distintos. (A) divergência entre o grupo com tufo (*Sapajus*) e sem tufo (*Cebus*) demonstrada pelo sequenciamento do gene *SRY*. Modificado de Moreira (2002). (B) Cladograma construído a partir da análise de elementos *Alu*. Modificado de Martins-Jr. *et al.* (2015).

Um dos genes mitocondriais que tem sido mais empregados para estudos de filogenia é o Citocromo Oxidase II (COII), já tendo sido amplamente utilizado para reconstruções filogenéticas em primatas (Ashley & Vaughn, 1995; Collins & Dubach, 2000; Ascunce *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2002; Ascunce *et al.*, 2003; Ruiz-García *et al.*, 2010; Ruiz-García *et al.*, 2012a; Ruiz-García *et al.*, 2012b). Esse gene é transcrito para produção da citocromo oxidase, uma enzima catalítica responsável pela etapa final da cadeia respiratória mitocondrial, possuindo aminoácidos funcionalmente importantes e geralmente conservados (Ashley & Vaughn, 1995; Collins & Dubach, 2000). O sequenciamento desse gene pode prover informações valiosas acerca das relações taxonômicas intragenéricas e intraespecíficas, apresentando aproximadamente 700 pb dentre os platyrrhinos (Ascunce *et al.*, 2002; Ascunce *et al.*, 2003; Ruiz-García *et al.*, 2012a).

Em relação aos macacos-prego e caiararas, o sequenciamento do gene COII demonstrou, por exemplo, uma maior distância genética entre duas subespécies de *Cebus apella* do que a observada entre espécies de *Alouatta* (Ascunce *et al.*, 2003), sabendo-se hoje que elas representam as espécies *Sapajus cay* e *S. nigrinus* (*sensu* Silva Jr., 2001). O estudo de populações de *C. albifrons* em diferentes regiões geográficas demonstrou a existência de três grupos bem definidos no norte da Colômbia e outros cinco na floresta amazônica (Peru, Equador e Brasil) e savana colombiana (Ruiz-García *et al.*, 2010). Em espécimes de *C. capucinus* da Colômbia e Costa Rica foram identificados quatro haplogrupos, sendo três

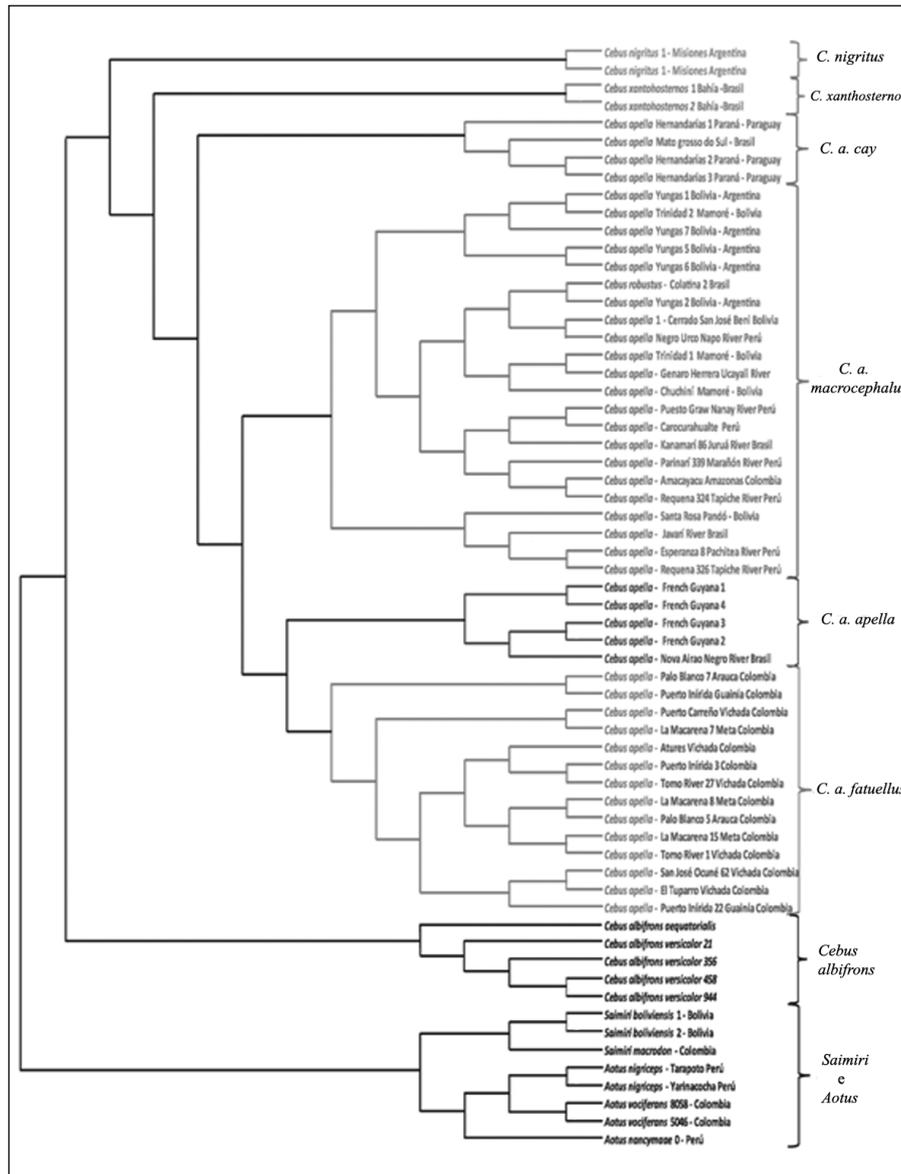
encontrados na Colômbia e o último característico da América Central (Ruiz-García *et al.*, 2012a).



**Figura 17:** Árvore filogenética obtida através do sequenciamento dos genes mitocondriais 12S e citocromo b evidenciando a separação das espécies de *Cebus* e *Sapajus*. Adaptado de Lynch Alfaro *et al.* (2012a).

Na tentativa de auxiliar a sistemática e filogeografia dos macacos-prego, Ruiz-García *et al.* (2012b) sequenciaram o gene COII para indivíduos de diversos países Sul-Americanos (Colômbia, Peru, Bolívia, Guiana Francesa, Brasil, Argentina e Paraguai) pertencentes a *C. apella* (considerando diversas subespécies), *C. libidinosus*, *C. xanthosternos* e *C. nigrinus*. Os autores identificaram que *C. xanthosternos* e *C. nigrinus* formam clados distintos e podem ser seguramente considerados como espécies, ao contrário de *C. libidinosus* e *C. robustus*, rejeitadas como espécies e agrupadas respectivamente em *C. a. cay* e *C. a. macrocephalus*. A espécie *C. nigrinus* foi a que apresentou maior divergência genética, seguida por *C. xanthosternos*, *C. a. cay* e, posteriormente, pelas demais subespécies de *C. apella* (Figura 18). A espécie *C. nigrinus* apresentou ainda a segunda maior diversidade genética, atrás do grupo formado por duas subespécies de *C. apella* da Guiana Francesa e Rio Negro, possuindo dez regiões polimórficas para o gene. As análises com o COII puderam estabelecer que as duas linhagens mais diferenciadas e com o maior tempo de surgimento estimado foram *C. nigrinus*

(357 mil anos atrás) e *C. xanthosternos* (276 mil anos atrás). A divergência entre os haplótipos dessas duas espécies pode estar relacionada a uma intensa deriva genética no processo de especiação, estando associada a períodos de isolamento geográfico por fragmentação da Floresta Atlântica ocorridos entre 360 e 240 mil anos atrás (Ruiz-García *et al.*, 2012b).



**Figura 18:** Árvore filogenética obtida a partir do sequenciamento do gene COII para 49 espécimes de *Cebus apella*, *C. nigrilus* e *C. xanthosternos*. Os ramos terminais com *C. albifrons*, *Saimiri* e *Aotus* representam grupos externos. Adaptado de Ruiz-García *et al.* (2012b).

Em relação à citogenética, macacos-prego e caiararas apresentam o cariótipo mais ancestral e conservado dentre os platyrrhinos (García *et al.*, 2002; Nieves *et al.*, 2012), possuindo diversas regiões homólogas com o cariótipo de outros primatas, inclusive humanos (Clemente *et al.*, 1987; Mudry *et al.*, 1990; García *et al.*, 2002, Amaral *et al.*, 2008).

As espécies de *Sapajus* apresentam  $2n = 54$ , enquanto os representantes de *Cebus* podem apresentar  $2n = 54$  ou  $52$  (Amaral *et al.*, 2008). Para as espécies com número diploide igual a 54, são observados 10 pares de cromossomos autossomos metacêntricos ou submetacêntricos, 16 acrocêntricos e o par sexual XX ou XY (Matayoshi *et al.*, 1986). O cromossomo X é submetacêntrico (Matayoshi *et al.*, 1986; Mudry *et al.*, 1990), enquanto o Y é geralmente descrito como um pequeno acrocêntrico (Matayoshi *et al.*, 1986; Clemente *et al.*, 1987; Mudry de Pargament & Slavutsky, 1987; Mudry *et al.*, 1990; Amaral *et al.*, 2008; Iughetti, 2008) embora já tenha sido citado como submetacêntrico para *S. apella*, quando esta incluía todas as demais espécies do gênero (Freitas & Seuánez, 1982).

Técnicas especiais de coloração, como os bandamentos C e G, permitem a identificação precisa dos pares cromossômicos além da detecção de diferenças cariotípicas entre as espécies, revelando polimorfismos provenientes de processos como deleções, inversões, translocações e duplicações (Steinberg *et al.*, 2014).

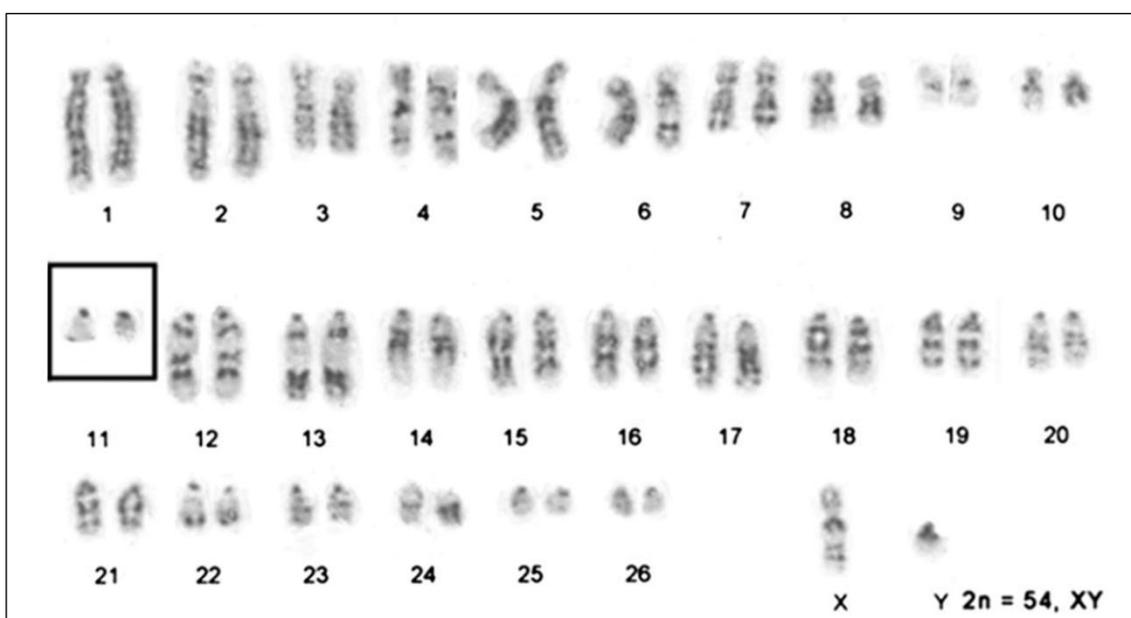
A técnica de bandamento C evidencia a heterocromatina constitutiva de regiões centroméricas e não-centroméricas, nas quais estão presentes regiões de DNA, em geral, transcricionalmente inativas (Grewal & Moazed, 2003). Esta técnica tem sido bastante utilizada para as espécies de *Cebus* e *Sapajus* (Seuánez *et al.*, 1986; Matayoshi *et al.*, 1987; Mudry, 1990; Ponsà *et al.*, 1995; Nieves *et al.*, 2011; Penedo *et al.*, 2014; Steinberg *et al.*, 2014), especialmente por esses gêneros possuírem a maior quantidade de heterocromatina já descrita dentre os platyrrhinos (Nieves *et al.*, 2012). Macacos-prego e caiararas apresentam grande variabilidade na banda C, não somente em relação ao número de pares marcados, mas também pela quantidade de blocos heterocromáticos em um mesmo cromossomo e os seus tamanhos (Nieves *et al.*, 2008). Com o uso da técnica de banda C para espécies de *Cebus* e *Sapajus*, já foram evidenciadas marcações intersticiais ou terminais nos pares cromossômicos 3, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20 e 21 (Seuánez *et al.*, 1986; Matayoshi *et al.*, 1987; Mudry, 1990; Ponsà *et al.*, 1995; Ruiz-Herrera *et al.*, 2004; Nieves *et al.* 2008; 2011). O par 11 é acrocêntrico e o mais característico para o grupo, apresentando na maioria das espécies um grande bloco terminal ocupando de 62 a 86% do braço longo (Matayoshi *et al.*, 1987). Algumas variações na distribuição da heterocromatina deste par são consideradas espécie-específicas. Esse é o caso de *S. nigritus*, descrita como a espécie que apresenta a deleção total do grande bloco, sendo convertido a um pequeno par acrocêntrico (Mudry, 1990; Mudry *et al.*, 1991). Um bloco heterocromático intercalar no par 11 foi descrito para *S. xanthosternos*, sendo a única espécie até o momento a apresentar este padrão (Seuánez *et al.* 1986).

Para a espécie de Mata Atlântica predominante no sudeste brasileiro, *Sapajus nigritus*, a técnica de coloração por bandamento C revela diferentes padrões de marcação não-centromérica, já tendo sido descritas bandas: nos pares 3, 5, 12 e 17 (Mudry, 1990); pares 3, 5, 12, 13 e 19, além de marcações menos consistentes (ou seja, somente em alguns indivíduos) nos pares 17 e 20 (Mudry *et al.*, 1991); nos pares 4, 12, 17 e 19, e outras inconsistentes nos pares 6, 18, 20 e 21 (Ponsà *et al.*, 1995); e pares 4, 12 e 13 (Steinberg *et al.*, 2014). Embora a deleção total do grande bloco de heterocromatina constitutiva do par 11 já tenham sido relatada para *S. robustus* em homozigose (Amaral *et al.*, 2008), essa característica é associada a *S. nigritus*, ainda que somente confirmada para indivíduos da Argentina (Mudry, 1990; Mudry *et al.*, 1991; Ponsà *et al.*, 1995; Nieves *et al.*, 2010; Nieves *et al.*, 2011; Steinberg *et al.*, 2014).

O bandamento G, por sua vez, após digestão com tripsina, cora os cromossomos com variada quantidade de faixas transversais em diferentes tonalidades de coloração, onde as regiões mais coradas apresentam maior conteúdo de adenina e timina, e poucos genes ativos,

enquanto as mais claras possuem mais citosina e guanina, e maior quantidade de genes ativos (Kasahara, 2009). Essa marcação cria um padrão de bandas que permite identificar os pares de homólogos com precisão, bem como evidenciar diferenças entre táxons e rearranjos cromossômicos, como inversões ou deleções, tendo sido usada em diversos trabalhos para os gêneros *Cebus* e *Sapajus* (Freitas & Seuánez, 1982; Matayoshi *et al.*, 1986; Clemente *et al.*, 1987; Mudry de Pargament & Slavutsky, 1987; Ponsà *et al.*, 1995; García *et al.*, 2002; Ruiz-Herrera *et al.*, 2004; Amaral *et al.*, 2008; Steinberg *et al.*, 2014).

A técnica de bandamento G para *S. nigrinus* (Figura 19) reafirmou a deleção do grande bloco heterocromático do par 11, embora somente indivíduos da Argentina tenham sido estudados (Ponsà *et al.*, 1995; Steinberg *et al.*, 2014).



**Figura 19:** Padrão de bandamento G observado para indivíduos de *Sapajus nigrinus* da Argentina. Em destaque na caixa, o par cromossômico 11 apresentando-se como um pequeno acrocêntrico, devido à deleção total do bloco heterocromático em homocigose. Retirado de Steinberg *et al.* (2014).

Técnicas de microdissecção cromossômica e hibridização por fluorescência *in situ* (FISH) permitem a síntese de sondas e a marcação de regiões cromossômicas específicas (Nieves *et al.*, 2011). Nieves *et al.* (2005a) desenvolveram uma sonda para hibridização em regiões de heterocromatina constitutiva das espécies de macacos-prego, denominada #11qHe+. Essa sonda foi criada a partir da região de heterocromatina do par 11 de *S. libidinosus*, mas hibridiza com a região heterocromática de qualquer par cromossômico, já tendo sido testada em várias espécies de *Cebus* e *Sapajus* (Nieves *et al.*, 2005a; Nieves *et al.*, 2011). Utilizando essa técnica, já foram verificadas, para *S. nigrinus*, hibridizações nos pares: 4, 12 e 13 (Nieves *et al.*, 2005a); 4, 12, 13 (com uma banda para um indivíduo e duas para outro) e 19 (Nieves *et al.*, 2008); 4, 12 e 13, além de hibridizações inconsistentes nos pares 6, 17, 19 e 21 (Nieves *et al.*, 2011). Novamente, não foi observada heterocromatina constitutiva no par 11 e os indivíduos estudados eram provenientes da Argentina ou de cativeiro, sem precisão de origem.

Outra sonda utilizada para marcação específica é a desenvolvida para o cromossomo 21 humano (denominada 21HTP - *human total probe*), que hibridiza com a região proximal de eucromatina do cromossomo 11 das espécies de *Cebus* e *Sapajus*, sendo possível identificar esse par cromossômico com precisão (Nieves *et al.*, 2008). Trabalhos utilizando essa técnica de hibridização puderam corroborar aqueles com bandamento convencional, confirmando a presença do cromossomo 11 com a deleção total do bloco heterocromático em espécimes de *S. nigritus* da Argentina (Nieves *et al.*, 2011; Steinberg *et al.*, 2014). Entretanto, o estudo citogenético a partir de amostras de dois indivíduos provenientes do Rio de Janeiro, identificados como *Cebus apella*, mas provavelmente *S. nigritus* de acordo com a sua origem geográfica, revelou um grande bloco heterocromático distal nesse par cromossômico (Freitas & Seuánez, 1982). Esse mesmo padrão foi observado ao serem analisados dois indivíduos identificados fenotipicamente como *S. nigritus*, mas sem origem geográfica conhecida (Penedo *et al.*, 2014). Para outro indivíduo, provavelmente de São Paulo e identificado como *S. nigritus*, embora tendo sido empregada somente a coloração convencional, foi demonstrado claramente que o par cromossômico 11 não sofreu processo de deleção, estando em seu tamanho normal (Iughetti, 2008).

Os objetivos deste capítulo foram: comparar as sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II (COII) dos indivíduos de *Sapajus* sp. da Ilha da Marambaia com as obtidas para a espécie que ocorre na mesma área de distribuição (*Sapajus nigritus*), além de sequências de outras espécies do mesmo gênero, de modo a avaliar as relações taxonômicas entre esta população e as demais espécies congêneres; descrever o complemento cromossômico e o padrão de bandamento C dos indivíduos, além de investigar a ocorrência do polimorfismo descrito para o par 11 de *S. nigritus*.

Para cada objetivo foram levantadas duas hipóteses. Em relação ao gene mitocondrial COII: H<sub>0</sub> - as sequências obtidas demonstram uma maior similaridade genética da população de macacos-prego da Ilha da Marambaia com espécimes de *S. nigritus*, por se tratar da espécie que ocupa a mesma área de ocorrência; H<sub>1</sub> - a similaridade genética é maior entre a população da Ilha da Marambaia e outra espécie de *Sapajus*. Em relação ao cariótipo e bandamento C: H<sub>0</sub> - o cariótipo dos macacos-prego da Ilha da Marambaia tem número diplóide e morfologia dos cromossomos de acordo com o descrito para as espécies de *Sapajus*, além do padrão de bandamento C concordante com o descrito para *S. nigritus*, incluindo a deleção descrita para o par 11; H<sub>1</sub> - há variação morfológica em um ou mais pares cromossômicos, incluindo padrão de banda C do par 11, diferindo do descrito para *S. nigritus* na Argentina.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A área de estudo, assim como os procedimentos de captura, sedação e identificação individual estão descritos nos itens 2.1 e 2.2 de Materiais e Métodos do Capítulo I.

### 2.1 Coleta de Amostras Biológicas

As amostras de sangue para análises genéticas foram coletadas dos 12 indivíduos de macacos-prego capturados, durante o período de sedação dos animais, após antissepsia do local da punção com álcool 70%. Foram obtidos, de cada animal, entre 3 e 4mL de sangue da feia femoral utilizando seringas de 05mL e agulhas de calibre 20 x 5,5mm. As amostras foram imediatamente transferidas para tubos de coleta estéreis contendo heparina sódica e

armazenadas em isopor para serem transportadas até a base da UFRRJ na Marumbia, tendo sido implantadas em meio de cultura celular o mais breve possível. Após a implantação, o restante do sangue foi guardado em geladeira para extração de DNA e análise molecular.

## 2.2 Análise Molecular

As amostras de sangue foram transportadas, em isopor com gelo, até o laboratório do Departamento de Genética do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, para extração do DNA e demais procedimentos.

### 2.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA a partir de sangue total foi realizada através do protocolo de Fenol-Clorofórmio, descrito por Sambrook *et al.* (1989). Esta técnica tem, por procedimento inicial, a utilização de tampão de digestão (composto por 500 µL de TNE 1x, 50 µL de Tris-HCl 1M pH 8,0, 24 µL de SDS 25% e 10 µL de Proteinase K 10mg/mL) para promover a lise celular e digestão enzimática das proteínas, em microtubos plásticos de 2mL, no qual foram adicionados 200 µL de sangue total. Os microtubos foram levados ao banho-maria a 55°C por 3h, para solubilização da membrana plasmática e remoção de proteínas celulares. Após esse período, 500 µL de Fenol equilibrado (com Tris-HCl) foram adicionados, e o conteúdo agitado, formando uma emulsão leitosa. Nesta etapa são desnaturadas as proteínas presentes no material genético, além de removidos lipídeos e boa parte dos polissacarídeos. Os tubos foram centrifugados a 13200 xg, por 5 minutos. O sobrenadante, contendo o DNA, foi removido para um microtubo limpo e identificado de 1,5 mL, no qual foram adicionados 500 µL de clorofórmio, seguido de agitação. Esta etapa permite remover traços de fenol restantes no DNA, além de polissacarídeos não removidos na etapa anterior. Uma nova centrifugação a 13200 xg por 5 minutos foi realizada, e o sobrenadante removido para um novo tubo de 1,5 mL. Neste, foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado, e o frasco foi invertido cuidadosamente, para que o material genético fosse desidratado e aglutinado. Após nova centrifugação a 13200 xg por 10 minutos foi retirado o etanol absoluto e adicionados 500 µL de etanol 70%, também gelado, a fim de hidratar e remover do DNA possíveis contaminantes. Para isso, os tubos foram invertidos cuidadosamente e nova centrifugação a 13200 xg por 5 minutos foi efetuada. O álcool 70% foi descartado e os tubos foram mantidos de cabeça para baixo, em toalha de papel limpa, até ficarem completamente secos. Por fim, 50 µL de tampão TE 1x (Tris-HCl 10 mM + EDTA 1 mM), que inativa cátions essenciais para DNAses como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , foram adicionados e os tubos foram levados ao banho-maria à 37 °C para dissolução do DNA, sendo posteriormente armazenados em freezer a -20 °C.

As amostras foram quantificadas, por espectrofotometria, utilizando NanoDrop® modelo 2000 (Thermo Scientific). De acordo com o manual do fabricante, este equipamento avalia a absorvância de raios ultravioleta (UV) de DNA (260nm), de UV de proteínas (280nm) e de UV de contaminantes orgânicos (230nm). Através das razões de 260/280 e 260/230 é possível avaliar a pureza das amostras, sendo que valores aproximados a 1,8 para a razão 260/280 e valores entre 2 e 2,2 para razão 260/230 indicam pureza no DNA, e valores divergentes demonstram a presença de contaminantes, como proteínas ou fenol. Embora tenham sido encontrados valores de 260/280 aproximados ao esperado (variando de 1,79 a 1,99), os valores obtidos para razão 260/230 destoavam muito da variação esperada, estando abaixo de -1,33 ou acima de 2,61, indicando contaminação.

### 2.2.2 Purificação das amostras de DNA

Devido à contaminação encontrada utilizando-se *NanoDrop*<sup>®</sup>, foi necessária purificação das amostras de DNA, utilizando um *kit* de extração a partir de sangue total (*QIAamp*<sup>®</sup> DNA Blood MiniKit - *Qiagen*).

Os procedimentos seguiram o protocolo do fabricante para extração de DNA a partir de sangue total, pulando as primeiras etapas e iniciando com a adição de 200 µL de etanol absoluto às amostras de DNA, seguido de agitação em agitador de tubos tipo vortex por 15 segundos. As amostras foram centrifugadas brevemente para precipitação de possível líquido presente na tampa. O conteúdo foi cuidadosamente aplicado na coluna *QIAamp*, acompanhada de tubo coletor de 2 mL. As colunas foram fechadas e centrifugadas em centrífuga de microtubos a 6000 xg por 1 minuto. Após a centrifugação, as colunas foram transferidas para novos tubos de 2 mL, sendo descartados os tubos contendo o filtrado. As tampas das colunas foram cuidadosamente abertas para adição de 500 µL de tampão AW1, e realizada nova centrifugação à 6000 xg por 1 minuto. As colunas foram novamente transferidas para um novo tubo de 2 mL, sendo descartado o tubo contendo o filtrado. As colunas foram abertas para adição de 500 µL de tampão AW2. Nova centrifugação foi realizada, à 20000 xg, por 3 minutos. O filtrado foi descartado e a coluna retornou para o mesmo tubo, sendo processada nova centrifugação à 20000 xg, por 1 minuto. As colunas foram transferidas para tubos de 1,5 mL, identificados, sendo descartado o tubo contendo o filtrado. Foram adicionados 200 µL de tampão AE, mantendo-se a solução por 5 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, uma centrifugação final à 6000 xg, por 1 minuto, foi realizada. As colunas foram descartadas e os tubos de 1,5 mL, contendo o DNA purificado, foram armazenados em freezer a -20°C.

O DNA purificado foi quantificado em gel de agarose 0,8% adicionado de 0,5 µL de brometo de etídio (10mg/mL). Foi aplicado 1 µL de cada amostra de DNA com 0,5µL de tampão de arrasto (6x *Loading Buffer* - *Promega*<sup>®</sup>), além de soluções de DNA de fago *Lambda* (*Promega*<sup>®</sup>) com concentrações conhecidas de 12,5, 25 e 50 ng/µL. O gel foi submetido à eletroforese a 76V por 30 minutos e o resultado foi analisado em transiluminador *L.Pix Locus* (*Biotechnology*<sup>®</sup>) e fotografado utilizando o *software* do aparelho.

### 2.2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de PCR para amplificação do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II (COII) foram realizadas utilizando-se o conjunto de *primers* L7552 (5'-AACCATTTTCATAACTTTGTCAA-3') e H8321 (5'-CTCTTAATCTTTAACTTAAAAG-3'), descritos por Ruvolo *et al.* (1991).

As reações foram preparadas para um volume final de 25µL, contendo tampão 5x *Colorless GoTaq*<sup>®</sup> *Reaction Buffer* (*Promega*<sup>®</sup>) em concentração final de 1x, MgCl<sub>2</sub> (25 mM - *Promega*<sup>®</sup>) em concentração final de 1,5 mM (complementando para 3mM o MgCl<sub>2</sub> presente no tampão à 1,5mM), *mix* de dNTPs (10mM - *Promega*<sup>®</sup>) em concentração final de 0,2 mM, *primers* (10 µM) em concentração final de 2 µM cada, *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA polimerase (5U *GoTaq*<sup>®</sup> DNA polimerase - *Promega*<sup>®</sup>) em concentração final de 2U, DNA com concentrações variando de 10 a 20 ng/µL e completado o volume com água ultra pura. Para todas as reações também foi incluído um controle negativo, com água ao invés de DNA, para avaliar possíveis contaminações dos reagentes.

A amplificação ocorreu em um termociclador (*ProFlex*<sup>™</sup> *PCR System* - *Applied Biosystems*<sup>®</sup> *ThermoFisher Inc.*) utilizando-se os ciclos de temperatura descritos por Ruiz-

García *et al.* (2012b), com modificações: temperatura inicial de 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 95°C por 1 minuto para desnaturação das fitas de DNA, 50°C por 1 minuto para anelamento dos *primers* com a região flanqueadora da sequência-alvo, e 72°C por 1 minuto para extensão da amplificação, pela *Taq* DNA polimerase; além de uma temperatura de 72°C por 5 minutos para extensão final.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 2% adicionado de 0,5 µL de brometo de etídio (10mg/mL). Foi aplicado 1 µL de cada amostra de produto de PCR com 0,5µL de tampão de arrasto (6x *Loading Buffer* - Promega<sup>®</sup>), além de DNA *ladder* (100 pb *Ludwig Biotec* LTDA.) para avaliação do tamanho dos fragmentos amplificados e possíveis contaminações. O gel foi submetido à eletroforese a 100V por 1h e 40 minutos e o resultado foi analisado em transiluminador *L.Pix Loccus* (*Biotecnologia*<sup>®</sup>) e fotografado utilizando o *software* do aparelho.

#### 2.2.4 Sequenciamento

As reações de sequenciamento dos fragmentos amplificados do gene mitocondrial COII foram realizadas no Laboratório de Genética Marinha do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, na Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os produtos de PCR foram inicialmente purificados, para remoção de oligonucleotídeos e dNTPs não incorporados, com a utilização de *Exonuclease I/Shrimp Alkaline Phosphatase* (ExoSAP-IT- USB<sup>®</sup>), tendo sido adicionados 0,5 µL de ExoSAP-IT para cada 1 µL de produto de PCR e levado a temperatura de 37°C durante 15 minutos, para ação da enzima, sendo posteriormente inativada em temperatura de 85°C por 15 minutos.

Foram adicionados 3 µL dos produtos de PCR purificados (com concentrações variando de 10 a 40 ng/µL) e 3 µL de cada *primer* (na concentração de 1µM) em 4 µL de *Big Dye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (*Applied Biosystems<sup>®</sup> ThermoFisher Inc.*). O sequenciamento foi realizado em termociclador (*PCR System 9700 - Applied Biosystems<sup>®</sup> ThermoFisher Inc.*), utilizando-se os seguintes ciclos de temperatura: 96°C por 1 minuto; 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, repetidos por 25 vezes; 4°C como temperatura final.

Após o sequenciamento, as amostras foram purificadas em *Sephadex<sup>®</sup> G-50* (*Sigma-Aldrich*), adicionando-se 750 µL de *Sephadex<sup>®</sup>* (10g para cada 150 mL) em coluna própria, sobre microtubo de 1,5 mL. Estes foram centrifugados a 7000 xg por 90 segundos, descartando-se a água. A coluna foi transferida para novo microtubo de 1,5 mL, e adicionados 10 µL do produto de sequenciamento, tendo sido realizada nova centrifugação a 7000 xg por 3 minutos. Foram adicionados 15 µL de Formamida HI-DI (*ThermoFisher Inc.*) e as amostras foram distribuídas na placa para leitura do sequenciamento. A detecção dos produtos purificados foi realizada em Sequenciador Automático ABI 3130 (*Applied Biosystems<sup>®</sup>*). A análise dos eletroferogramas foi realizada com o auxílio do *software SeqScape v2.7* (*Applied Biosystems<sup>®</sup>*) e checados manualmente.

#### 2.2.5 Análises filogenéticas

Foram utilizadas, para comparação, sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II depositadas no GenBank<sup>®</sup> para *S. nigritus* (AF181088), obtida a partir de um indivíduo alojado em um centro de criação de animais na Argentina e sem origem conhecida, e *S. cay* (AF181089), a partir de um indivíduo de um Instituto de Ciências no Paraguai, com origem no mesmo país, ambas publicadas por Ascunce *et al.* (2002). Foram utilizadas, ainda,

cinco sequências cedidas por Manuel Ruiz-García, obtidas em Ruiz-García *et al.* (2012b), para as espécies *S. nigritus* (duas sequências de espécimes da Argentina), *S. xanthosternos* (sequência de um indivíduo da Bahia) e *S. cay* (duas sequências, sendo uma do Brasil e outra do Paraguai). As sequências mencionadas encontram-se no Anexo VI.

As análises filogenéticas foram realizadas no *software* Mega v6.06 (Tamura *et al.*, 2013). Foram obtidos valores de divergência genética considerando todas as substituições nucleotídicas, com base no método de Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993). As relações filogenéticas foram inferidas através do método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), seguindo o modelo *Kimura-2-parameter* (Kimura, 1980). O suporte para cada subclado apresentado foi estimado pelas médias do método de *bootstrap* (Felsenstein, 1985), com base em 1000 replicações.

## 2.3 Análise Citogenética

### 2.3.1 Cultivo celular

Os procedimentos para o cultivo de linfócitos do sangue periférico seguiram a técnica descrita por Moorhead *et al.* (1960) e decorreram até seu término em um laboratório improvisado na Ilha da Marambaia, porém com todos os equipamentos necessários para os procedimentos.

Para minimizar as chances de contaminação, ao redor de uma lamparina foram adicionadas pelo menos oito gotas de sangue total em cada tubo *Falcon* de 15 mL contendo meio de cultura RPMI – 1640 (4mL - *Vitrocell Embriolife*<sup>®</sup>) acrescido de 1 mL de soro fetal bovino (*Vitrocell Embriolife*<sup>®</sup>), que propicia a nutrição das células, além de 10U (0,1mL) de fitohemaglutinina (*Vitrocell Embriolife*<sup>®</sup>). Esta última promove a des-diferenciação dos linfócitos para que entrem em divisão celular (Kasahara, 2009). A cultura foi mantida, em banho-maria, à 37°C por 71h.

Após esse período 25U de colchicina ( $10^{-5}$  M), um inibidor de fuso mitótico, foram adicionadas à cultura celular, que retornou ao banho-maria por mais uma hora à 37°C. Este procedimento permite obter os cromossomos em metáfase, na qual se encontram em grau máximo de condensação favorecendo o estudo do cariótipo. Após completadas 72h, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 200 xg e o sobrenadante descartado. Foram acrescentados 5 mL de solução hipotônica de Cloreto de Potássio (KCl) a 0,075 M sob agitação em vórtex. Esta solução torna as células túrgidas, proporcionando uma melhor separação dos cromossomos na tentativa de evitar sobreposições na lâmina (Kasahara, 2009). Os tubos foram colocados novamente no banho-maria a 37°C por 20 minutos.

Ao final desse período os tubos foram novamente centrifugados a 200xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a fixação do material realizada adicionando-se ao *pellet* 5 mL de solução fixadora gelada (metanol e ácido acético, 3:1) sob agitação no vórtex, permanecendo em temperatura ambiente por 15 minutos. O processo de centrifugação e adição de solução fixadora foi repetido por mais duas vezes, acrescentando-se, por vez, 3 mL e 2 mL. O material foi armazenado em congelador a aproximadamente -10°C e transportado posteriormente, em isopor com gelo, para o laboratório do Departamento de Genética do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

No laboratório, foi realizada nova centrifugação a 200 xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e um volume de solução fixadora gelada proporcional ao *pellet* foi adicionado. A solução foi homogeneizada e duas gotas do material foram pingadas, com o

auxílio de pipeta Pasteur, em lâminas limpas com álcool 70% e previamente bafejadas. O ato de bafejar umedece a lâmina permitindo um melhor espalhamento do material.

### 2.3.2 Coloração convencional

As lâminas foram coradas utilizando-se solução de *Giemsa*<sup>®</sup> (Merck) 4%, em água destilada, por 10 minutos. Foi utilizado microscópio óptico da marca *Olympus*, modelo CH30RF100, com objetiva de 10x para localização das metáfases e de 100x para a análise dos cromossomos e fotografia. As melhores metáfases foram fotografadas e as imagens foram transferidas para o computador. Os cariótipos foram montados utilizando o programa *Adobe*<sup>®</sup> *Photoshop*<sup>®</sup> CS3, seguindo a organização estabelecida por Matayoshi *et al.* (1986).

### 2.3.3 Bandamento de heterocromatina constitutiva (banda C)

A técnica de banda C foi realizada segundo Sumner (1972) em lâminas de sete dias cujas metáfases foram previamente identificadas e analisadas com coloração convencional. Primeiramente, as lâminas eram imersas em solução de ácido clorídrico (HCl) 0,02N por 10 minutos e, em seguida enxaguadas em água destilada e secas ao ar. Posteriormente eram colocadas em uma cuba de coloração de vidro contendo Hidróxido de Bário (Ba(OH)<sub>2</sub>) a 5% por período entre 3 e 8 minutos, a 37°C. As lâminas foram novamente lavadas e secas, sendo ao final imersas em solução salina de cloreto e citrato de sódio (2x SSC - 17,55g de NaCl + 8,82g de Citrato de Sódio para 1L de água destilada) pH 7.0 a 60°C durante 10 minutos. As lâminas, após serem novamente lavadas e secas, foram coradas com solução de *Giemsa*<sup>®</sup> (Merck) 4%, em água destilada, por 10 minutos.

Após os procedimentos mencionados, as lâminas foram analisadas ao microscópio, com objetivas de 10 e 100x, e as metáfases com o melhor bandamento foram fotografadas. As fotografias produzidas foram transferidas para o computador e os cariótipos foram montados, com o *Adobe*<sup>®</sup> *Photoshop*<sup>®</sup> CS3, seguindo o estabelecido por Matayoshi *et al.* (1986).

### 2.3.4 Bandamento G

A técnica de banda G foi realizada segundo Seabright (1971), com modificações. Lâminas de 7 dias foram imersas em solução de tripsina 1% (*Difco*<sup>®</sup>, 1:250), preparada com solução Dulbecco (8g de NaCl + 0,2g de KCl + 0,2g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1,5g de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> para 1L de água destilada), por um período que variou de 8 a 12 segundos. Após serem retiradas dessa solução, foram lavadas em solução tampão fosfato (6,8g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0,88g de NaOH para 1L de água destilada) gelada e coradas com solução de *Giemsa*<sup>®</sup> (Merck<sup>®</sup>) 4%, em água destilada, por 4 minutos.

## 3 RESULTADOS

Foram capturados 12 indivíduos de macacos-prego na Ilha da Marambaia, sendo 8 machos e 4 fêmeas. Foi realizado sequenciamento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II (COII) para 8 indivíduos, devido a problemas de contaminação na extração de DNA para os demais. A análise citogenética com coloração convencional e banda C foi realizada para todos os 12 indivíduos. A técnica de bandamento G foi realizada para casos específicos, de modo a complementar os resultados obtidos no bandamento C.

### 3.1 Análise Molecular

Foram obtidas sequências de 555 a 695 pb do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II (Anexo VII) para oito dos doze indivíduos estudados. Foram observados 4 haplótipos, diversificados pela deleção de uma base A em um indivíduo (sequência 4), substituição de uma base C por A em um indivíduo (sequência 6), e uma inserção de base A para um terceiro indivíduo (sequência 7). Os demais cinco indivíduos apresentaram sequências idênticas, levando-se em consideração a comparação da região amplificada em comum a todos eles, com 555 pb.

Em termos de divergência intrapopulacional, com base no número de substituições por sítio, sete dos oito indivíduos apresentaram valor nulo ( $d = 0,0000$ ), sendo observada variação para apenas um deles, com valor  $d = 0,0019$  (Tabela 4). A divergência média entre os indivíduos foi  $d = 0,0005$ .

**Tabela 4:** Valores de divergência genética, com base na amplificação do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II, encontrados para oito indivíduos de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. As análises foram realizadas usando o modelo Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993). A divergência média entre os indivíduos foi  $d = 0,0005$ .

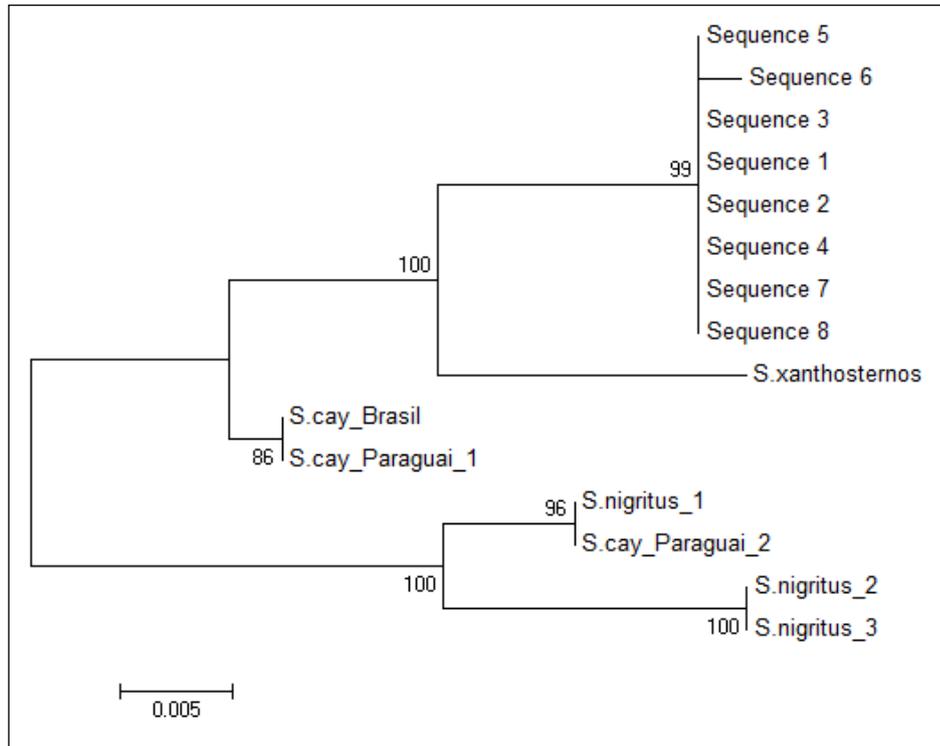
|                | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      |
|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 - Sequence_1 |        |        |        |        |        |        |        |
| 2 - Sequence_2 | 0,0000 |        |        |        |        |        |        |
| 3 - Sequence_3 | 0,0000 | 0,0000 |        |        |        |        |        |
| 4 - Sequence_4 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |        |        |        |        |
| 5 - Sequence_5 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |        |        |        |
| 6 - Sequence_6 | 0,0019 | 0,0019 | 0,0019 | 0,0019 | 0,0019 |        |        |
| 7 - Sequence_7 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0019 |        |
| 8 - Sequence_8 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0019 | 0,0000 |

A comparação entre as sequências obtidas para os indivíduos da Ilha da Marambaia e aquelas publicadas para outras espécies de *Sapajus* (Tabela 5), revelou uma maior divergência genética em relação às sequências de três exemplares de *S. nigritus* da Argentina ( $d = 0,0537$ ,  $0,0557$  - *S.nigritus\_1* e  $d = 0,0622$  e  $0,0642$  - *S.nigritus\_2* e *\_3*), além de um dos indivíduos de *S. cay* do Paraguai ( $d = 0,0537$  e  $0,0557$  - *S.cay\_Paraguai\_2*). A maior similaridade genética da população da ilha foi com a sequência obtida a partir do exemplar de *S. cay* do Brasil e um *S. cay* do Paraguai, com  $d = 0,0234$  para sete indivíduos e  $d = 0,0253$  para um, seguida pelo exemplar de *S. xanthosternos*, com  $d = 0,0254$  e  $0,0274$  (Tabela 5). A divergência média entre todos os espécimes analisados foi  $d = 0,0299$ .

**Tabela 5:** Valores de divergência genética encontrados pela comparação de sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II de oito indivíduos de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ com espécimes de outras espécies de *Sapajus*. As análises foram realizadas usando o modelo Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993). A divergência média entre os espécimes analisados foi  $d = 0,0299$ .

|                                | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10     | 11     | 12     | 13     | 14     |
|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 - Sequence_1                 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| 2 - Sequence_2                 | 0,0000 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| 3 - Sequence_3                 | 0,0000 | 0,0000 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| 4 - Sequence_4                 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| 5 - Sequence_5                 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| 6 - Sequence_6                 | 0,0019 | 0,0019 | 0,0019 | 0,0019 | 0,0019 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| 7 - Sequence_7                 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0019 |        |        |        |        |        |        |        |        |
| 8 - Sequence_8                 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0019 | 0,0000 |        |        |        |        |        |        |        |
| 9 - <i>S. nigritus</i> _1      | 0,0537 | 0,0537 | 0,0537 | 0,0537 | 0,0537 | 0,0557 | 0,0537 | 0,0537 |        |        |        |        |        |        |
| 10 - <i>S. nigritus</i> _2     | 0,0622 | 0,0622 | 0,0622 | 0,0622 | 0,0622 | 0,0642 | 0,0622 | 0,0622 | 0,0193 |        |        |        |        |        |
| 11 - <i>S. nigritus</i> _3     | 0,0622 | 0,0622 | 0,0622 | 0,0622 | 0,0622 | 0,0642 | 0,0622 | 0,0622 | 0,0193 | 0,0000 |        |        |        |        |
| 12 - <i>S. xanthosternos</i>   | 0,0254 | 0,0254 | 0,0254 | 0,0254 | 0,0254 | 0,0274 | 0,0254 | 0,0254 | 0,0558 | 0,0645 | 0,0645 |        |        |        |
| 13 - <i>S. cay</i> _Brasil     | 0,0234 | 0,0234 | 0,0234 | 0,0234 | 0,0234 | 0,0253 | 0,0234 | 0,0234 | 0,0372 | 0,0414 | 0,0414 | 0,0254 |        |        |
| 14 - <i>S. cay</i> _Paraguai_1 | 0,0234 | 0,0234 | 0,0234 | 0,0234 | 0,0234 | 0,0253 | 0,0234 | 0,0234 | 0,0372 | 0,0414 | 0,0414 | 0,0254 | 0,0000 |        |
| 15 - <i>S. cay</i> _Paraguai_2 | 0,0537 | 0,0537 | 0,0537 | 0,0537 | 0,0537 | 0,0557 | 0,0537 | 0,0537 | 0,0000 | 0,0193 | 0,0193 | 0,0558 | 0,0372 | 0,0372 |

O agrupamento dos espécimes, através do método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), e seguindo o modelo de dois parâmetros (Kimura, 1980), demonstrou maior semelhança dos macacos-prego da Ilha da Marambaia com o espécime de *S. xanthosternos*, da Bahia. O clado formado por este grupo foi agrupado com os indivíduos de *S. cay* do Brasil e outro do Paraguai. Por fim, formando uma ramificação mais ancestral, foram agrupados os exemplares de *S. nigritus* da Argentina, além do outro espécime de *S. cay* do Paraguai (Figura 20).



**Figura 20:** Árvore filogenética de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), a partir da comparação de sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II, demonstrando a relação de oito indivíduos de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia (*Sequence 1 - Sequence 8*) com outras espécies do gênero. Construída segundo o modelo de dois parâmetros (Kimura, 1980). Os números acima das ramificações correspondem a valores de *bootstrap* (Felsenstein, 1985), com base em 1000 replicações. A escala representa os valores de divergência genética (d).

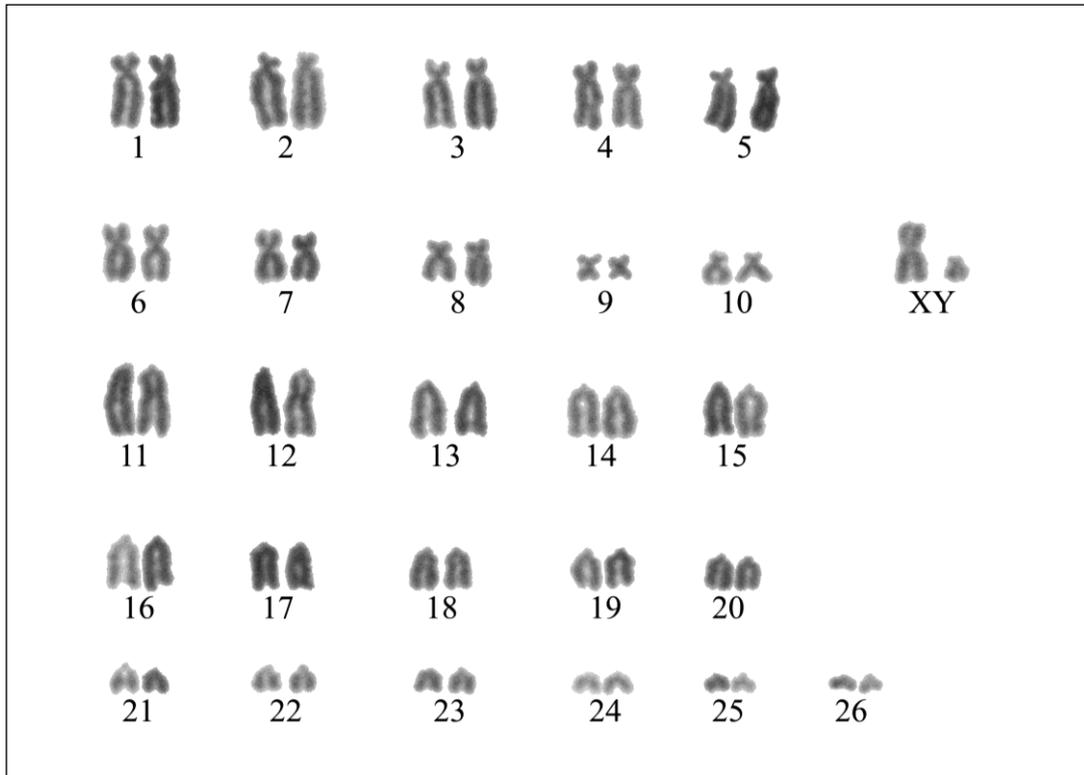
### 3.2 Análise Citogenética

Foram analisadas ao menos 15 metáfases completas de cada indivíduo, tanto para a coloração convencional quanto para o bandamento C. Para o bandamento G, foram analisadas ao menos 10 metáfases de indivíduos em casos específicos.

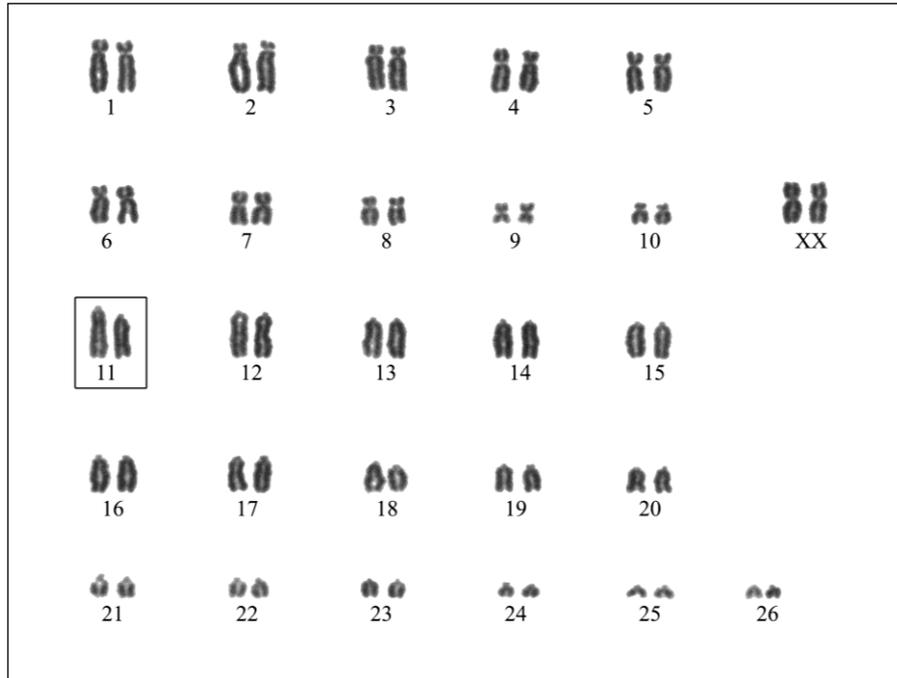
#### 3.2.1 Coloração convencional

Todos os 12 indivíduos apresentaram número diploide  $2n = 54$ , com par sexual XX para fêmeas e XY para machos. Nove pares de autossomos são submetacêntricos, um metacêntrico e os demais dezesseis pares, acrocêntricos. Ambos os cromossomos sexuais (X e Y) apresentaram-se submetacêntricos (Figura 21), sendo o Y um dos menores do cariótipo.

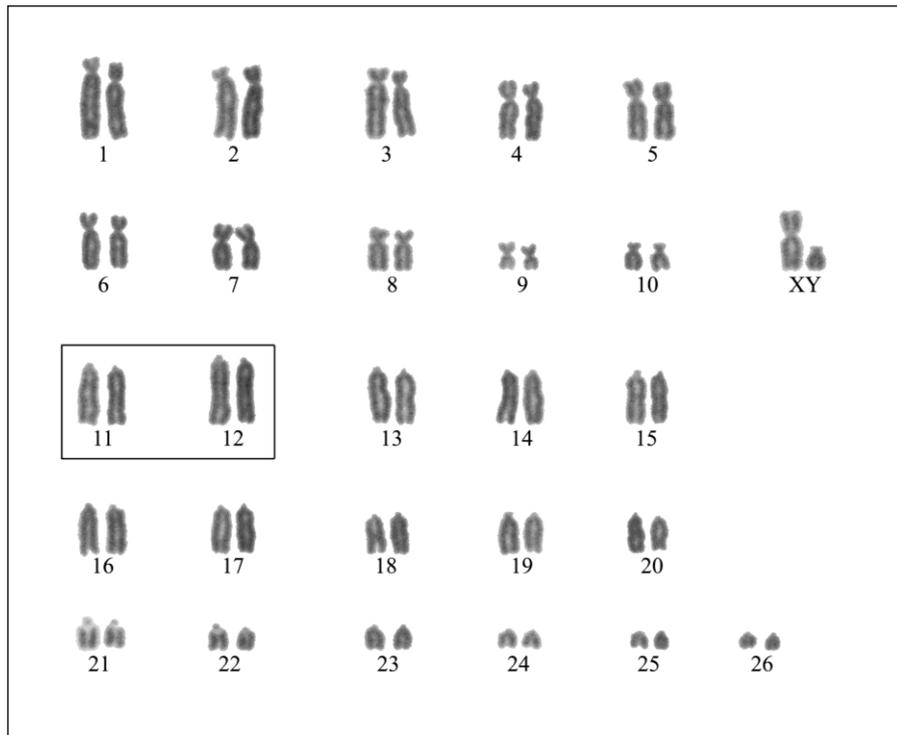
Para seis indivíduos foi possível perceber alterações de tamanho no par cromossômico 11, sendo possível confirmar se tratar deste par com a utilização das técnicas de bandamento C e G (itens 3.2.2 e 3.2.3). Em quatro destes indivíduos, os homólogos apresentavam tamanhos distintos entre si (Figura 22), enquanto para os dois restantes os homólogos do par 11 apresentavam o mesmo tamanho, mas eram menores que os do par 12, tendo tamanho aproximado ao do par 13 (Figura 23).



**Figura 21:** Cariótipo em coloração convencional de um indivíduo macho de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae),  $2n = 54$ , XY, da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ.



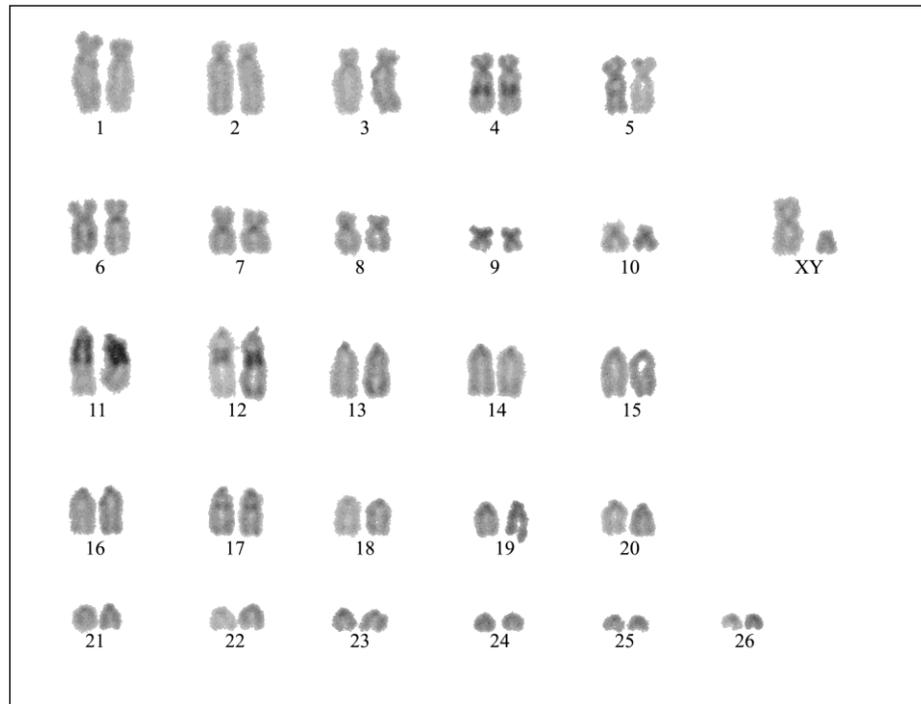
**Figura 22:** Cariótipo de uma fêmea de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae),  $2n = 54$ , XX, da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ, em coloração convencional ressaltando (caixa) a diferença de tamanho entre os homólogos do par 11.



**Figura 23:** Cariótipo de um macho de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae),  $2n = 54$ , XY, da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ, em coloração convencional ressaltando (caixa) a redução de tamanho do par 11 em relação ao 12.

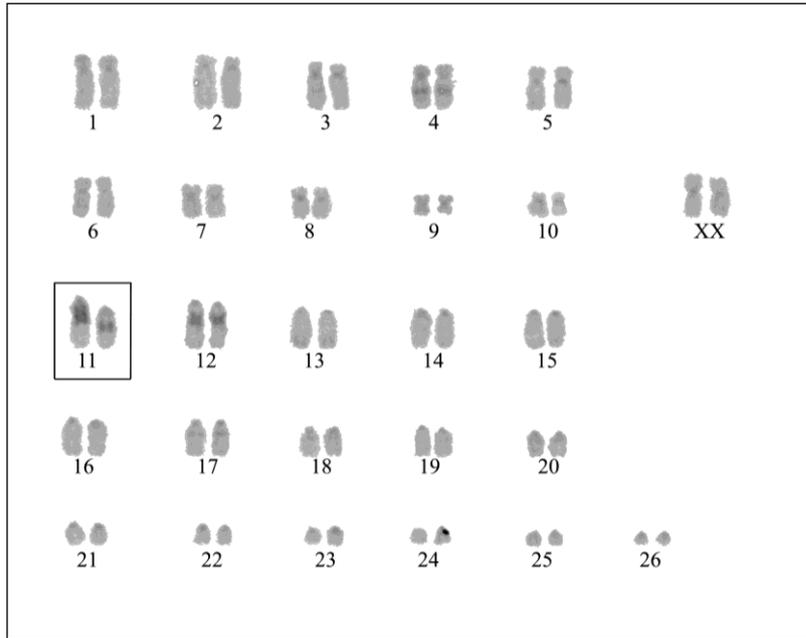
### 3.2.2 Bandamento C

Através da técnica de bandamento C foram observadas marcações não-centroméricas nos pares cromossômicos 4, 11, 12 e 17, todas intercalares à eucromatina (Figura 24). Para seis indivíduos (50% das amostras analisadas), a marcação apresentada pelo par 11 correspondeu a blocos ocupando aproximadamente 45% do cromossomo, estando próximos ao centrômero, em homozigose (Figura 24).

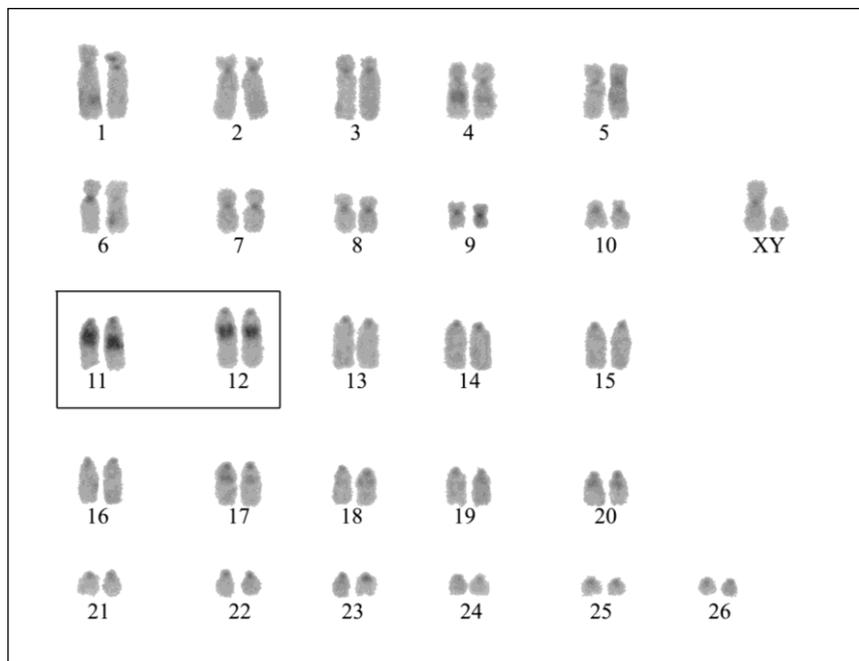


**Figura 24:** Pares cromossômicos 4, 11, 12 e 17 de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ, marcados com bandamento C. O par 11 apresentou, em seis indivíduos, homozigose para o bloco heterocromático próximo ao centrômero ocupando aproximadamente 45% do cromossomo.

Outros seis indivíduos apresentaram polimorfismos no tamanho e posição das bandas heterocromáticas do par 11, confirmando as alterações apresentadas com coloração convencional. Para quatro deles (33,33% das amostras analisadas), um dos homólogos possuía o mesmo padrão descrito anteriormente, representado pelo bloco proximal ocupando aproximadamente 45% das cromátides, que será chamado aqui de 11A (Figura 24). Seu homólogo apresentava, além de tamanho menor, uma banda mais distal e de tamanho reduzido, ocupando aproximadamente 30% do cromossomo (Figura 25), que será chamado de 11B. Os outros dois indivíduos (16,67% das amostras analisadas) apresentaram padrões parecidos para o par 11, embora o cromossomo com banda C proximal tenha apresentado tamanho reduzido, tendo sua banda proximal aproximadamente 30% do tamanho do cromossomo (Figura 26), sendo denominado 11C.



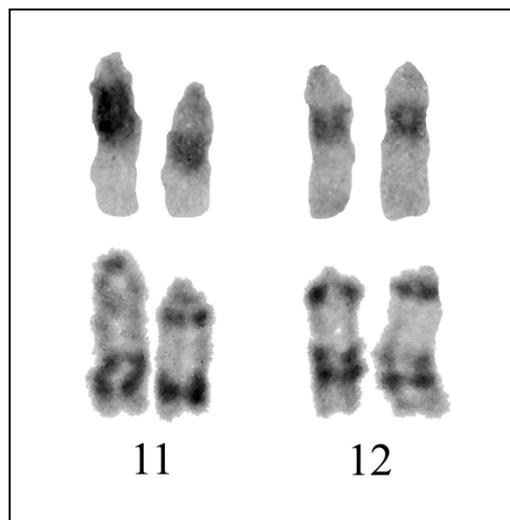
**Figura 25:** Cariótipo com bandamento C de uma fêmea de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ, destacando (caixa) o polimorfismo apresentado no par 11. Um dos homólogos apresentou banda próxima ao centrômero ocupando 45% da cromátide, enquanto o outro possuía tamanho reduzido, com banda intercalar ocupando 30% da cromátide.



**Figura 26:** Cariótipo com bandamento C de um macho de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ, destacando (caixa) o polimorfismo apresentado no par 11, com os homólogos apresentando tamanho reduzido quando comparados ao par 12. Um dos homólogos apresentou banda proximal enquanto o outro possuía banda mais distal, ambas ocupando 30% do cromossomo.

### 3.2.3 Bandamento G

A técnica de bandamento G foi realizada para análise do cariótipo dos indivíduos nos quais havia sido observada diferença de tamanho e polimorfismo de banda C entre homólogos. Desse modo foi possível confirmar, em comparação com o descrito na literatura (Figura 19), o pareamento e os cromossomos correspondentes aos pares 11 e 12 no cariótipo (Figura 27).



**Figura 27:** Comparação das marcações de banda C (acima) e G (abaixo) para os pares 11 e 12 de indivíduos de *Sapajus* sp. (Platyrrhini: Cebidae) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ, que apresentaram diferença de tamanho do 11 (com polimorfismos 11A e 11B).

## 4 DISCUSSÃO

A melhor compreensão dos processos evolutivos dos primatas do novo mundo requer uma abordagem que envolva análises tradicionais, como morfologia, biogeografia e citogenética, em associação a dados moleculares (Armada *et al.*, 1987; Seuánez *et al.*, 2005). Desse modo, o estudo de genética molecular e citogenética apresentados neste capítulo, associados aos padrões de pelagem e possível origem dos macacos-prego da Ilha da Marambaia tratados no Capítulo I, podem fornecer uma pista da história evolutiva dessa população.

O baixo valor de divergência média ( $d = 0,0005$ ) apresentado para a população da Ilha da Marambaia através da análise do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II demonstra que os indivíduos estão proximamente relacionados. Isso pode indicar, por exemplo, uma única origem para a população, sendo a divergência ( $d = 0,0019$ ), apresentada por um indivíduo (sequência 6), decorrente de processos evolutivos naturais. Valores maiores que os obtidos para a população da Marambaia para indivíduos de macaco-da-noite, *Aotus lemurinus* ( $d = 0,002$ ,  $0,007$  e  $0,010$ ), levaram à conclusão de serem exemplares capturados a partir de uma mesma população na Colômbia (Ashley & Vaughn, 1995). O valor zero ( $d = 0,0000$ ) apresentado por dois indivíduos de *S. nigritus* (*S.nigritus\_2* e *S.nigritus\_3*) pode indicar que tenham origem em uma mesma população, na Argentina. Já a divergência nula para um dos *S.*

*cay* do Paraguai (*S.cay\_Paraguai\_2*) em relação a um dos indivíduos de *S. nigritus* (*S.nigritus\_01*) pode indicar engano na identificação de um dos dois espécimes, provavelmente do *S. cay*, por estar agrupado com os indivíduos de *S. nigritus* (Figura 20).

Os valores obtidos na comparação dos indivíduos da Ilha da Marambaia com espécimes de *S. nigritus* da Argentina ( $d = 0,0537, 0,0557, 0,0622$  e  $0,0642$ ) são consideravelmente maiores que os obtidos entre os espécimes de *S. nigritus* e dois indivíduos de *S. cay* (do Brasil e um do Paraguai), com valores  $d = 0,0372$  e  $0,0414$ , estando próximos ou superiores ao encontrado entre um dos indivíduos de *S. nigritus* com o espécime de *S. xanthosternos*, com valor  $d = 0,0558$  (Tabela 5). Somente os valores obtidos na comparação entre dois indivíduos de *S. nigritus* e o indivíduo de *S. xanthosternos* foram maiores ( $d = 0,0645$ ). A divergência observada entre os indivíduos de *S. nigritus* e *S. xanthosternos* condiz com a distância encontrada por Ruiz-García *et al.* (2012b) para as espécies, utilizando o mesmo gene em outras análises.

Os valores obtidos entre a amostra da Ilha da Marambaia e exemplares de *S. nigritus* também são maiores que os observados, por exemplo, entre indivíduos de *S. nigritus* e *S. cay* da Argentina, com  $d = 0,0175$  (Martinez *et al.*, 2002). Outras comparações, entre espécies de outros gêneros, também apresentam valores menores ou similares, como a análise de quatro espécies de macacos-aranha (*Ateles*), com valores variando de  $d = 0,0349$  a  $0,0470$  (Collins & Dubach, 2000), espécies de mico-de-cheiro (*Saimiri*), com valores  $d = 0,02$  e  $0,031$ , ou espécies de *Aotus*, com valores entre  $0,046$  e  $0,06$  (Ascunze *et al.*, 2003). Os dados moleculares contradizem a análise fenotípica dos indivíduos e a região geográfica na qual se encontra a população da Ilha da Marambaia (capítulo I), que indicam ser provável pertencerem à espécie *S. nigritus*. Essa grande divergência genética pode estar associada ao fato das comparações terem sido realizadas com indivíduos provenientes da Argentina (embora um deles não tenha origem conhecida), sendo possível que haja uma maior divergência genética entre as populações ao longo da distribuição da Argentina ao Brasil. Como não há dados de sequenciamento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II para *S. nigritus* de outras regiões do Brasil, não é possível dizer se a divergência encontrada é somente para a população da Ilha da Marambaia ou se ocorre em uma escala geográfica maior, como para indivíduos do estado do Rio de Janeiro, ou até mesmo de outros estados brasileiros. Outra possibilidade é esta divergência estar associada à divisão em subespécies, como tratado no capítulo I, sendo *S. nigritus cucullatus* encontrada nos estados brasileiros de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, além da região de Iguazu, na Argentina, enquanto *S. n. nigritus* estaria restrita ao Brasil, distribuída nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro (Lynch Alfaro *et al.*, 2014). Ainda assim, seria esperada uma maior semelhança da população da Ilha da Marambaia com *S. nigritus*.

A menor divergência da população da Ilha da Marambaia com dois indivíduos de *S. cay* e um de *S. xanthosternos* não é, de qualquer forma, indicativa de pertencerem a uma destas espécies, pois as distâncias apresentadas ( $d = 0,0234, 0,0253, 0,0254$  e  $0,0274$ ) são maiores que as observadas, de forma interespecífica, em *Sapajus* e *Saimiri*, por exemplo, como tratado anteriormente.

Segundo a árvore filogenética de *Neighbor-Joining* obtida, a população da Ilha da Marambaia relaciona-se de forma mais próxima a *S. xanthosternos* (Figura 20). Essa relação pode estar associada ao processo de migração do gênero, estudado por Lynch Alfaro *et al.* (2012a), tratado no capítulo I, que descreve um maior período de permanência e evolução para *Sapajus* na Mata Atlântica. Na árvore filogenética obtida por este autores, as espécies *S. nigritus* (incluindo espécimes do sudeste brasileiro), *S. xanthosternos*, *S. robustus* e *S. cay*

estão agrupadas, em divergência a *S. apella*, *S. macrocephalus* e *S. libidinosus*, mas sem precisão das relações entre elas (Figura 17). De alguma forma, com base nessa teoria, a população da Ilha da Marambaia pode ter evoluído a partir de um ancestral comum a *S. xanthosternos*, ficando restrita em determinada área do Rio de Janeiro, enquanto os exemplares dessa espécie migraram para Bahia. Outros grupos podem ter migrado em direção ao sul do continente, onde se diversificaram, formando as populações de *S. nigritus* e *S. cay* que hoje são estudadas na Argentina e Paraguai.

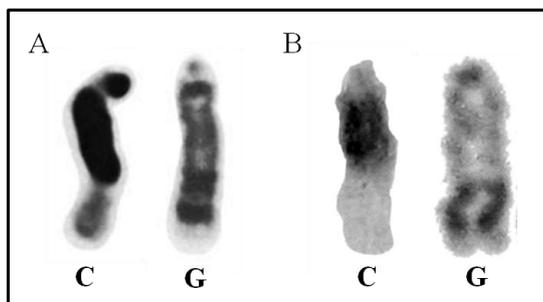
O distanciamento encontrado entre as sequências obtidas para o gene COII nos indivíduos da Ilha da Marambaia com relação àquelas da literatura pode indicar uma divergência dessa população, possivelmente com a manutenção de características ancestrais. O mesmo pode se dar para outras populações do estado do Rio de Janeiro ou do sudeste do Brasil, influenciado pelo isolamento ou outras pressões evolutivas. De modo semelhante, foi apresentado por Martinez *et al.* (2002), com base nos dados do gene COII, a proposta de que as então subespécies *Cebus apella paraguayanus* e *C. a. nigritus* estariam em processo de divergência, com valor inferior ao encontrado para a população da ilha ( $d = 0,0175$ ), sabendo-se que hoje se tratam de duas espécies bem suportadas (*S. cay* e *S. nigritus*, respectivamente).

Em relação à análise citogenética, foi possível identificar que o cariótipo dos macacos-prego da Ilha da Marambaia apresenta número diploide e morfologia dos cromossomos compatível com o descrito para as espécies do gênero *Sapajus* (Matayoshi *et al.*, 1986). A única divergência encontrada foi a morfologia do cromossomo Y, apresentando-se como um submetacêntrico enquanto, na maioria das publicações, é descrito como acrocêntrico (Matayoshi *et al.*, 1986; Clemente *et al.*, 1987; Mudry de Pargament & Slavutsky, 1987; Mudry *et al.*, 1990; Amaral *et al.*, 2008; Iughetti, 2008). A mesma morfologia observada para o cromossomo Y dos indivíduos da ilha foi descrita por Freitas & Seuánez (1982) para espécimes de *Cebus apella* do Rio de Janeiro, Bahia e Pará, que atualmente representam, de acordo com a distribuição geográfica relatada, *Sapajus nigritus*, *S. xanthosternos* e *S. apella*. A morfologia do cromossomo Y já foi descrita com variações para outros gêneros de Platyrrhini, como *Alouatta*, *Ateles* e *Callicebus* (Koiffmann & Saldanha, 1973; Armada *et al.*, 1987; Barros *et al.*, 2003; Nieves *et al.*, 2005b) e parece ser comum nesse nível taxonômico.

Com exceção do par cromossômico 11, os pares com marcação de banda C encontrados para os indivíduos da Ilha da Marambaia (4, 12 e 17) já foram descritos para a espécie da mesma área de ocorrência (*S. nigritus*), embora não exatamente na mesma combinação (Mudry, 1990; Mudry *et al.*, 1991; Ponsà *et al.*, 1995; Steinberg *et al.*, 2014). Essa variação de pares marcados com bandamento C é comum para macacos-prego e caiararas, inclusive de forma intraespecífica (Amaral *et al.*, 2008).

A banda C intercalar no par 11, entretanto, nunca foi descrita para *S. nigritus*, e até o momento era considerada uma característica específica de *S. xanthosternos*, tendo aparecido, segundo Seuánez *et al.* (1986), após a radiação das espécies do gênero. A banda C apresentada por estes autores para *S. xanthosternos* é grande (ocupando aproximadamente 50% do cromossomo) e próxima ao centrômero, como o polimorfismo 11A, apresentado aqui. Há, entretanto, uma diferença entre o par 11 dos indivíduos da Marambaia e o publicado por Seuánez *et al.* (1986), referente ao padrão de bandas G. No trabalho publicado para *S. xanthosternos*, é evidenciada a presença de uma banda positiva (mais escura) próximo ao centrômero e, após uma grande região sem marcação, duas bandas bem distintas na porção terminal (Figura 28), enquanto o polimorfismo 11A dos macacos-prego da Ilha da Marambaia apresentam somente as duas bandas na região terminal, não tendo sido observada a marcação próxima ao centrômero, o que demonstra uma divergência.

A marcação intercalar para o par cromossômico 11 pode ter se originado duas vezes na evolução do grupo, ou seja, para os ancestrais da população da Ilha da Marambaia e para os ancestrais de *S. xanthosternos*, ou mais provavelmente, ser uma característica comum a ambos, com um único ancestral direto. Esse tipo de marcação de banda C no par 11 corrobora a maior relação entre a população de macacos-prego da Ilha da Marambaia e *S. xanthosternos*, através da análise do gene mitocondrial COII.



**Figura 28:** Comparação dos padrões de bandamento C e G de indivíduos de *Sapajus xanthosternos* (A) com o polimorfismo 11A apresentado por indivíduos da população de macacos-prego da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ (B). Notar a presença de uma marcação positiva (mais escura) próxima ao centrômero no bandamento G de *S. xanthosternos*, o que diverge dos macacos-prego da Ilha da Marambaia. Adaptado de Seuánez *et al.* (1986).

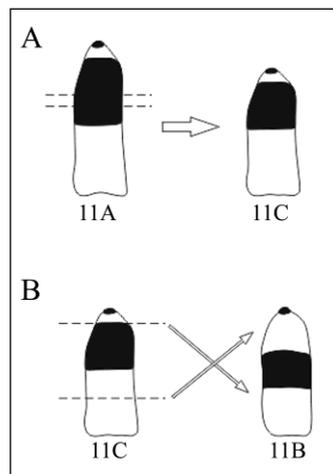
Pode-se, ainda, descartar a possibilidade de introdução de *S. xanthosternos* na Ilha da Marambaia, pois o fenótipo dos indivíduos capturados (capítulo I) é condizente com o descrito para *S. nigritus*.

Se considerarmos que a população da ilha realmente pertença a *S. nigritus*, visto a localização geográfica e o fenótipo, então o polimorfismo apresentado para o par 11, descrito para populações da Argentina, é uma característica local, como mencionado por Ponsà *et al.* (1995), e não de toda a distribuição da espécie. Reforça esse fato outros trabalhos publicados demonstrando, para *S. nigritus*, padrão diferente do descrito na Argentina (Freitas & Seuánez, 1982; Iughetti, 2008; Penedo *et al.*, 2014). Do mesmo modo como foi citado para a análise molecular, o polimorfismo apresentado no par cromossômico 11 pode estar associado às subespécies de *S. nigritus*, podendo-se apresentar para *S. n. nigritus* na forma de grande bloco heterocromático terminal (Freitas & Seuánez, 1982; Penedo *et al.*, 2014) ou intercalar (presente estudo).

Embora a organização das regiões de eucromatina seja bastante conservada, rearranjos de heterocromatina constitutiva são comuns e fazem parte do processo evolutivo das espécies de Platyrrhini (Garcia *et al.*, 1983; Nieves *et al.*, 2005a). A presença de heterocromatina intersticial e/ou terminal pode facilitar a ocorrência de rearranjos estruturais, como inserções, fusões ou inversões, uma vez que quebras cromossômicas podem ocorrer nestas regiões sem afetarem regiões informativas do DNA (Garcia *et al.*, 1983). Esse fato pode estar relacionado à presença de regiões cromossômicas propícias a quebras, denominadas sítios frágeis, as quais podem estar associadas às porções terminais da heterocromatina constitutiva, comumente presente em primatas, incluindo humanos (Miró *et al.*, 1987).

Para *Cebus* e *Sapajus*, o processo de diversificação cromossômica é acompanhado por movimentos de eucromatina e heterocromatina (Nieves *et al.*, 2010), sendo a inversão o

rearranjo mais comum (Garcia *et al.*, 2002). De forma intraespecífica, predomina o processo de inversão paracêntrica (Ruiz-Herrera *et al.*, 2004), a qual não envolve o centrômero, sendo comum para espécies desses gêneros (Matayoshi *et al.*, 1987; Ponsà *et al.*, 1995; Ruiz-Herrera *et al.*, 2004). Alguns cromossomos podem ser mais susceptíveis a esses rearranjos por apresentarem sítios frágeis, como já identificado no braço longo dos cromossomos 1, 11, 18 e X (Mudry, 1990). A variação apresentada para o par cromossômico 11 dos indivíduos da Ilha da Marambaia pode ter envolvido processos de deleção e inversão, possivelmente relacionados a regiões de sítio frágil. Se levarmos em consideração que a forma 11A é a ancestral para a população da ilha da Marambaia, visto a maior frequência desta (seis indivíduos em homozigose e quatro em heterozigose), além do seu tamanho ser conservado em relação ao do par 12, podemos elaborar uma hipótese para o surgimento das outras duas formas (11B e 11C). Considerando um menor número de passos evolutivos, podemos sugerir que, a partir da forma 11A, pode ter havido uma deleção parcial de uma região qualquer do bloco heterocromático, gerando a forma 11C (Figura 29a). Em outro momento, pode ter ocorrido uma inversão paracêntrica envolvendo o bloco heterocromático e parte da eucromatina, originando a forma 11B (Figura 29b).



**Figura 29:** Possíveis rearranjos cromossômicos responsáveis pelo polimorfismo de banda C observado no par cromossômico 11 dos macacos-prego (*Sapajus* sp.) da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. (A) Deleção parcial do bloco proximal; (B) inversão paracêntrica envolvendo o bloco heterocromático e parte da eucromatina. Os códigos 11A, 11B e 11C identificam os três polimorfismos encontrados para o par na população estudada.

O fato dos demais pares cromossômicos terem apresentado marcações de banda C em homozigose para todos os indivíduos é um forte indício de que as variações presentes no par 11 não são provenientes de hibridação. Somente seria este o caso se ambas as populações que, teoricamente, teriam dado origem à população da Ilha da Marambaia, tivessem divergências somente quanto ao par 11, sendo iguais para os demais pares marcados.

## 5 CONCLUSÕES

A similaridade genética dentre os indivíduos da Ilha da Marambaia, detectada com base nas sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II, demonstra tratarem-se de espécimes com origem geográfica única, provavelmente nativos da própria ilha.

Em relação às sequências do gene mitocondrial, rejeita-se  $H_0$ , uma vez que a população da Ilha da Marambaia apresentou maior similaridade genética com aquelas descritas para *S. xanthosternos* e *S. cay* e maior divergência em relação às sequências de *S. nigritus* da Argentina.

A distância genética entre a população da Ilha da Marambaia para as demais espécies em relação à sequência analisada foi maior que aquelas já descritas por outros autores para espécies de *Sapajus* e de outros gêneros de primatas. Esse fato pode indicar distanciamento evolutivo da população dessa região com as demais do continente. Entretanto, mais análises genéticas devem ser analisadas, para esta e outras populações, de modo a confirmar essa hipótese.

A relação dessa população com *S. xanthosternos* e *S. cay* pode auxiliar no entendimento do processo evolutivo do gênero no período de permanência na Mata Atlântica, relatado por Lynch Alfaro *et al.* (2012a), ou pela deriva das espécies a partir desse mesmo local, como descrito por Martins-Jr. *et al.* (2015).

Em relação ao cariótipo, rejeita-se  $H_0$ , embora os indivíduos amostrados na Ilha da Marambaia apresentem número diplóide e morfologia dos cromossomos condizente com o descrito para as espécies de *Sapajus*, a morfologia e o padrão de bandamento C do cromossomo 11 não foi o mesmo que o descrito para populações de *S. nigritus* da Argentina.

O cromossomo Y dos macacos-prego machos da Ilha da Marambaia é submetacêntrico e, apesar de divergir da maioria dos trabalhos publicados, está de acordo com o polimorfismo descrito para espécies de *Sapajus*, além de outras espécies de primatas.

O padrão de banda C observado para o par 11 dos indivíduos estudados da Ilha da Marambaia foi semelhante ao de *S. xanthosternos*, que até o momento era a única espécie descrita com banda intercalar.

Os polimorfismos de banda C do par 11 são provavelmente decorrentes de rearranjos cromossômicos e não de hibridação, devendo ser investigados para outras populações do Rio de Janeiro.

A marcação de banda C intercalar do par cromossômico 11 dos indivíduos da Ilha da Marambaia reforça a relação existente com *S. xanthosternos* e deve ser investigada para outras populações do Rio de Janeiro e de outros estados brasileiro.

A deleção total do bloco heterocromático terminal, descrita para populações de *S. nigritus* da Argentina, pode não ser uma característica da espécie em toda sua área de distribuição.

## CONCLUSÕES GERAIS

Este foi o primeiro estudo com a população de macacos-prego da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ, apresentando a análise fenotípica de pelagem, as sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II e o estudo do cariótipo com coloração convencional e bandamento de heterocromatina constitutiva.

Em relação ao fenótipo e à área de ocorrência, os macacos-prego da Ilha da Marambaia podem pertencer a *S. nigritus*.

As divergências genéticas encontradas entre a população da Ilha da Marambaia e o publicado para *S. nigritus* da Argentina pode indicar que a população estudada tenha conservado características ancestrais, levando-se em consideração a hipótese de migração do gênero descrita por Lynch Alfaro *et al.* (2012a).

O cariótipo encontrado para os indivíduos amostrados na Ilha da Marambaia foi, de uma forma geral, condizente com o descrito para as espécies de *Sapajus*, com número diplóide  $2n = 54$ , XX ou XY.

Deve-se averiguar se a forma submetacêntrica do cromossomo Y está associada a uma determinada distribuição geográfica para as espécies de *Sapajus*, podendo servir como mais um elemento para o entendimento da evolução do gênero.

Mais análises de genética molecular, como o sequenciamento de outros genes mitocondriais e nucleares, e citogenética devem ser implementadas nesta e em outras populações de macacos-prego do Rio de Janeiro, de modo a avaliar a diversidade apresentada no estado.

A técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) utilizando a sonda do cromossomo 21 humano deve ser implementada para o cariótipo dos indivíduos desta população, de modo a confirmar os polimorfismos de banda C para o par cromossômico 11.

Estudos que avaliem dados básicos de biometria e análise fenotípica de outras populações do Rio de Janeiro precisam ser implementados, de modo a enriquecer os dados para a espécie no estado.

Embora pareça que a população de macacos-prego esteja isolada na Ilha da Marambaia, deve-se averiguar a existência de outras populações na região de Guaratiba, Rio de Janeiro, e a possibilidade de fluxo gênico.

Populações de macacos-prego do Rio de Janeiro e de outros estados do Brasil devem ser estudadas para averiguar se as relações genéticas encontradas neste estudo entre a população da Ilha da Marambaia e as espécies *S. nigritus*, *S. xanthosternos* e *S. cay* estendem-se para uma maior área de distribuição.

Do mesmo modo, deve-se avaliar se o polimorfismo de banda C encontrado para o par cromossômico 11 nos indivíduos amostrados na Ilha da Marambaia está presente em outras populações no sudeste e sul do Brasil.

Quanto ao aumento dos avistamentos dos primatas na ilha, deve-se estimar a densidade populacional para averiguar se os valores indicam crescimento exacerbado da população, de modo a prevenir que os macacos-prego se tornem protagonistas de alterações no ambiente ou uma praga para os moradores.

As informações prestadas pelos moradores mais antigos da comunidade da Ilha da Marambaia e pelos militares do exército na Restinga da Marambaia foram de suma importância para a realização do trabalho e devem, sempre que possível, ser realizadas em estudos envolvendo populações de macacos-prego próximos a humanos.

A continuidade dos estudos da população de macacos-prego na Ilha da Marambaia é de fundamental importância para a conservação da biodiversidade local e sua presença em uma Área de Proteção Ambiental, que conta ainda com a supervisão da Marinha do Brasil, pode ser estratégica para conservação dos macacos-prego no estado do Rio de Janeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, L.M. **Os primatas do corredor do Alto Rio Paraná (região de Porto Rico, estados do Paraná e Mato Grosso do Sul): ocorrência, georreferenciamento e parâmetros populacionais.** (Dissertação de Mestrado). Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 2006.
- AMARAL, J.M.J.; SIMÕES, A.L. JONG, D. Allele frequencies and genetic diversity in two groups of wild tufted capuchin monkeys (*Cebus apella nigrilus*) living in an urban forest fragment. **Genetics and Molecular Research**. 4(4): 832-838. 2005.
- AMARAL, P.J.S.; FINOTELO, L.F.M.; DE OLIVEIRA, E.H.C.; PISSINATTI, A.; NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C. Phylogenetic studies of the genus *Cebus* (Cebidae-Primates) using chromosome painting and G-banding. **BMC Evolutionary Biology**, 8: 169. 2008.
- ARAÚJO, R.M.; SOUZA, M.B.; RUIZ-MIRANDA, C.R. Densidade e tamanho populacional de mamíferos cinegéticos em duas Unidades de Conservação do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia, Série Zoológica**, 98(3): 391-396. 2008.
- ARAÚJO, D.N.; DE MELO, S.C.R.; CAMARGO, A.C.A.C. Avaliação do padrão comportamental de macacos-prego (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro. **Colloquium Agrariae**, 6(1): 31-42. 2010.
- ARMADA, J.L.A.; BARROSO, C.M.L.; LIMA, M.M.C.; MUNIZ, J.A.P.C.; SEUÁNEZ, H.N. Chromosome Studies in *Alouatta belzebul*. **American Journal of Primatology**, 13(3): 283-296. 1987.
- ASCUNCE, M.S.; HASSON, E.; MUDRY, M.D. Description of the cytochrome *c* oxidase subunit II gene in some genera of New World monkeys (primates, Platyrrhini). **Genetica**, 114(3): 253-267. 2002.
- ASCUNCE, M.S.; HASSON, E.; MUDRY, M.D. COII: a useful tool for inferring phylogenetic relationships among New World monkeys (Primates, Platyrrhini). **Zoologica Scripta**, 32(5): 397-406. 2003.
- ASHLEY, M.V. & VAUGHN, J.F. Owl monkeys (*Aotus*) are highly divergent in mitochondrial Cytochrome *c* Oxidase (COII) sequences. **International Journal of Primatology**, 16(5): 793-806. 1995.
- BARROS, R.M.S.; NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C.; RODRIGUES, L.R.R.; NEUSSER, M.; DE OLIVEIRA, E.H.; WIENBERG, J.; MUNIZ, J.A.P.C.; RISSINO, J.D.; MULLER, S. Chromosomal studies in *Callicebus donacophilus pallescens*, with classic and molecular cytogenetic approaches: Multicolour FISH using human and *Saguinus oedipus* painting probes. **Chromosome Research**, 11(4): 327-334. 2003.
- BELO, W.C.; DIAS, G.T.M.; DIAS, M.S. O fundo marinho da Baía da Ilha Grande, RJ: o relevo submarino e a sedimentação no canal central. **Revista Brasileira de Geofísica**, 20(1): 5-15. 2002.
- BIONDI, L.C.M. **Comportamento posicional e uso de substrato de macacos-prego *Cebus libidinosus* Spix, 1823.** (Dissertação de Mestrado). São Paulo: Universidade de São Paulo. 2010.

- BOUBLI, J.P.; RYLANDS, A.B.; FARIAS, I.; ALFARO, M.E.; LYNCH ALFARO, J.W. *Cebus* phylogenetic relationships: a preliminary reassessment of the diversity of the untufted capuchin monkeys. **American Journal of Primatology**, 74(4):381–393. 2012.
- BROCARD, C.R.; GONÇALVES, H.S.; ZIPPARRO, V.B.; GALETTI, M. Predation of Adult Palms by Blackcapuchin Monkeys (*Cebus nigritus*) in the Brazilian Atlantic Forest. **Neotropical Primates**, 17(2): 70-74. 2010.
- BROWN, W.M.; PRAGER, E.M.; WANG, A.; WILSON, A.C. Mitochondrial DNA sequences of Primates: tempo and mode of evolution. **Journal of Molecular Evolution**, 18(4): 225-239. 1982.
- BUENO, C.C.S.; RIBEIRO, N.M.A.; LUZ, H.R.; SANTOS, R.J.; FERREIRA, I. **Parâmetros biológicos *Ramphocelus bresilius* Linnaeus, 1766 (Passeriformes: Emberizidae: Thraupinae) na Ilha da Marambaia, Baía de Sepetiba, Mangaratiba- RJ**. In: Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil. São Lourenço, p. 1-3. 2009.
- CABRERA, A. Catalogo de los mamíferos de América Del Sur. **Revista do Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernadino Rivadavia”**. 1: 1–307. 1957.
- CARVALHO, A.L.G.; DE ARAÚJO, A.F.B.; DA SILVA, H.R. Lagartos da Marambaia, um remanescente insular de Restinga e Floresta Atlântica no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Biota Neotropica**, 7(2): 221-226. 2007.
- CLEMENTE, I.C.; GARCIA, M.; PONSÀ, M.; EGOZCUE, J. High-Resolution Chromosome Banding Studies in *Cebus apella*, *Cebus albifrons*, and *Lagothrix lagothricha*: Comparison With the Human Karyotype. **American Journal of Primatology**, 13(1): 23-26. 1987.
- COLLINS, A.C. & DUBACH, J.M. Phylogenetic relationships of spider monkeys (*Ateles*) based on mitochondrial DNA variation. **International Journal of Primatology**, 21(3): 381–420. 2000.
- CONDE, M.M.S.; LIMA, H.R.P.; PEIXOTO, A.L. Aspectos florísticos e vegetacionais da Marambaia, Rio de Janeiro, Brasil. In: MENEZES, L.F.T; PEIXOTO, A.L.; ARAUJO, D.S.D. (Orgs.). **História Natural da Marambaia**. Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, p.15-38. 2005.
- CUNHA, A.A.; VIEIRA, M.V.; GRELLE, C.E.V. Preliminary observations on habitat, support use and diet in two non-native primates in an urban Atlantic forest fragment: The capuchin monkey (*Cebus* sp.) and the common marmoset (*Callithrix jacchus*) in the Tijuca forest, Rio de Janeiro. **Urban Ecosystems**, 9(4): 351-359. 2006.
- DA SILVA, D.F. **Ilha da Marambaia, RJ: atores externos, transformações econômicas e conflitos**. (Tese de Doutorado). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2005.
- DA SILVA, H.R.; CARVALHO, A.L.G.; BITTENCOURT-SILVA, G.B. Frogs of Marambaia: a naturally isolated Restinga and Atlantic Forest remnant of southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, 8(4): 167-174. 2008.
- ELLIOT, D.G. **A review of the primates**. Monograph Series. 1<sup>a</sup> ed. New York: American Museum of Natural History, 317p. 1913.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, 39(4):783-791. 1985.

- FLEAGLE, J.G. & MITTERMEIER, R.A. Differential habitat use by *Cebus apella* and *Saimiri sciureus* in Central Surinam. **Primates**, 22(3): 361-367. 1981.
- FRAGASZY, D.M.; VISALBERGHI, E.; FEDIGAN, L.M. **The complete capuchin**. 1ª ed. New York: Cambridge University Press, 345p. 2004.
- FRAGASZY, D.M.; IZAR, P.; LIU, Q.; ESHCHAR, Y.; YOUNG, L.A.; VISALBERGHI, E. Body Mass in Wild Bearded Capuchins, (*Sapajus libidinosus*): Ontogeny and Sexual Dimorphism. **American Journal of Primatology**, versão online. 2015.
- FREESE, C.H. & OPPENHEIMER, J.R. The capuchin monkeys, Genus *Cebus*. In: COIMBRA-FILHO, A.F. & MITTERMEIER, R.A. (Eds.). **Ecology and behavior of Neotropical Primates**, Volume 1. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro. 1981.
- FREITAS, C.H.; SETZ, E.Z.; ARAÚJO, A.R.B.; GOBBI, N. Agricultural crops in the diet of bearded capuchin monkeys, *Cebus libidinosus* Spix (Primates: Cebidae), in forest fragments in southeast Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 25(1): 32-39. 2008.
- FREITAS, L. & SEUÁNEZ, H. Chromosome heteromorphisms in *Cebus apella*. **Journal of Human Evolution**, 10(2): 173-180. 1982.
- GARBER, P.A.; GOMES, D.F.; BICCA-MARQUES, J.C. Experimental Field Study of Problem-Solving Using Tools in Free-Ranging Capuchins (*Sapajus nigritus*, formerly *Cebus nigritus*). **American Journal of Primatology**, 74(4): 344-358. 2012.
- GARCIA, M.; MIRÓ, R.; ESTOP, A.; PONSÀ, M.; EGOZCUE, J. Constitutive Heterochromatin Polymorphism in *Lagothrix lagothricha cana*, *Cebus apella*, and *Cebus capucinus*. **American Journal of Primatology**, 4(2): 117-126. 1983.
- GARCIA, F.; RUIZ-HERRERA, A.; EGOZCUE, J.; PONSÀ, M.; GARCIA, M. Chromosomal Homologies Between *Cebus* and *Ateles* (Primates) Based on ZOO-FISH and G-Banding Comparisons. **American Journal of Primatology**, 57(4): 177-188. 2002.
- GOÉS, M.H.B.; DA SILVA, J.X.; RODRIGUES, A.F.; CAVALCANTE, M.S.G.; RONCARATTI, H.; CRAVO, C.D.; MENEZES, L.F.T.; DOS ANJOS, L.H.C.; VALADARES, G.S.; PEREIRA, M.G. Modelo digital para a restinga e paleoilha da Marambaia, Rio de Janeiro. In: MENEZES, L.F.T; PEIXOTO, A.L.; ARAUJO, D.S.D. (Orgs.). **História Natural da Marambaia**. Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, p.15-38. 2005.
- GOMES, D.F. **Ecologia cognitiva e forrageio social em macacos-prego, *Cebus nigritus* (Goldfuss, 1809)**. (Dissertação de Mestrado). Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 2006.
- GONÇALVES, C.S. **Distribuição e conservação do macaco-prego (*Cebus nigritus* – Goldfuss 1809) e documentação do conhecimento ecológico local na região do Parque Estadual de Itapeva e arredores, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil**. (Dissertação de Mestrado). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006.
- GREWAL, S.I.S. & MOAZED, D. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. **Science**. 301(5634):798–802. 2003.
- GROVES, C.P. **Primate Taxonomy**. 1ª ed. Washington DC: **Smithsonian Institution Press**. 350p. 2001.

HERSHKOVITZ, P. **Mammals of northern Colombia**. Preliminary report no. 4: monkeys (Primates), with taxonomic revisions of some forms. Proceedings of the U.S. National Museum. Washington: Smithsonian Institution. 98:323–427. 1949.

HILL, W.C.H. **Comparative Anatomy and Taxonomy**. Volume 4. Cebidae. Edinburgh: University press, 523p. 1960.

HUNTINGTON, H.P. Observation on the utility of the semi-directive interview for documenting traditional ecological knowledge. **Arctic**, 51(3): 237-242. 1998.

IUGHETTI, C.G. **Evolução cromossômica: estudo da variabilidade cariotípica em Platyrrhini e das homeologias e sintenias com cromossomos humanos**. (Tese de Doutorado). São Paulo: Universidade de São Paulo. 2008.

IZAR, P. & FERREIRA, R.G. Socioecologia de macacos-prego (*Cebus* spp.) selvagens e provisionados: uma análise comparativa. In: Bicca-Marques (Ed.). **A Primatologia no Brasil**. Volume 10. Sociedade Brasileira de Primatologia, p.323-338. 2007.

JONES, C.B. Sampling Neotropical Primates: implications for conservation and socioecology. **Primate Report**, 61: 67-68. 2001.

KASAHARA, S. **Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados**. 1ª ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 160p. 2009.

KIERULFF, M.C.M.; MENDES, S.L.; RYLANDS, A.B. 2015. *Sapajus nigritus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: Disponível em: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Acesso em 12 de Novembro de 2015.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, 16(2):111-120. 1980.

KNEIP, L.M. & OLIVEIRA, N.V. Amoladores e polidores líticos fixos da Ilha da Marambaia. In: MENEZES, L.F.T; PEIXOTO, A.L.; ARAUJO, D.S.D. (Orgs.). **História Natural da Marambaia**. Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, p.15-38. 2005.

KOIFFMANN, C.P. & SALDANHA, P.H. Cytogenetics of Brazilian monkeys. **Journal of Human Evolution**, 3(4): 275-282. 1974.

LORETTO, D. & RAJÃO, H. Novos Registros de Primatas no Parque Nacional do Itatiaia, com Ênfase em *Brachyteles arachnoides* (Primates, Atelidae). **Neotropical Primates**, 13(2): 28-30. 2005.

LOURENÇO, E.C.; COSTA, L.M.; SILVA, R.M.; ESBÉRARD, C.E.L. Bat diversity of Ilha da Marambaia, Southern Rio de Janeiro State, Brazil (Chiroptera, Mammalia). **Brazilian Journal of Biology**, 70(3): 511-519. 2010.

LUDWIG, G.; AGUIAR, L.M.; ROCHA, V.J. Uma avaliação da dieta, da área de vida e das estimativas populacionais de *Cebus nigritus* (Goldfuss, 1809) em um fragmento florestal no norte do estado do Paraná. **Neotropical Primates**, 13(3): 12-18. 2005.

LYNCH ALFARO, J.W. Subgrouping Patterns in a Group of Wild *Cebus apella nigritus*. **International Journal Of Primatology**, 28(2): 271-289. 2007.

LYNCH ALFARO, J.W.; BOUBLI, J.P.; OLSON, L.E.; DI FIORE, A.; WILSON, B.; GUTIÉRREZ-ESPELETA, G.A.; CHIOU, K.L.; SCHULTE, M.; NEITZEI, S.; ROSS, V.;

- SCHWOCHOW, D.; NGUYEN, M.T.T.; FARIAS, I.; JANSON, C.H.; ALFARO, M.E. Explosive Pleistocene range expansion leads to widespread Amazonian sympatry between robust and gracile capuchin monkeys. **Journal of Biogeography**, 39(2): 272-288. 2012a.
- LYNCH ALFARO, J.W.; SILVA JR., J.S.; RYLANDS, A.B. How Different Are Robust and Gracile Capuchin Monkeys? An Argument for the Use of *Sapajus* and *Cebus*. **American Journal of Primatology**, 74(4):273-286. 2012b.
- LYNCH ALFARO, J.W.; IZAR, P.; FERREIRA, R.G. Capuchin Monkey Research Priorities and Urgent Issues. **American Journal of Primatology**, 76(8): 705-720. 2014.
- MARTINEZ, R.A.; GIUDICE, A.; SZAPKIEVICH, V.B.; ASCUNCE, M.; NIEVES, M.; ZUNINO, G.; MUDRY, M.D. Parameters modeling specio-genetic processes in *Cebus apella* (Primates: Platyrrhini) from Argentina, **Mastozoologia Neotropical**, 9(2): 171-186. 2002.
- MARTINS, W.P.; MIRANDA, J.M.D.; LYNCH ALFARO, J.W.; ALONSO, A.C.; LUDWIG, G.; MARTINS, J.N. Avaliação do risco de extinção de *Sapajus nigritus cucullatus* (Spix, 1823) no Brasil. **Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira**. ICMBio. 2015. Disponível em [www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade](http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade). Acesso em 04 de Janeiro de 2016.
- MARTINS-JR., A.M.G.; AMORIM, N.; CARNEIRO, J.C.; AFFONSO, P.R.A.M.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H. *Alu* Elements and the Phylogeny of Capuchin (*Cebus* and *Sapajus*) Monkeys. **American Journal of Primatology**, 77(4): 368-375. 2015.
- MATAYOSHI, T.; HOWLIN, E.; NASAZZI, N.; NAGLE, C.; GADOW, E.; SEUÁNEZ, H.N. Chromosome studies in *Cebus apella*: the standard karyotype of *Cebus apella paraguayanus* Fischer, 1829. **American Journal of Primatology**, 10(2): 185-193. 1986.
- MATAYOSHI, T.; SEUANEZ, H.N.; NASAZZI, N.; NAGLE, C.; ARMADA, J.L.A.; FREITAS, L.; ALVES, G.; BARROSO, C.M.; HOWLIN, E. Heterochromatic variation in *Cebus apella* (Cebidae: Platyrrhini) of different geographic regions. **Cytogenetics and Cell Genetics**, 44(2-3): 158-162. 1987.
- MIRANDA, C.L. **Desenvolvimento do dimorfismo sexual em espécies de macacos-prego, gênero *Cebus* Erxleben, 1777 (Primates, Cebidae)**. (Dissertação de Mestrado). Belém: Universidade Federal do Pará. 2008.
- MIRÓ, R.; CLEMENTE, I.C.; FUSTER, C.; EGOZCUE, J. Fragile sites, chromosome evolution, and human neoplasia. **Human Genetics**, 75(4): 345-349. 1987.
- MITTERMEIER, R.A.; RYLANDS, A.B.; WILSON, D.E. **Handbook of the Mammals of the World**. Volume 3. Primates. Barcelona: Lynx Edicions. 951p. 2013.
- MONTENEGRO, M.M.V. **Ecologia de *Cebus flavius* (Schreber, 1774) em remanescente de Mata Atlântica no estado da Paraíba**. (Tese de Doutorado). Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 2011.
- MOORHEAD, P.S.; NORWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental Cell Research**, 20(3): 613-615. 1960.
- MOREIRA, M.A.M. *SRY* evolution in Cebidae (Platyrrhini: Primates). **Journal of Molecular Evolution**, 55(1): 92-103. 2002.

- MUDRY DE PARGAMENT, M. & SLAVUTSKY, I.R. Banding patterns of the chromosomes of *Cebus apella*: comparative studies between specimens from Paraguay and Argentina. **Primates**, 28(1): 111-117. 1987.
- MUDRY, M.D. Cytogenetic variability within and across population of *Cebus apella* in Argentina. **Folia Primatologica**, 54(3): 206-216. 1990.
- MUDRY, M.; SLAVUTSKY, I.; ZUNINO, G.; DELPRAT, A.; BROWN, A. A new karyotype of *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini) from Argentina. **Revista Brasileira de Genética**, 14(3): 729-738. 1991.
- NASCIMENTO, F.F.; LAZAR, A.; SEUÁNEZ, H.N.; BONVICINO, C.R. Reanalysis of the biogeographical hypothesis of range expansion between robust and gracile capuchin monkeys. **Journal of Biogeography**, 42(7): 1349-1357. 2015.
- NIEVES, M.; MÜHLMANN, M.; MUDRY, M.D. Heterochromatin and chromosome evolution: a FISH probe of *Cebus apella paraguayanus* (Primate: Platyrrhini) developed by chromosome microdissection. **Genetics and Molecular Research**, 4(4):675-683. 2005a.
- NIEVES, M.; ASCUNCE, M.F.; RAHN, M.I.; MUDRY, M.D. Phylogenetic relationship among some *Ateles* species: the use of chromosomal and molecular characters. **Primates**, 46(3): 155-164. 2005b.
- NIEVES, M.; MENDEZ, G.; ORTIZ, A.; MÜHLMANN, M.; MUDRY, M.D. Karyological diagnosis of *Cebus* (Primates, Platyrrhini) in captivity: Detection of hybrids and management program applications. **Animal Reproduction Science**, 108(1-2): 66-78. 2008.
- NIEVES, M.; MÜHLMANN, M.; MUDRY, M.D. *Cebus paraguayanus* and *Cebus nigrurus* (Primates, Platyrrhini): A Comparative Genomic Hybridization Analysis. **Cytogenetic and Genome Research**, 128(4): 214-220. 2010.
- NIEVES, M.; DE OLIVEIRA, E.H.C.; AMARAL, P.J.S.; NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C.; MÜHLMANN, M.C.; MUDRY, M.D. Analysis of the heterochromatin of *Cebus* (Primates, Platyrrhini) by micro-FISH and banding pattern comparisons. **Journal of Genetics**, 90(1): 111-117. 2011.
- NÓBREGA, L.M. Marambaia: imaginário e história. **Revista Universidade Rural: Série Ciências Humanas**, 26(1-2): 115-123. 2004.
- OLIVEIRA, M.M. & LANGGUTH, A. 2006. Rediscovery of Marcgrave's Capuchin Monkey and Designation of a Neotype for *Simia flavia* Schreber, 1774 (Primates, Cebidae). **Boletim do Museu Nacional**, 523: 1-16. 2006.
- OPAZO, J.C.; WILDMAN, D.E.; PRYCHITKO, T.; JOHNSON, R.M.; GOODMAN, M. Phylogenetic relationships and divergence times among New World monkeys (Platyrrhini, Primates). **Molecular phylogenetics and Evolution**, 40(1): 274-280. 2006.
- PAULA, R.R.; PEREIRA, M.G.; MENEZES, L.F.T. Aporte de nutrientes e decomposição da serapilheira em três fragmentos florestais periodicamente inundados na Ilha da Marambaia, RJ. **Ciência Florestal**, 19(2): 139-148. 2009.
- PECON-SLATTERY, J. Recent advances in Primate phylogenomics. **Annual Review of Animal Biosciences**. 2: 41-63. 2014.
- PENEDO, D.M.; ARMADA, J.L.A.; DA SILVA, J.F.S.; NEVES, D.M.; PISSINATTI, A.; NOGUEIRA, D.M. C-banding patterns and phenotypic characteristics in individuals of

*Sapajus* (Primates: Platyrrhini) and its application to management in captivity. **Caryologia**, 67(4): 314-320. 2014.

PEREIRA, L.A.; XEREZ, R.; PEREIRA, A.J. Ilha da Marambaia (baía de Sepetiba, RJ): resumo fisiográfico, histórico e importância ecológica atual. **Revista da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, 42(5/6): 384-389. 1990.

PEREIRA, M.G.; MENEZES, L.F.T.; SCHULTZ, N. Aporte e decomposição de serapilheira na floresta atlântica, Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. **Ciência Florestal**, 18(4): 443-454. 2008.

PEREIRA, R.M.M. **O efeito do isolamento geográfico no tamanho de *Rhinella ornata* (Spix 1824) (Anura: Bufonidae) em ilhas continentais da Costa Verde do Rio de Janeiro**. (Dissertação de Mestrado). Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2010.

PEREIRA, A.C.R.; AZEVEDO, C.S.; MARTINS, W.P. Metodologia do censo com playback: teste de acuracidade do equipamento nos macacos-prego (*Cebus nigritus*) do Museu de História Natural e Jardim Botânico (MHNJB) da UFMG. **e-Scientia**, 3(1): 49-56. 2010.

PERELMAN, P.; JOHNSON, W.E.; ROOS, C.; SEUÁNEZ, H.N.; HORVATH, J.E.; MOREIRA, M.A.M.; KESSING, B.; PONTIUS, J.; ROELKE, M.; RUMPLER, Y.; SCHNEIDER, M.P.C.; SILVA, A.; O'BRIEN, S.J.; PECON-SLATTERY, J. A Molecular Phylogeny of Living Primates. **PLoS Genetics**, 7(3): 1-17. 2011.

PESSÔA, L.M.; TAVARES, W.C.; GONÇALVES, P.R. Mamíferos das restingas do macrocompartimento litorâneo da Bacia de Campos, Rio de Janeiro. In: PESSÔA, L.M.; TAVARES, W.C.; SICILIANO, S. (Eds.). **Mamíferos das restingas e manguezais do Brasil**, vol. 1. Sociedade Brasileira de Mastozoologia, Rio de Janeiro. p. 95-125. 2010.

PINTO, M.C.M. **Padrão comportamental de um grupo de macacos-prego (*Cebus apella cay* Illiger, 1815) no Parque Estadual Matas do Segredo, Campo Grande (MS)**. (Dissertação de Mestrado). Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. 2006.

PONSÀ, M.; GARCÍA, M.; BORELL, A.; GARCIA, F.; EGOZCUE, J.; GOROSTIAGA, M.A.; DELPRAT, A.; MUDRY, M. Heterochromatin and Cytogenetic Polymorphisms in *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini). **American Journal of Primatology**, 37(4): 325-331. 1995.

PRINTES, R.C.; LIESENFELD, M.V.A.; JERUSALINSKY, L. *Alouatta guariba clamitans* Cabrera, 1940: A new southern limit for the species and for Neotropical primates. **Neotropical Primates**. 9(3): 118-121. 2001.

RANGEL, C.H.; ADLER, J.G.V.; HELIODOR, G.C.; SANTOS JR., A.; VERONA, C.E. Relato de caso de morte por agressão entre macacos-prego *Sapajus nigritus* (Primates: Cebidae) no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Neotropical Primates**, 20(1): 48-52. 2013.

REIS, N.R.; PERACCHI, A.D.; BATISTA, C.B.; ROSA, G.L.M. **Primates do Brasil: guia de campo**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Technical Books, 328p. 2015.

RIBEIRO, D.C.A. **Estrutura e composição de epífitas vasculares em duas formações vegetais da Ilha da Marambaia - Mangaratiba, RJ**. (Dissertação de Mestrado). Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2009.

RÍMOLI, J.; STRIER, K.B.; FERRARI, S.F. Seasonal and longitudinal variation in the behavior of free-ranging black tufted capuchins *Cebus nigritus* (Goldfuss, 1809) in a fragment

- of Atlantic Forest in Southeastern Brazil. In: FERRARI, S.F. & RÍMOLI, J. (Eds.). **A Primatologia no Brasil**. Aracaju, Sociedade Brasileira de Primatologia, Biologia Geral e Experimental – UFS, p 130-146. 2008.
- RIO DE JANEIRO. Decreto nº 9.802, de 12 de Março de 1987. Cria a Área de Proteção Ambiental de Mangaratiba. **Diário Oficial** (do Rio de Janeiro), Rio de Janeiro, 12 mar. 1987.
- ROCHA, V.J. Macaco-prego, como controlar esta nova praga? **Floresta**. 30(1): 95-99. 2000.
- ROCHA-MENDES, F.; MIKICH, S.B.; BIANCONI, G.V.; PEDRO, W.A. Mamíferos do município de Fênix, Paraná, Brasil: etnozootologia e conservação. **Revista Brasileira de Zoologia**, 22(4): 991-1002. 2005.
- RONCARATI, H. & MENEZES, L.F.T. Marambaia, Rio de Janeiro: origem e evolução. In: MENEZES, L.F.T; PEIXOTO, A.L.; ARAUJO, D.S.D. (Orgs.). **História Natural da Marambaia**. Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, p.15-38. 2005.
- RUIZ-GARCÍA, M.; CASTILLO, M.I.; LEDEZMA, A.; LEGUIZAMON, N.; SÁNCHEZ, R.; CHINCHILLA, M.; GUTIERREZ-ESPELETA, G.A. Molecular systematics and phylogeography of *Cebus capucinus* (Cebidae, Primates) in Colombia and Costa Rica by means of mitochondrial COII gene. **American Journal of Primatology**, 74(4): 366–380. 2012b.
- RUIZ-GARCÍA, M.; CASTILLO, M.I.; LICHILÍN-ORTIZ, N.; PINEDO-CASTRO, M. Molecular relationship and classification of several tufted capuchin lineages (*Cebus apella*, *Cebus xanthosternos* and *Cebus nigritus*, Cebidae), by means of mitochondrial cytochrome oxidase II gene sequences. **Folia Primatologica**, 83(2):100-125. 2012a.
- RUIZ-GARCÍA, M.; CASTILLO, M.I.; VÁSQUEZ, C.; RODRIGUEZ, K.; PINEDO-CASTRO, M.; SHOSTELL, J.; LEGUIZAMON, N. Molecular phylogenetics and phylogeography of the white-fronted capuchin (*Cebus albifrons*; Cebidae, Primates) by means of mtCOII gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 57(3): 1049-1061. 2010.
- RUIZ-HERRERA, A.; GARCÍA, F.; AGUILERA, M.; GARCIA, M.; PONSÀ, M. New polymorphisms in a *Cebus* (Platyrrhini, Primates) species. The case of *Cebus nigrivittatus*. **Caryologia**, 57(2):206-209. 2004.
- RUVOLO, M.; DISOTELL, T.R.; ALLARD, M.W.; BRONW, W.M.; HONEYCUTT, R.L. Resolution of the African hominoid trichotomy by use of a mitochondrial gene sequence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 88(4): 1570-1574. 1991.
- RYLANDS, A.B.; MITTERMEIER, R.A.; BEZERRA, B.M.; PAIM, F.P.; QUEIROZ, H.L. Species accounts of Cebidae. In: Mittermeier, R.A.; Rylands, A.B.; Wilson, D.E., editors. **Handbook of the mammals of the world**. Volume 3. Primates. Barcelona: Lynx Edicions. p 390–413. 2013.
- SAITOU, N. & NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, 4(4):406-425. 1987.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2ª ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press – CHS.

- SANTANA, B.E.M.M.; PRADO, M.R.; LESSA, G.; ROCHA, E.C.; MELO, F.R. Densidade, tamanho populacional e abundância dos primatas em um fragmento de Floresta Atlântica em Minas Gerais, Brasil. **Revista Árvore**, 32(6): 1109-1117. 2008.
- SÃO BERNARDO, C.S. & GALETTI, M. Densidade e tamanho populacional de primatas em um fragmento florestal no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 21(4): 827-832. 2004.
- SCHNEIDER, H.; CANAVEZ, F.C.; SAMPAIO, I.; MOREIRA, M.A.M.; TAGLIARO, C.H.; SEUÁNEZ, H.N. Can molecular data place each neotropical monkey in its own branch? **Chromosoma**, 109(8): 515-523. 2001.
- SCHNEIDER, H. & SAMPAIO, I. The systematics and evolution of New World primates – A review. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, versão online. 2013.
- SCHRAGO, C.G. & RUSSO, C.A. Timing the origin of New World monkeys. **Molecular Biology and Evolution**, 20(10): 1620–1625. 2003.
- SEABRIGHT, M. A rapid technique for human chromosomes. **Lancet**, 298(7731): 971-972. 1971.
- SEUÁNEZ, H.N.; ARMADA, J.L.; FREITAS, L.; SILVA, R.R.; PISSINATTI, A.; COIMBRA-FILHO, A. Intraspecific Chromosome Variation in *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini): The Chromosomes of the Yellow Breasted Capuchin *Cebus apella xanthosternos* Wied, 1820. **American Journal of Primatology**, 10(3): 237-247. 1986.
- SEUÁNEZ, H.N.; BONVICIO, C.R.; MOREIRA, M.A.M. The primates of the Neotropics: genomes and chromosomes. **Cytogenet Genome Research**, 108(1-3): 38-46. 2005.
- SILVA JR., J.S. **Especiação nos macacos-prego e caiararas, gênero *Cebus* Erxleben, 1777 (Primates, Cebidae)**. (Tese de Doutorado). Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2001.
- SILVEIRA, G.; MALTA, A.J.R.; PONTES, A.R.M. Gênero *Cebus* Erxleben 1777. In: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; ANDRADE, F.R. **Primates Brasileiros**. 1ª ed. Londrina: Technical Books, 260p. 2008.
- STEINBERG, E.R.; NIEVES, M.; FANTINI, L.; MUDRY, M.D. Primates karyological diagnosis and management programs applications. **Journal of Medical Primatology**, 43(6): 455-467. 2014.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, 75(1): 304-6. 1972.
- TAMURA, K. & NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, 10(3):512-526. 1993.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, 30(12): 2725-2729. 2013.
- TOKUDA, M. **Dispersão e estrutura social de macacos-prego (*Sapajus nigritus*) do Parque Estadual Carlos Botelho, São Paulo**. (Tese de Doutorado). São Paulo: Universidade de São Paulo. 2012.

VALENÇA-MONTENEGRO, M.M.; SILVA, T.C.F.; LUCAS, J.L.B.; WAGNER, P.G.C.; FERREIRA, J.G.; FERREIRA, D.R.A.; JERUSALINSKY, L.; MARTINS, A.B.; SENNA, M.B.; LAROQUE, P.O. **Morfometria de *Cebus libidinosus* Spix, 1823 (Primates, Cebidae)**. In: Anais do I Seminário de Pesquisa e Iniciação Científica do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Brasília, p. 24. 2009a.

VALENÇA-MONTENEGRO, M.M.; SILVA, T.C.F.; LUCAS, J.L.B.; WAGNER, P.G.C.; FERREIRA, J.G.; FERREIRA, D.R.A.; JERUSALINSKY, L.; MARTINS, A.B.; SENNA, M.B.; LAROQUE, P.O. **Análise Morfométrica das Espécies Ameaçadas de Macacos-Prego (*Cebus erxleben*, 1777) do Nordeste Brasileiro**. In: Anais do I Seminário de Pesquisa e Iniciação Científica do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Brasília, p. 13. 2009b.

VAZ, S.M. Novos Registros de Primatas no Parque Nacional do Itatiaia, com Ênfase em *Brachyteles arachnoides* (Primates, Atelidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, 22(4): 1164-1169. 2005.

VIEIRA, A.G. & OLIVEIRA, L.W. Levantamento dos fenótipos de *Sapajus nigritus* (Goldfuss, 1809) no Parque Ecológico da Cidade da Criança de Presidente Prudente - SP. **Agrarian Academy**. 1(2): 72-91. 2014.

VILANOVA, R.; SILVA JR., J.S.; GRELE, C.E.V.; MARROIG, G.; CERQUEIRA, R. Limites climáticos e vegetacionais das distribuições de *Cebus nigritus* e *Cebus robustus* (Cebinae, Platyrrhini). **Neotropical Primates**, 13(1): 14-19. 2005.

## ANEXOS

### Anexo I - Questionário utilizado com os moradores da Ilha da Marambaia

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

### QUESTIONÁRIO

**Morador:** \_\_\_\_\_ **Idade:** \_\_\_\_\_

**Tempo que mora na Ilha:** R.: \_\_\_\_\_ anos.

**Família já morava na Ilha?** ( ) SIM / ( ) NÃO

**Há quanto tempo a família está na Ilha?** R.: \_\_\_\_\_ anos.

**Já viu macaco na Ilha?** ( ) SIM / ( ) NÃO

**Qual tipo de macaco já viu?** [Fotografias] (A) (B) (C) (D)

**Onde viu?** R.: \_\_\_\_\_

**Desde quando vê esse tipo de macaco na Ilha?**

R.: \_\_\_\_\_

**Os moradores mais antigos já falavam dos macacos na Ilha? Quem?**

R.: \_\_\_\_\_

**Em qual período do ano aparecem mais?** R.: \_\_\_\_\_

**Qual parte do dia aparecem?** R.: \_\_\_\_\_

**Geralmente, quantos macacos aparecem por vez?** R.: \_\_\_\_\_

**Já viu algum pesquisador estudando os macacos da Ilha?** ( ) SIM / ( ) NÃO

[Caso "SIM"] sabe quem foi? R.: \_\_\_\_\_

**Sabe de alguma soltura de macacos que possa ter ocorrido na Marambaia?**

R.: \_\_\_\_\_

**Qual sua opinião sobre a presença dos macacos na ilha?**

R.: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Anexo II - Imagens de primatas mostradas aos moradores da Ilha da Marambaia e militares do exército na Restinga da Marambaia**



A – OBTIDO EM: [http://ameacafebreamarela.files.wordpress.com/2009/04/bugio\\_ruivo\\_macho\\_pag.jpg](http://ameacafebreamarela.files.wordpress.com/2009/04/bugio_ruivo_macho_pag.jpg)

B – OBTIDO EM: <http://www.uniprot.org/taxonomy/9483>

C - OBTIDO EM: <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/estado-de-conservacao/7275-mamiferos-sapajus-nigritus-cucullatus-macaco-prego.html>

D – OBTIDO EM: <http://metazoa.us/sapajus/>

Obs.: as fotos originais, mostradas aos moradores e militares, encontravam-se na versão em cores.

**Anexo III - Questionário utilizado com os militares da Restinga da Marambaia**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**QUESTIONÁRIO**

**Militar:** \_\_\_\_\_

**Tempo que trabalha na Restinga da Marambaia:**

R.: \_\_\_\_\_ anos.

**Faz incursões na mata?**

( ) SIM / ( ) NÃO

*[Caso "Sim"]* Desde quando?

R.: \_\_\_\_\_.

*[Caso resposta positiva]*

**Até que parte da Restinga vai o seu trabalho?**

R.: \_\_\_\_\_

**Já viu macaco na Restinga?**

( ) SIM / ( ) NÃO

*[Caso resposta positiva]* Qual destes? *[Fotos]*

(A) (B) (C) (D) [ANEXO II]

**Onde viu ou vê esses macacos?**

R.: \_\_\_\_\_

**Com que frequência?**

R.: \_\_\_\_\_

**Desde quando vê?**

R.: \_\_\_\_\_

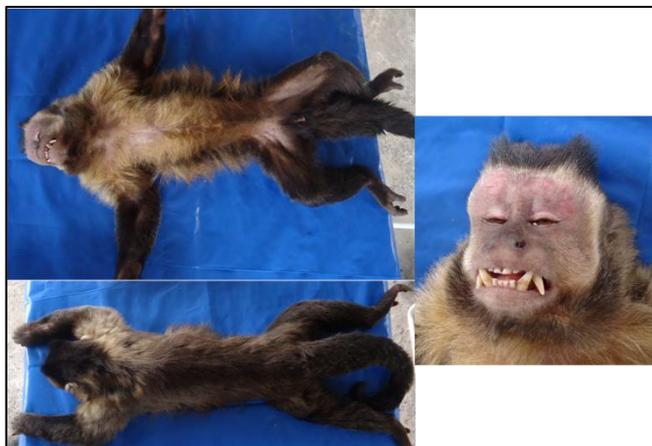
**Em média, qual o tamanho dos grupos?**

R.: \_\_\_\_\_

**Anexo IV - Padrão de pelagem dos 12 indivíduos de macaco-prego da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, Rio de Janeiro.**

01. Grupo de adultos com pelagem mais clara (cinco indivíduos: três machos e duas fêmeas).

**Macho 1**



**Macho 2**



**Macho 3**



**Anexo IV - continuação**

**Fêmea 1**



**Fêmea 2**



02. Grupo de jovens, com pelagem mais clara (três machos e duas fêmeas).

**Macho 4**

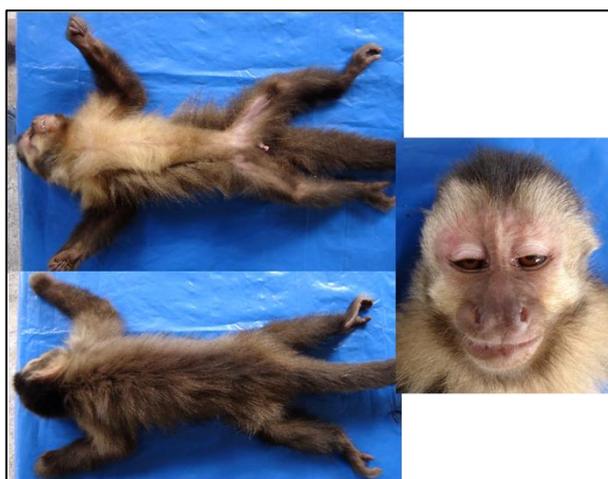


**Anexo IV - continuação**

**Macho 5**



**Macho 6**



**Fêmea 3**



**Anexo IV - continuação**

**Fêmea 4**



03. Grupo de adultos com pelagem mais escura (dois machos).

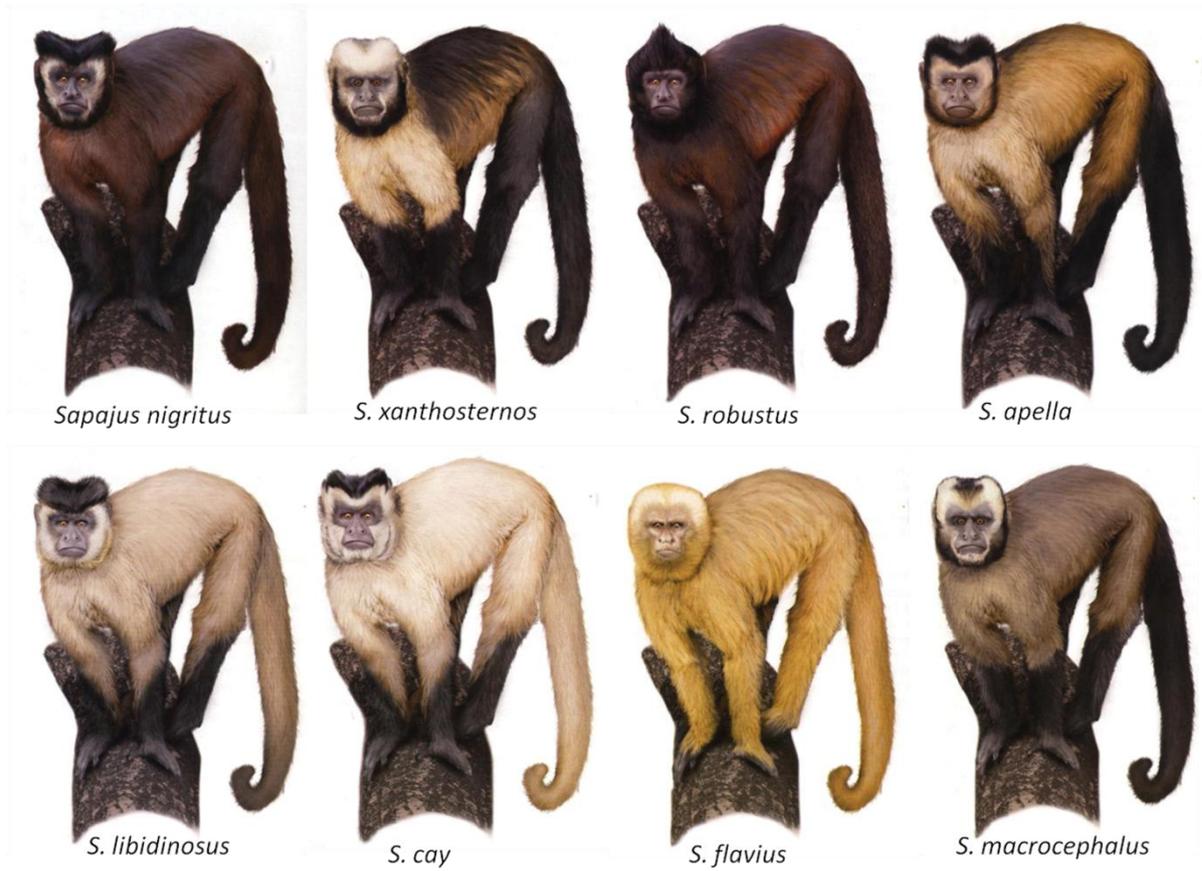
**Macho 7**



**Macho 8**



Anexo V - Ilustrações das espécies de *Sapajus* para comparação com o fenótipo encontrado para os indivíduos de macaco-prego da Ilha da Marambaia, Mangaratiba, Rio de Janeiro. Retiradas de Reis *et al.* (2015).



## Anexo VI - Sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II obtidas da literatura e utilizadas para comparação

### **S. nigritus\_01 (Cedido por Ruiz-Garcia)**

ACGACCACACGCTTATAATTATTTTCCTAATTAGTTCATTAGTCCTATACATTATCTCTTTAATGCTT  
ACTACAAAATAACCCACACCAGCACTATAAATGCCCAAGAAATCGAAATAATCTGAACTATTCTA  
CCCGCCATTATTCTTATTATAAATTGCCCTTCCATCCCTGCGCATTTTATATATAACAGATGAATTCAA  
TAAACCCTACTTTACCCTTAAAGCAATTGGCCACCAATGATATTGAAGCTATGAATACTCGGACTA  
TGAAGGCCTAATCTTTGAGTCCTACATTATACCAACATACTATCTCCAACCAGGCGAATTCCGACTT  
CTTGAAGTAGATAATCGAACAACTTACCAATAGAAGCAGACATCCGTATACTAATCACATCACAA  
GATGTACTACACTCATGAGCCGTCCCATCATTGGGCGTTAAAGCAGATGCAATCCCAGGCCGATTA  
AATCAAGCTATACTCACCTCAATACGACCAGGACTATTTTATGGCCAATGCTCGGAAATTTGCGGG  
TCAAACCATAGCTTTATACCTATTGTCCTAGAGTTTATCTACTTCCAAGATTTTGAA

### **S. nigritus\_02 (Cedido por Ruiz-Garcia)**

ACGACCACACGCTTATAATTATTTTCCTAATTAGTTCATTAGTCCTATACATTATCTCTTTAATGCTT  
ACTACAAAATAACCCACACCAGCACTATAAATGCCCAAGAAATCGAAACCATCTGAACTATTCTA  
CCCGCCATTATTCTTATTATAAATTGCCCTTCCATCCCTGCGCATTTTATATATAACAGATGAATTCAA  
TAAACCCTACTTTACCCTAAAAGCAATTGGCCACCAATGGTATTGAAGCTATGAATACTCGGACTA  
TGAAGGCCTAATCTTTGAGTCCTACATTATACCAACATACTATCTCCAACCAGGCGAATTCCGACTT  
CTTGAAGTAGATAATCGAACAACTTACCAATAGAAGCAGACATCCGTATACTAATCACATCACAA  
GATGTACTACACTCATGAGCCGTCCCATCACTGGGCGTTAAAGCAGATGCAATCCCAGGCCGATTA  
AATCAAGCTATACTAGCCTCAATACGACCAGGACTATTTTATGGACAATGCTCGGAAATTTGCGGG  
TCAAATCATAGCTTTATACCTATTGTCCTAGAGTTTATCTACTTCCAAGATCTTGAA

### **S. nigritus\_03 (GenBank: AF181088)**

ATGGCACACCCAGCTCAACTAGGCCTACAAAACGCTACATCCCCATTATAGAAGAATAATTGCC  
TTCCACGACCACACGCTTATAATTATTTTCCTAATTAGTTCATTAGTCCTATACATTATCTCTTTAAT  
GCTTACTACAAAATAACCCACACCAGCACTATAAATGCCCAAGAAATCGAAACCATCTGAACTAT  
TCTACCCGCCATTATTCTTATTATAAATTGCCCTTCCATCCCTGCGCATTTTATATATAACAGATGAAT  
TCAATAAACCCCTACTTTACCCTAAAAGCAATTGGCCACCAATGGTATTGAAGCTATGAATACTCGG  
ACTATGAAGGCCTAATCTTTGAGTCCTACATTATACCAACATACTATCTCCAACCAGGCGAATTCCG  
ACTTCTTGAAGTAGATAATCGAACAACTTACCAATAGAAGCAGACATCCGTATACTAATCACATC  
ACAAGATGTACTACACTCATGAGCCGTCCCATCACTGGGCGTTAAAGCAGATGCAATCCCAGGCCG  
ATTAATCAAGCTATACTAGCCTCAATACGACCAGGACTATTTTATGGACAATGCTCGGAAATTTG  
CGGGTCAAATCATAGCTTTATACCTATTGTCCTAGAGTTTATCTACTTCCAAGATCTTGAAGTATGG  
GCCTCATACTTATATATTGTACTACTGTAA

### **S. xanthosternos (Cedido por Ruiz-Garcia)**

ATGACCACACGCTTATAATTATTTTCCTAATTAGTTCATTAGTTCCTATACATTATCTCTTTAATGCTT  
ACTACAAAATAACCCATACCAGCACTATAAATGCCCAAGAAATCGAAATAATCTGAACTATTCTG  
CCCGCAATTATTCTTATTATAAATTGCCCTTCCATCCCTGCGCATTTTATATATAACAGATGAATTCA  
ATAAACCCCTACTTAAACCCTTAAAGCAATTGGCCACCAATGATATTGAAGCTATGAATACTCAGACT  
ATGAAGACCTATTCTTTGACTCTTATATTATACCAACCTACTACCTCCAACCAGGCGAATTCCGACT  
TCTTGAAGTAGATAATCGAACAACTTTACCAATAGAAGCAGACATCCGTATACTAATCTCATCACAA  
AGATGTACTACACTCATGAACCGTCCCATCATTAGGTGTTAAAGCAGATGCAATCCCAGGCCGATT  
AAACCAAGCCATACTAGCCTCAATACGACCAGGGTTATTTTACGGACAATGCTCAGAAATTTGCGGG  
GTCAAACCATAGCTTTATACCTATTGTCCTAGAAATTTATCTATTTCCAAGATTTTGAA

## Anexo VI - Continuação

### **S. cay\_Brasil (Cedido por Ruiz-Garcia)**

ACGACCACACGCTTATAATTATTTTCCTAATTAGTTCATTAGTCCTATACATTATCTCTTTAATGCTT  
ACTACAAAATAACCCACACCAGCACTATAAATGCCAAGAAATCGAAATAATCTGAACTATTCTA  
CCCGCAATTATTCTTATTATAATTGCCCTTCCATCCCTGCGCATTATATATAACAGATGAATTCA  
ATAAACCTACTTAACCCTAAAAGCAATTGGCCACCAATGATATTGAAGCTATGAATACTCGGACT  
ATGAAGACCTATTCTTTGACTCTTACATTATACCAACCTACTATCTCCAACCAGGCGAATTCCGACT  
TCTTGAAGTAGATAATCGAACAACCTTACCAATAGAAGCAGACATCCGTATACTAATCTCATCACA  
AGATGTACTACACTCATGAGCCGTCCCATCATTAGGCGTTAAAGCAGATGCAATCCCAGGCCGATT  
AAACCAAGCCATACTAGCCTCAATACGACCAGGGTATTTTACGGACAATGCTCGGAAATTTGCGG  
GTCAAACCATAGCTTTATACCCATTGTCCTAGAGTTTATCTACTTCCAAGATTTTGAA

### **S. cay\_Paraguai\_01 (Cedido por Ruiz-Garcia)**

ACGACCACACGCTTATAATTATTTTCCTAATTAGTTCATTAGTCCTATACATTATCTCTTTAATGCTT  
ACTACAAAATAACCCACACCAGCACTATAAATGCCAAGAAATCGAAATAATCTGAACTATTCTA  
CCCGCAATTATTCTTATTATAATTGCCCTTCCATCCCTGCGCATTATATATAACAGATGAATTCA  
ATAAACCTACTTAACCCTAAAAGCAATTGGCCACCAATGATATTGAAGCTATGAATACTCGGACT  
ATGAAGACCTATTCTTTGACTCTTACATTATACCAACCTACTATCTCCAACCAGGCGAATTCCGACT  
TCTTGAAGTAGATAATCGAACAACCTTACCAATAGAAGCAGACATCCGTATACTAATCTCATCACA  
AGATGTACTACACTCATGAGCCGTCCCATCATTAGGCGTTAAAGCAGATGCAATCCCAGGCCGATT  
AAACCAAGCCATACTAGCCTCAATACGACCAGGGTATTTTACGGACAATGCTCGGAAATTTGCGG  
GTCAAACCATAGCTTTATACCCATTGTCCTAGAGTTTATCTACTTCCAAGATTTTGAA

### **S. cay\_Paraguai\_02 (GenBank: AF181089)**

ATGGCACACCCAGCTCAACTAGGCCAACAAAACGCTACATCCCCATTATAGAAGAATAATTGCC  
TTCCACGACCACACGCTTATAATTATTTTCCTAATTAGTTCATTAGTCCTATACATTATCTCTTTAAT  
GCTTACTACAAAATAACCCACACCAGCACTATAAATGCCAAGAAATCGAAATAATCTGAACTAT  
TCTACCCGCCATTATTCTTATTATAATTGCCCTTCCATCCCTGCGCATTATATATAACAGATGAAT  
TCAATAAACCTACTTTACCCTTAAAGCAATTGGCCACCAATGATATTGAAGCTATGAATACTCGG  
ACTATGAAGGCCTAATCTTTGAGTCCTACATTATACCAACATACTATCTCCAACCAGGCGAATTCCG  
ACTTCTTGAAGTAGATAATCGAACAACCTTACCAATAGAAGCAGACATCCGTATACTAATCACATC  
ACAAGATGTACTACACTCATGAGCCGTCCCATCATTGGGCGTTAAAGCAGATGCAATCCCAGGCCG  
ATTAATCAAGCTATACTCACCTCAATACGACCAGGACTATTTTATGGCCAATGCTCGGAAATTTG  
CGGGTCAAACCATAGCTTTATACCTATTGTCCTAGAGTTTATCTACTTCCAAGATTTTGAAGTATGG  
GCCTCATACTTATACATTGTATCACTGTAA

## Anexo VII - Sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II obtidas no presente estudo

### Sequência\_01

TGGCACACCAGCTCAACTAGGCCTACAAAACGCTACATCCCCATTATAGAAGAACTAATTACCTT  
TCACGACCATAACGCTCATAATTATTTTCCTAATTAGTTCATTAGTCCTATACATCATCTCTTTAATGC  
TTACTACAAAACCTAACCATAACCAGCACTATAAATGCCCAAGAAATCGAAATAATCTGAACTATT  
TACCCGCAATTATTCTTATTATAATTGCCCTTCCATCCCTGCGCATTTTATATATAACAGATGAATTC  
AATAAACCATACTTAACCCTTAAAGCAATTGGTCCACCAATGATATTGAAGCTATGAGTACTCGGAC  
TATGAAGACCTATTCTTTGACTCTTACATTATACCAACCTACTACCTCCAACCAGGCGAATTCCGAC  
TTCTTGAAGTAGATAATCGAACAACTTACCAATAGAAGCAGACATCCGTATACTAATCTCATCAC  
AAGATGTACTACATTCATGAGCCGTCCCATCATTAGGCGTTAAAGCAGATGCAATCCCGGGCCGAT  
TAAACCAAGCCATACTAGCCTCAATACGACCAGGGTTATTTTACGGACAATGCTCAGAAATTTGCG  
GGTCAAACCATAGCTTTATACCTATTGTTCTAGAATTTATCTACTTCCAAGATTTTGAAGTATGAGC  
TTCATACTTATACATTGTATCACTGTAA

### Sequência\_02

CAAAAACGCTACATCCCCATTATAGAAGAACTAATTACCTTTCACGACCATAACGCTCATAATTATTT  
TCCTAATTAGTTCATTAGTCCTATACATCATCTCTTTAATGCTTACTACAAAACCTAACCATAACCAG  
CACTATAAATGCCCAAGAAATCGAAATAATCTGAACTATTCTACCCGCAATTATTCTTATTATAAATT  
GCCCTTCCATCCCTGCGCATTTTATATATAACAGATGAATTCATAAACCATACTTAACCCTTAAAG  
CAATTGGTCCACCAATGATATTGAAGCTATGAGTACTCGGACTATGAAGACCTATTCTTTGACTCTTA  
CATTATACCAACCTACTACCTCCAACCAGGCGAATTCCGACTTCTTGAAGTAGATAATCGAACAAAC  
CTTACCAATAGAAGCAGACATCCGTATACTAATCTCATCACAAGATGTACTACATTCATGAGCCGT  
CCCATCATTAGGCGTTAAAGCAGATGCAATCCCGGGCCGATTAAACCAAGCCATACTAGCCTCAAT  
ACGACCAGGGTTATTTTACGGACAATGCTCAGAAATTTGCGGGTCAAACCATAGCTTTATACCTAT  
TGTTCTAGAATTTATCTACTTCCAAGATTTTGAAGTATGAGCTTCATACTTATACATTGTATCACTGT  
AA

### Sequência\_03

TGGCAACACCAGCTCAACTAGGCCTACAAAACGCTACATCCCCATTATAGAAGAACTAATTACCT  
TTCACGACCATAACGCTCATAATTATTTTCCTAATTAGTTCATTAGTCCTATACATCATCTCTTTAATG  
CTTACTACAAAACCTAACCATAACCAGCACTATAAATGCCCAAGAAATCGAAATAATCTGAACTATT  
CTACCCGCAATTATTCTTATTATAAATTGCCCTTCCATCCCTGCGCATTTTATATATAACAGATGAATT  
CAATAAACCATACTTAACCCTTAAAGCAATTGGTCCACCAATGATATTGAAGCTATGAGTACTCGGA  
CTATGAAGACCTATTCTTTGACTCTTACATTATACCAACCTACTACCTCCAACCAGGCGAATTCCGA  
CTTCTTGAAGTAGATAATCGAACAACTTACCAATAGAAGCAGACATCCGTATACTAATCTCATCA  
CAAGATGTACTACATTCATGAGCCGTCCCATCATTAGGCGTTAAAGCAGATGCAATCCCGGGCCGA  
TTAAACCAAGCCATACTAGCCTCAATACGACCAGGGTTATTTTACGGACAATGCTCAGAAATTTGC  
GGTCAAACCATAGCTTTATACCTATTGTTCTAGAATTTATCTACTTCCAAGATTTTGAAGTATGAG  
CTTCATACTTATACATTGTATCACTGTAA

### Sequência\_04

TGGCAACACCAGCTCAACTAGGCCTACAAAACGCTACATCCCCATTATAGAAGAACTAATTACCT  
TTCACGACCATAACGCTCATAATTATTTTCCTAATTAGTTCATTAGTCCTATACATCATCTCTTTAATG  
CTTACTACAAAACCTAACCATAACCAGCACTATAAATGCCCAAGAAATCGAAATAATCTGAACTATT  
CTACCCGCAATTATTCTTATTATAAATTGCCCTTCCATCCCTGCGCATTTTATATATAACAGATGAATT  
CAATAAACCATACTTAACCCTTAAAGCAATTGGTCCACCAATGATATTGAAGCTATGAGTACTCGGA  
CTATGAAGACCTATTCTTTGACTCTTACATTATACCAACCTACTACCTCCAACCAGGCGAATTCCGA  
CTTCTTGAAGTAGATAATCGAACAACTTACCAATAGAAGCAGACATCCGTATACTAATCTCATCA  
CAAGATGTACTACATTCATGAGCCGTCCCATCATTAGGCGTTAAAGCAGATGCAATCCCGGGCCGAT  
TAAACCAAGCCATACTAGCCTCAATACGACCAGGGTTATTTTACGGACAATGCTCAGAAATTTGCG  
GGTCAAACCATAGCTTTATACCTATTGTTCTAGAATTTATCTACTTCCAAGATTTTGAAGTATGAGC  
TTCATACTTATACATTGTATCACTGTAA

## Anexo VII - Continuação

### Sequência\_05

TGGCACACCAGCTCAACTAGGCCTACAAAACGCTACATCCCCATTATAGAAGAACTAATTACCTT  
TCACGACCATACGCTCATAATTATTTTCCTAATTAGTTCATTAGTCCTATACATCATCTCTTTAATGC  
TTACTACAAAATAACCCATACCAGCACTATAAATGCCCAAGAAATCGAAATAATCTGAACTATTC  
TACCCGCAATTATTCTTATTATAATTGCCCTTCCATCCCTGCGCATTATATATAACAGATGAATTC  
AATAAACCATACTTAACCCTTAAAGCAATTGGTCACCAATGATATTGAAGCTATGAGTACTCGGAC  
TATGAAGACCTATTCTTTGACTCTTACATTATACCAACCTACTACCTCCAACCAGGCGAATTCCGAC  
TTCTTGAAGTAGATAATCGAACAACTTACCAATAGAAGCAGACATCCGTATACTAATCTCATCAC  
AAGATGTACTACATTCATGAGCCGTCCCATCATTAGGCGTTAAAGCAGATGCAATCCCGGGCCGAT  
TAAACCAAGCCATACTAGCCTCAATACGACCAGGGTTATTTTACGGACAATGCTCAGAAATTTGCG  
GGTCAAACCATAGCTTTATACCTATTGTTCTAGAATTTATCTACTTCCAAGATTTTGAAGTATGAGC  
TTCATACTTATACATTGTATCACTGTAA

### Sequência\_06

ATAGAAGAACTAATTACCTTTACGACCATACGCTCATAAATTATTTTCCTAATTAGTTCATTAGTCC  
TATACATCATCTCTTTAATGCTTACTACAAAATAACCCATACCAGCACTATAAATGCCCAAGAAA  
TAGAAATAATCTGAACTATTCTACCCGCAATTATTCTTATTATAAATTGCCCTTCCATCCCTGCGCATT  
TTATATATAACAGATGAATTCAATAAACCATACTTAACCCTTAAAGCAATTGGTCACCAATGATAT  
TGAAGCTATGAGTACTCGGACTATGAAGACCTATTCTTTGACTCTTACATTATACCAACCTACTACC  
TCCAACCAGGCGAATTCCGACTTCTTGAAGTAGATAATCGAACAACTTACCAATAGAAGCAGACA  
TCCGTATACTAATCTCATCACAAAGATGTACTACATTCATGAGCCGTCCCATCATTAGGCGTTAAAGC  
AGATGCAATCCCGGGCCGATTAACCAAGCCATACTAGCCTCAATACGACCAGGGTTATTTTACGG  
ACAATGCTCAGAAATTTGCGGGTCAAACCATAGCTTTATACCTATTGTTCTAGAATTTATCTACTTC  
CAAGATTTTGAAGTATGAGCTTCATACTTATACATTGTATCACTGTAA

### Sequência\_07

ATGCTTACTACAAAATAACCCATACCAGCACTATAAATGCCCAAGAAATCGAAATAATCTGAACT  
ATTCTACCCGCAATTATTCTTATTATAATTGCCCTTCCATCCCTGCGCATTATATATAACAGATGA  
ATTCAATAAACCATACTTAACCCTTAAAGCAATTGGTCACCAATGATATTGAAGCTATGAGTACTC  
GGACTATGAAGACCTATTCTTTGACTCTTACATTATACCAACCTACTACCTCCAACCAGGCGAATTC  
CGACTTCTTGAAGTAGATAATCGAACAACTTACCAATAGAAGCAGACATCCGTATACTAATCTCA  
TCACAAGATGTACTACATTCATGAGCCGTCCCATCATTAGGCGTTAAAGCAGATGCAATCCCGGGC  
CGATTAACCAAGCCATACTAGCCTCAATACGACCAGGGTTATTTTACGGACAATGCTCAGAAATT  
TGCGGGTCAAACCATAGCTTTATACCTATTGTTCTAGAATTTATCTACTTCCAAGATTTTGAAGTA  
TGAGCTTCATACTTATACATTGTATCACTGT

### Sequência\_08

TTAATGCTTACTACAAAATAACCCATACCAGCACTATAAATGCCCAAGAAATCGAAATAATCTGA  
ACTATTCTACCCGCAATTATTCTTATTATAAATTGCCCTTCCATCCCTGCGCATTATATATAACAGA  
TGAATTCAATAAACCATACTTAACCCTTAAAGCAATTGGTCACCAATGATATTGAAGCTATGAGTA  
CTCGGACTATGAAGACCTATTCTTTGACTCTTACATTATACCAACCTACTACCTCCAACCAGGCGAA  
TTCCGACTTCTTGAAGTAGATAATCGAACAACTTACCAATAGAAGCAGACATCCGTATACTAATC  
TCATCACAAAGATGTACTACATTCATGAGCCGTCCCATCATTAGGCGTTAAAGCAGATGCAATCCCG  
GGCCGATTAACCAAGCCATACTAGCCTCAATACGACCAGGGTTATTTTACGGACAATGCTCAGAA  
ATTTGCGGGTCAAACCATAGCTTTATACCTATTGTTCTAGAATTTATCTACTTCCAAGATTTTGAAG  
TATGAGCTTCATACTTATACATT

