

# Confirmação da ocorrência de primatas não-humanos no Arquipélago dos Bijagós com base em técnicas de identificação molecular

Ivo Colmonero-Costeira<sup>1,2</sup>, Tânia Minhós<sup>3,4,5</sup>, Baba Djaló<sup>6</sup>,  
Nelson Fernandes<sup>7</sup>, & Maria Joana Ferreira da Silva<sup>2,8,9</sup>

## Resumo

Estimar a área de ocorrência geográfica de primatas não-humanos é fulcral para a sua conservação. O uso de técnicas não-invasivas de identificação molecular permite confirmar a presença de espécies de difícil observação direta e/ou raras. O macaco verde (*Chlorocebus sabaues*), o macaco mona (*Cercopithecus campbelli*) e o macaco petaurista (*Cercopithecus petaurista buettikoferi*) são espécies de primatas que ocorrem no Arquipélago dos Bijagós. Os últimos censos dos primatas dos Bijagós datam da década de 90. Realizámos um estudo genético, baseado num fragmento do *D-loop* do DNA mitocondrial, em sete ilhas, com o objetivo de estimar a sua ocorrência geográfica. Os resultados, baseados na análise de 51 sequências de DNA mitocondrial, confirmam a presença das espécies em seis das sete ilhas amostradas. Este estudo evidencia a utilidade das técnicas de identificação molecular na confirmação da presença dos primatas dos Bijagós, o que poderá contribuir para a sua conservação.

**Palavras-chave** conservação; genética não-invasiva; *DNA barcoding*; DNA mitocondrial; populações insulares; Cercopithecinae.

Manuscrito submetido a 30 de julho de 2018  
Aceite a 20 de maio de 2019



Política de Privacidade  
CC-BY-NC | Open Access  
Creative Commons

<sup>1</sup> autor correspondente: [costeira.ivo@gmail.com](mailto:costeira.ivo@gmail.com)

<sup>2</sup> CIBIO/InBio, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Universidade do Porto, Vairão, Portugal

<sup>3</sup> Departamento de Antropologia, Faculdade de Ciências Sociais e Humanas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal

<sup>4</sup> Centre for Research in Anthropology (CRIA), Instituto Universitário de Lisboa, Lisboa, Portugal

# *Studu di tipus-tipus di santchu ku ta ten na Tchon di Bidjugu ku teknikas ku ta djubi pa mulekula*<sup>10</sup>

Ivo Colmonero-Costeira, Tânia Minhós, Baba Djaló,  
Nelson Fernandes, & Maria Joana Ferreira da Silva

## **Rusumu**

Kunsi kaus nunde ki santchu, kon ku dari ta mora nel i importanti pa garanti di kuma e na kontinua izisti na futuru. Teknikas di identifikason molekular ku ka invazivu e ta pirmiti konfirma prezensa di tipus di limaria ku kansadu odja o ku ka tchiu. Santchu di tarafi (*Chlorocebus sabaues*), kankulma (*Cercopithecus campbelli*) ku santchu-bidjugu (*Cercopithecus petaurista buettikoferi*) tudu ta ten na Tchon di Bidjugu. 1990 i ultimu anu ki kontajen di santchu fasidu na Tchon di Bidjugu. No fasi studu jenetiku ku bazia na padas di *D-loop* di DNA di mitokondria na seti djiu di Bidjugu pa sibi na kal kaus ku santchu ta ten nel. Analis di 51 padas di DNA di mitokondria i mostra kuma santchu ta ten na seis di kil seti djiu ku studadu. Es studu mostra kuma teknikas ku ta identifika mulekula i importanti pa konfirma kal tipus di santchu ku ta ten na Tchon di Bidjugu. Es tipu di informason pudi djuda na garanti di kuma santchu na kontinua ten na dia di amanha.

## **Nomi-tchabi**

konserva; jenetika ku ka invazivu; *DNA barcoding*;  
DNA di mitokondria; populasons di djiu; Cercopithecinae.

---

<sup>5</sup> IGC, Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal

<sup>6</sup> Aldeia de Abu, Ganogo, Guiné-Bissau

<sup>7</sup> Aldeia de Anghôr, Orango, Guiné-Bissau

<sup>8</sup> Organisms and Environment Division, School of Biosciences, Cardiff University, Cardiff, Reino Unido

<sup>9</sup> CAPP, School of Social and Political Sciences, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

<sup>10</sup> Nota de edição: A ortografia do kriol segue o modelo proposto em Scantamburlo, L., *Dicionário do Guineense*, Vol. 2 (FASPEBI, Bubaque, 2002) e em Scantamburlo, L., *O Léxico do Crioulo Guineense e as suas Relações com o Português* (Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2013).

## Introdução

A Guiné-Bissau, estando incluída numa região da África Ocidental de elevada diversidade biológica reconhecida a nível mundial (Myers *et al.*, 2000), é um dos países mais biodiversos da região. Apesar de ser relativamente pequena (36.125 km<sup>2</sup>; INE, 2015), a Guiné-Bissau possui múltiplos ecossistemas ao longo da sua área, nomeadamente o mangal, florestas sub-húmidas e tropicais, e savana arbórea e herbácea (Catarino *et al.*, 2001; Biai, 2015). A diversidade de ecossistemas alberga um elevado número de espécies de vertebrados (Catarino *et al.*, 2008; Reiner & Simões, 1999), de salientar animais africanos emblemáticos como o leão (*Panthera leo*), o elefante africano (*Loxodonta africana*), o hipopótamo (*Hippopotamus amphibius*) (Biai, 2015; Chimbo, 2015) e pelo menos 10 espécies de primatas não-humanos (Gipoliti & Dell’Omo, 2003), sendo que três espécies adicionais da superfamília Lorisoidea – *Perodicticus potto*, *Galagoides thomasi* e *Galagoides demidovii* – aguardam confirmação de ocorrência na Guiné-Bissau (Bearder, 2008, 2016; Oates *et al.*, 2016a).

As florestas da África Ocidental perderam 90% da sua vegetação primária original e são fortemente ameaçadas por degradação e/ou perda de habitat (Myers, 1993; Myers *et al.*, 2000). Seguindo a mesma tendência regional, a biodiversidade da Guiné-Bissau encontra-se sob ameaça. A Guiné-Bissau é um dos países com maior dificuldade de desenvolvimento económico do mundo (UNDP, 2016) e a sua população de 1,8 milhões de pessoas (INE, 2015) encontra-se maioritariamente dependente da agricultura de subsistência e dos recursos naturais do país (Boubacar-Sid *et al.*, 2007). Os habitats naturais têm sido reduzidos, fragmentados e/ou destruídos por práticas ambientalmente insustentáveis relacionadas com a agricultura itinerante e monoculturas, nomeadamente de árvores de caju (*Anacardium occidentale*) (Boubacar-Sid *et al.*, 2007; Madeira, 2016). Esta rápida expansão está fortemente associada ao aumento da demanda de castanha de caju nos mercados mundiais (Boubacar-Sid *et al.*, 2007; FAO, 2018).

A maioria dos primatas não-humanos da Guiné-Bissau estão globalmente classificados como ameaçados de extinção pela União Internacional para a Conservação da Natureza (UICN), como por exemplo o chimpanzé-ocidental (*Pan troglodytes verus*, com estatuto de criticamente ameaçado; Humle *et al.*, 2016), e as duas espécies de macacos colobus (*Ptilocolobus temminckii*, ameaçado; *Colobus polykomos*, vulnerável; Galat-Luong *et al.*, 2016; Oates *et al.*, 2008b). A fragmentação de habitat consequente de atividades humanas não sustentáveis poderá afetar significativamente as populações de primatas não-humanos, especialmente de espécies arborícolas dependentes da floresta. O isolamento de grupos em áreas de habitat fragmentado poderá diminuir a dispersão entre grupos e, consequentemente, promover um aumento da consanguinidade dos indivíduos e reduzir o sucesso repro-

duto, levando a um decréscimo do efetivo populacional e potencializando o risco de extirpação local (Liu *et al.*, 2009; Minhós *et al.*, 2016; Oklander *et al.*, 2010; Uki-zintambara & Thébaud, 2002). Para além da desflorestação e fragmentação de habitat, as espécies de primatas não-humanos presentes na Guiné-Bissau encontram-se ameaçadas pela caça e venda de carne de mato nos mercados urbanos (Minhós *et al.*, 2013), pelo que poderão estar a sofrer uma extirpação rápida e silenciosa na Guiné-Bissau. Por outro lado, espécies com maior capacidade de adaptação comportamental parecem demonstrar alterações nos padrões sociobiológicos devido às atividades antropogénicas, cujas consequências a longo prazo para a manutenção das populações são desconhecidas. Por exemplo, os babuínos da Guiné (*Papio papio*) e os chimpanzés-ocidentais (*Pan troglodytes verus*), espécies cuja dispersão foi descrita como sendo sobretudo mediada por fêmeas noutros locais da sua distribuição (*e.g.*, Morin *et al.*, 1993; Kopp *et al.*, 2015), parecem ter alterado os padrões de dispersão na Guiné-Bissau. Estudos usando dados moleculares sugerem fluxo genético mediado por machos para estas espécies (*e.g.*, *Papio papio*: Ferreira da Silva *et al.*, 2014, 2018; *Pan troglodytes verus*: Borges, 2017; Gerini, 2018).

Nas imediações da região costeira da Guiné-Bissau continental, já no oceano Atlântico oriental, encontra-se o Arquipélago dos Bijagós (*i.e.*, os Bijagós). Os Bijagós são constituídos por 88 ilhas de origem aluvial, estendendo-se numa área total de 10.000 km<sup>2</sup> (Madeira, 2016; UNESCO, 2006). A ilha mais próxima do continente – Bolama – está a uma distância de 1,5 km e a ilha mais distante – Unhocomo – a 118 km de distância. À semelhança da Guiné-Bissau continental, o clima dos Bijagós é quente e húmido e apresenta uma estação das chuvas (que dura normalmente de maio a novembro) e uma estação seca (de dezembro a abril) (Catarino *et al.*, 2001). O arquipélago está incluído na região de transição guineo-congolesa-sudanesa e apresenta áreas extensas de mangal, mosaicos de savana arbórea e floresta tropical seca e tropical sub-húmida (Catarino *et al.*, 2001, 2008). Apenas um quarto das ilhas são habitadas em permanência por comunidades rurais, com uma população de tendência crescente, que em 2015 foi estimada em 32.500 habitantes (INE, 2015). As comunidades praticam maioritariamente atividades de subsistência agrícola e piscatória. Metade das ilhas são cultivadas, quer permanentemente, quer sazonalmente (Madeira, 2016).

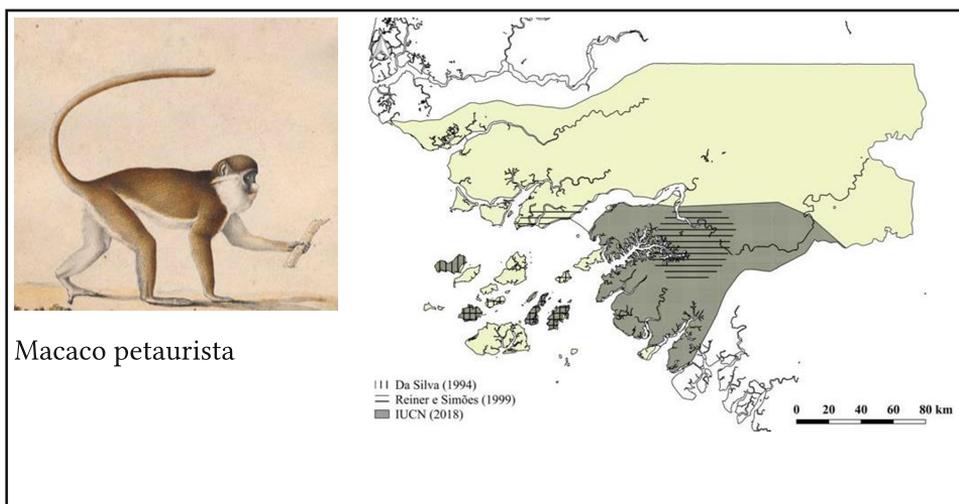
O Arquipélago dos Bijagós é considerado um local importante para a conservação de espécies marinhas emblemáticas e ameaçadas da África Ocidental, nomeadamente os manatins (*Trichechus senegalensis*) e os hipopótamos (*Hippopotamus amphibius*), ambas classificadas com estatuto de conservação “vulnerável” pela UICN (Diagne, 2015; Lewison & Pluháček, 2017). Adicionalmente, é considerado um dos locais mais importantes da África Ocidental para a nidificação da tartaruga verde (*Chelonia mydas*, ameaçada) (Catry *et al.*, 2002; Seminoff, 2004). Os Bijagós

são também muito importantes para espécies de aves aquáticas e são a segunda área mais importante de invernção de aves limícolas migradoras a nível mundial depois do Banc d'Arguin na Mauritânia (Salvig *et al.*, 1994). Uma vez que o arquipélago é um local-chave para a conservação da biodiversidade da África Ocidental, os Bijagós foram considerados uma reserva da biosfera pela UNESCO em 1996 e foram estabelecidos dois parques nacionais – Parque Nacional das Ilhas de Orango e Parque Nacional Marinho João Vieira e Poilão – e uma área marinha protegida – Área Marinha Protegida Comunitária das Ilhas de Urok (IBAP, 2018). Em 2016, o Instituto da Biodiversidade e das Áreas Protegidas (IBAP), em colaboração com a fundação MAVA, iniciaram uma candidatura dos Bijagós a Património Mundial da UNESCO (IBAP, 2016; MAVA, 2018).

Três espécies de primatas não-humanos ocorrem nos Bijagós: o macaco petaurista (*Cercopithecus petaurista buettikoferi*), o macaco verde (*Chlorocebus sabaeus*) e o macaco mona (*Cercopithecus mona*) (Da Silva, 1994, como citado em Campredon *et al.*, 2001; Gippoliti & Dell’Omo, 2003; Reiner & Simões, 1999). O macaco petaurista e o macaco mona são primatas arborícolas (Galat-Luong & Galat, 2000) com traços sociobiológicos muito semelhantes. Ambas espécies apresentam grupos sociais constituídos por um macho e múltiplas fêmeas, possuindo em média uma dezena de indivíduos (10 e 12 indivíduos para os macacos petaurista e mona, respetivamente; Galat-Luong & Galat, 2000). Relativamente à dieta, esta é maioritariamente frugívora em ambas as espécies (77,2% e 78,3% da dieta total do macaco petaurista e do macaco mona das florestas da Costa do Marfim, respetivamente; Galat & Galat-Luong, 1985). O macaco verde apresenta características mais distintas: é um primata semiterrestre (Rowe & Myers, 2016), que forma grupos sociais com múltiplos machos e fêmeas, que podem variar entre os 36 e os 174 indivíduos (Rowe & Myers, 2016). O macaco verde apresenta uma alimentação mais variada, que inclui folhas jovens, frutas, resinas e invertebrados, podendo ainda incluir na sua dieta, aves, pequenos mamíferos e peixes (Galat & Galat-Luong, 1976, 1977). Os padrões de dispersão das três espécies são enviesados para o sexo masculino (Horrocks, 1986; Galat-Luong & Galat, 2000), sendo que as fêmeas de macaco verde podem dispersar ocasionalmente (Horrocks, 1986). As três espécies podem ocorrer numa grande variedade de habitats, tais como as florestas tropicais húmidas e secas, savanas arbóreas, mangais ou ainda plantações (Rowe & Myers, 2016). O macaco petaurista, o macaco verde e o macaco mona foram classificados em 2008 pela UICN como não ameaçados de extinção (Kingdon & Gippoliti, 2008; Oates *et al.*, 2008a, 2016). Todavia, uma revisão mais atualizada do estatuto de conservação (Rowe & Myers, 2016) agravou o estatuto de ameaça destas espécies considerando o acentuado decréscimo populacional ocorrido nas últimas décadas causado pela caça ilegal para consumo de carne de mato e perda/degradação de habitat (Rowe & Myers, 2016). Nesta avali-

ação, o macaco petaurista foi considerado vulnerável, e o macaco mona e o macaco verde de quase ameaçados de extinção (Rowe & Myers, 2016).

De acordo com dados da UICN, as três espécies co-ocorrem na área sudeste da Guiné-Bissau (Figura 1). Os censos conduzidos na Guiné-Bissau continental durante os anos 80 (Limoges, 1989, como citado em Gippoliti & Dell’Omo, 2003) confirmaram a presença do macaco verde e do macaco mona em todo o país, à exceção das zonas mais a nordeste. O macaco verde encontrava-se maioritariamente associado a florestas de mangal nas orlas costeiras enquanto que o macaco mona preferia habitats de floresta mais densa (Gippoliti & Dell’Omo, 2003). Na região continental, o macaco petaurista ocorria no Parque Natural das Lagoas de Cufada (região administrativa de Quínara) e no Parque Nacional de Dulombi (região administrativa de Gabu) (Limoges, 1989, e Thibault, 1993, como citado em Gippoliti & Dell’Omo, 2003). Nos Bijagós, a presença do macaco petaurista foi confirmada nas ilhas de Galinhas, Canhabaque, Bubaque, Rubane, Uracane, Uno e Caravela, do macaco verde nas ilhas de Bubaque, Rubane, Formosa, Maio, Uno, Uracane e no grupo de ilhas de Orango, e do macaco mona na ilha de Caravela (Reiner & Simões, 1999; Da Silva, 1994, como citado em Campredon *et al.*, 2001) (Figura 1). Gippoliti e Dell’Omo em 2003 confirmaram a ocorrência das três espécies no Arquipélago dos Bijagós, afirmando ainda que o macaco verde ocorria em todas as ilhas do arquipélago.



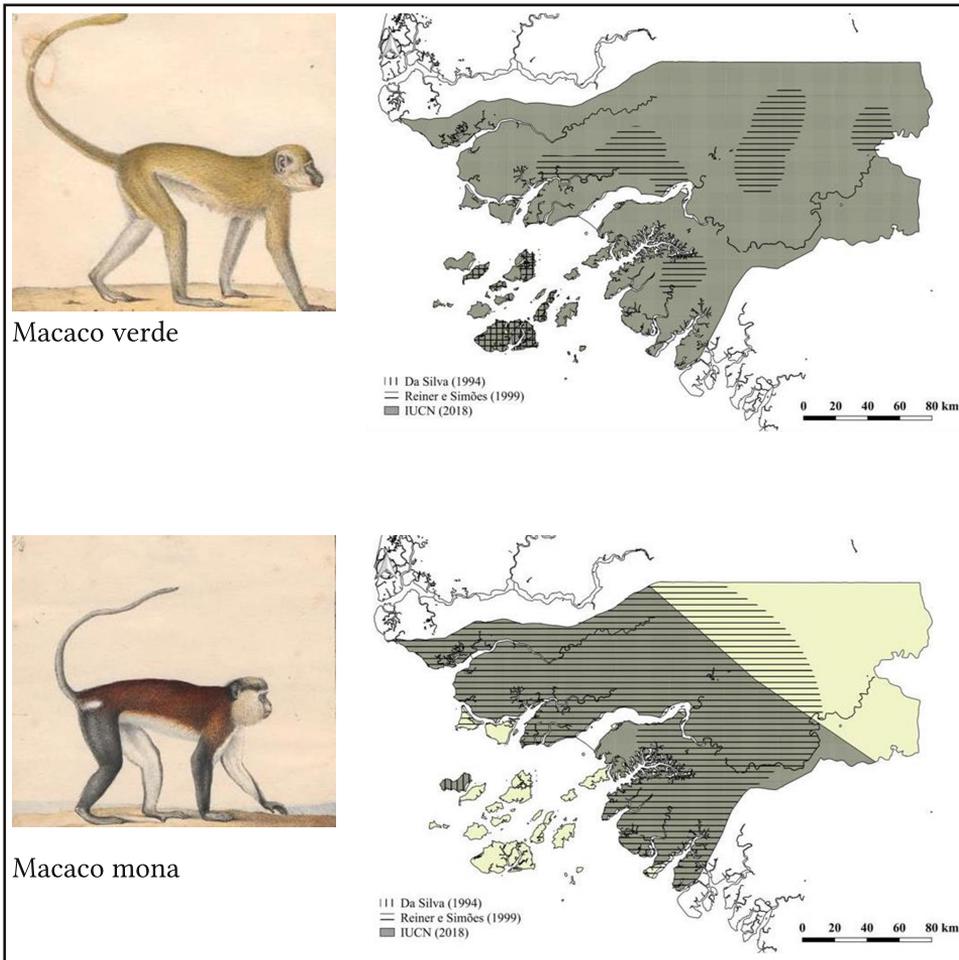


Figura 1 – Distribuição de macaco petaurista, macaco verde e macaco mona. Os dados de ocorrência são baseados em informação do site da UICN (2018, área a cinzento escuro) e informação contida nos relatórios de Da Silva (1994, como citado em Campredon *et al.*, 2001, barras horizontais) e de Reiner & Simões (1999, barras horizontais). Imagens das três espécies são provenientes da coleção *Iconographia Zoologica* da Universidade de Amsterdão, com publicação livre de direitos de autor.

À data dos estudos, o macaco verde e o macaco mona eram considerados as espécies de primatas mais abundantes do país. Contudo, um decréscimo populacional e da área de ocorrência destas espécies no país poderá ter acontecido nas últimas décadas, uma vez que o macaco verde e o macaco mona são as espécies de primatas mais vendidas nos mercados de carne de mato de Bissau, com uma venda estimada de 510 e 462 espécimes de macaco verde e macaco mona, respetivamente, durante a época seca (Minhós *et al.*, 2013). No que diz respeito ao estatuto de conservação local do macaco petaurista, narrativas de habitantes e ex-caçadores sugerem que o macaco petaurista é atualmente muito raro ou mesmo extinto na área do

Parque Natural das Lagoas de Cufada em Quínara (Ferreira da Silva, 2017; Karibuhoye, 2004) e censos recentes ao Parque Nacional de Dulombi não conseguiram encontrar evidências da sua presença (Bersacola *et al.*, 2018). Nos Bijagós, as três espécies são caçadas pelos habitantes das ilhas onde ocorrem (Ferreira da Silva, 2017; Karibuhoye, 2004; Thomas, 2011).

Tendo presente que um elevado número de indivíduos de macaco petaurista, mona e verde poderão ser caçados regularmente (Ferreira da Silva, 2017; Minhós *et al.*, 2013) e considerando que os habitats originais têm sido perdidos localmente nas últimas décadas (Boubacar-Sid *et al.*, 2007; Madeira, 2016), é urgente uma atualização da distribuição nacional e a reavaliação do estatuto de conservação. Um forte decréscimo das populações destas espécies na Guiné-Bissau ou a sua extinção pode implicar a perda de linhagens diferenciadas e adaptações genéticas locais para as espécies dada a provável presença de variabilidade genética única destas populações localizadas no extremo da distribuição (Shotake *et al.*, 2016). À escala nacional, investigação molecular usando amostras das populações de primatas insulares e continentais sugere que a origem geográfica mais provável das populações de primatas de macaco verde e mona dos Bijagós são as regiões costeiras de Quínara (Colmonero-Costeira, 2019), desconhecendo-se de momento se existe migração recente entre o continente e o arquipélago ou entre ilhas dos Bijagós. Estas populações insulares, hipoteticamente isoladas das continentais, poderão ser geneticamente distintas e consequentemente constituir unidades de conservação independentes.

A falta de informação atualizada sobre a presença e a distribuição de grupos de primatas não-humanos no país é um dos maiores impedimentos para a implementação de medidas de gestão e conservação das populações selvagens. A falta de informação atualizada acerca da ocorrência e distribuição de espécies ameaçadas impede, por exemplo, (i) uma correta classificação do seu estatuto de ameaça a nível nacional; (ii) uma priorização mais eficiente do uso dos recursos dedicados à conservação das populações/áreas mais ameaçadas; e (iii) que o desenho de corredores ecológicos considere populações isoladas de espécies ameaçadas. Este facto é particularmente grave para as espécies que ocorrem nos Bijagós, cujos dados mais recentes remontam aos anos 90 (Da Silva, 1994, como citado em Campredon *et al.*, 2001; Gippoliti & Dell’Omo, 2003; Reiner & Simões, 1999).

Assim sendo, a criação de medidas de conservação eficazes é fortemente dependente da existência de informação atualizada sobre a presença e distribuição das espécies à escala nacional (Hernandez *et al.*, 2006). Todavia, semelhanças morfológicas, o carácter raro de espécies ameaçadas de extinção e a dificuldade de observação direta em habitats de baixa visibilidade, nomeadamente em ecossistemas florestais, tornam os censos baseados unicamente na identificação visual suscetíveis de erros

de identificação, o que consequentemente poderá levar a erros na estimativa da distribuição das espécies (Guschanski *et al.*, 2009). As ferramentas de identificação molecular (i.e., *DNA barcoding*, em português código de barras de ADN, ácido desoxirribonucleico) possibilitam a identificação de amostras até ao nível específico ou subespecífico usando fragmentos de *mtDNA* (em português ADNmt, ADN mitocondrial; Hebert & Gregory, 2005). Estas técnicas têm um enorme potencial para melhorar a qualidade de dados da presença de espécies raras ou de difícil observação direta (Li *et al.*, 2017), para as quais a identificação visual/morfológica pode ser sujeita a erros. Nestes casos, o uso combinado da amostragem não-invasiva durante censos populacionais, como por exemplo a recolha de pelos ou excrementos sem contacto e (muitas vezes) sem observação direta dos indivíduos (Chaves *et al.*, 2012; Valentini *et al.*, 2009), a obtenção de *DNA* a partir destes materiais biológicos e sua análise, podem identificar os indivíduos até ao nível específico. As ferramentas para a identificação molecular de espécies mais comumente utilizadas são regiões do *DNA* mitocondrial (*mtDNA*), nomeadamente fragmentos do gene citocromo *b* (*cytb*) e a subunidade *I* da citocromo oxidase *c* (COI) (e.g., Gaubert *et al.*, 2015; Lyra *et al.*, 2017; Minhós *et al.*, 2013). Estas regiões do *mtDNA* permitem distinguir *taxa* filogeneticamente próximos pois apresentam uma baixa diversidade ao nível intra-específico (e.g., entre populações diferentes da mesma espécie) mas divergência genética suficiente para distinguirem espécies diferentes (Hebert *et al.*, 2003, 2004; Hsieh *et al.*, 2001). Outras regiões do *mtDNA* podem ser eficientes na identificação molecular de grupos taxonómicos com um tempo de divergência relativamente curto, nomeadamente a região de controlo do *mtDNA* (*D-loop*) (Mwale *et al.*, 2017; Whittaker *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2015), que é caracterizada por possuir uma maior taxa de evolução comparativamente a regiões codificadoras de proteínas, como o *cytb* e o COI (Jiang *et al.*, 2011). A informação molecular obtida a partir de regiões de *mtDNA* com uma taxa evolutiva mais elevada, como o *D-loop*, poderá complementar a estimativa da distribuição com outras informações relevantes para a genética da conservação de populações insulares de primatas, nomeadamente a estimação da diversidade genética e das dinâmicas de fluxo genético entre populações (Ang *et al.*, 2016; Ferreira da Silva *et al.*, 2014; Minhós *et al.*, 2013).

O objetivo deste estudo foi atualizar a informação da distribuição das três espécies de primatas dos Bijagós em sete das maiores ilhas habitadas do arquipélago. Para evitar potenciais erros na identificação das espécies, durante prospeções às ilhas foram colhidas amostras fecais, cuja identificação até ao nível específico foi posteriormente confirmada usando técnicas moleculares (i.e., ferramentas de *DNA barcoding*). Pretende-se que os resultados deste estudo contribuam, futuramente, para melhorar a eficiência das medidas de conservação pelas autoridades locais. Adicionalmente, este estudo pretende incentivar o desenvolvimento da genética da

conservação destas espécies, por exemplo desenvolvendo novos marcadores moleculares, que poderão ajudar a estimar o risco de extirpação local e promover a viabilidade destas populações insulares a longo prazo.

## Métodos

### Prospecções a ilhas do Arquipélago dos Bijagós

As ilhas a serem prospectadas foram escolhidas com base em informação de relatórios publicados que referiam a ocorrência de macaco pataurista, macaco mona e macaco verde no passado (Da Silva, 1994, como citado em Campredon *et al.*, 2001; Gippoliti & Dell’Omo, 2003; Reiner & Simões, 1999). De forma a otimizar a coleção de amostras, foram prospectadas as ilhas que registavam a presença de duas ou mais espécies. Entre janeiro e junho de 2016 foram prospectadas as ilhas de Ganogo e Orango (janeiro), Uno – Bijante, Anghara, Cabuno e Anghudigo – e Uracane – perto de Uracane – (entre fevereiro e março), Canhabaque e Galinhas – *Djiu di Galinha* – (maio) e Caravela (junho). O período de prospeção em cada ilha variou entre dois (Canhabaque, Galinhas) e sete (Ganogo) dias.

A autorização para a condução do trabalho de campo foi concedida pelo Instituto da Biodiversidade e das Áreas Protegidas (IBAP). A autorização para visitar as florestas locais foi dada por régulos das respetivas aldeias. Informações preliminares acerca da distribuição e presença de grupos de primatas foram facilitadas por régulos, guias comunitários e pelas comunidades locais. A espécie a que pertenciam os grupos foi identificada visualmente (*e.g.*, cor da pelagem e comportamento de locomoção) ou através de vocalizações. A identificação visual foi conduzida por assistentes de campo (NF e MD) experientes na identificação e recolha de amostras biológicas de grupos de primatas durante expedições a diversas áreas protegidas da Guiné-Bissau (Ferreira da Silva, 2017).

### ***Coleção de amostras biológicas***

Quando os grupos eram detetados, procedeu-se à recolha de amostras de excrementos de forma não-invasiva (ver Anexos, Figura A.I). Para cada amostra recolhida, foram anotadas a espécie, a localização geográfica do grupo (registando as coordenadas de posicionamento global (*GPS*) através de aparelho específico) e uma classificação do excremento aquando da colheita (*e.g.*, amostras frescas ou dos dias anteriores). À semelhança de outros trabalhos conduzidos em primatas não-humanos na Guiné-Bissau (Ferreira da Silva, 2012; Sá, 2013), as amostras foram conservadas até à extração do material genético através de dois métodos diferentes: 1) 200 amostras imersas em etanol a 98%, 2) 113 amostras segundo o método de “dois-passos” (Roeder *et al.*, 2004) no qual os excrementos são imersos em etanol a 98% du-

rante 24 a 48h e depois transferidos para tubos contendo sílica gel tipo III (Sigma-Aldrich, EUA). Adicionalmente, 156 amostras foram imersas em RNAlater™ (Invitrogen™, EUA). De forma a evitar potenciais contaminações por *DNA* exógeno durante o processo de coleção, foram usadas luvas e máscaras cirúrgicas descartáveis.

Foram também recolhidas amostras de tecido de indivíduos que tinham sido caçados pelas populações locais. As amostras de tecido colhidas de animais caçados foram conservadas em etanol 98% (*e.g.*, Minhós *et al.*, 2013). Para estas amostras foi recolhida a identificação da espécie segundo o caçador e o local onde terá sido caçada.

Com a exceção das amostras recolhidas de animais caçados, nenhum animal foi manuseado para a obtenção de amostras de excremento, pelo que o bem-estar dos animais foi assegurado ao longo do estudo. A colheita de amostras nos Bijagós foi autorizada pelo IBAP. A autorização da exportação das amostras de tecido foi gentilmente cedida pelo ponto focal CITES (Direção-Geral de Florestas e Fauna). A importação das amostras para Portugal foi concedida pelo Instituto da Conservação da Natureza e Florestas (ICNF) e pela Direção-Geral de Veterinária.

## Extração de *DNA*

O *DNA* presente nos excrementos foi extraído usando o kit de extração *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (Qiagen, Alemanha) e seguindo as instruções do fabricante com algumas modificações descritas em Ferreira da Silva (2012) e Sá (2013) que tendem a aumentar a quantidade de *DNA* extraído: Imersão das amostras em *buffer* ASL durante oito horas e a eluição do *DNA* num volume de 100  $\mu$ L de *buffer* AE (ver Anexos, Figura A.II). Para as amostras preservadas em RNAlater™ foi executado um passo prévio à extração de *DNA* de lavagem com 1X tampão fosfato-salino (*PBS*, do inglês *phosphate buffered saline*).

Para limitar potenciais contaminações por *DNA* exógeno e contaminações entre amostras durante a extração de *DNA* de amostras fecais: (i) os procedimentos foram conduzidos num laboratório dedicado a extrações de *DNA* de amostras não-invasivas; (ii) foram usadas máscaras cirúrgicas, toucas e batas descartáveis; (iii) o material de laboratório foi previamente irradiado com luzes ultravioletas (UV) durante um tempo mínimo de 30 minutos; (iv) a troca de luvas e desinfeção do material entre amostras foi frequente (segundo indicações de Ferreira da Silva, 2012, para análise molecular de amostras não-invasivas de babuínos da Guiné-Bissau).

O *DNA* de amostras de tecido foi extraído usando o kit de extração *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Alemanha), seguindo o protocolo do fabricante.

Foram sempre incluídos controlos negativos durante os procedimentos de extração de DNA. Os extratos de DNA foram conservados a -20° C.

### **Identificação molecular**

Para proceder à identificação molecular das espécies, foram usadas duas regiões do DNA mitocondrial: 1) um fragmento de 402 pares de base (pb) do *cytb* amplificado usando os *primers* GVL14724 e H15149 (Gaubert *et al.*, 2015) para a identificação molecular das amostras de tecido (ver Anexos, Figura A.III); e 2) um fragmento na região HVRI de 387 pb no macaco petaurista, 339 pb no macaco mona e 329 pb no macaco verde, amplificado usando os *primers* LCERCOHVRI (5' CGTGCATTACT-GCTAGCCAAC 3') e HCERCOHVRI (5' GGGATATTGATTTACGGAGGA 3') para a identificação molecular das amostras de excremento e de nove amostras de tecido que serviram como amostras de referência.

Os *primers* LCERCOHVRI e HCERCOHVRI foram desenhados no decorrer deste estudo a partir de sequências de espécies pertencentes à família de primatas Cercopithecidae disponíveis no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>; Benson *et al.*, 2013) e sequências de indivíduos *Cercopithecus petaurista buettikoferi* da Guiné-Bissau publicadas por Thomas (2011).

Ambos os fragmentos foram amplificados através de Reação em Cadeia da Polimerase (RCP, do inglês *Polymerase Chain Reaction*, PCR), cujos protocolos de amplificação e sequenciação laboratorial foram otimizados para as amostras em análise. Os fragmentos de *cytb* foram amplificados usando 1X MyTaq™ Mix (Bioline, Reino Unido), 0.1 µM de *primer Forward* e *Reverse* (em português oligonucleotídeo iniciador direto e reverso), 1 µL de DNA e água ultrapura perfazendo um volume total de 10 µL por reação. A amplificação do fragmento HVR1 foi feita numa PCR com um volume total de 10 µL, contendo 1X MyTaq™ Mix (Bioline, Reino Unido), 0.2 µM de cada *primer*, 2 µL de DNA e água ultrapura para perfazer o volume final. As reações de PCR dos fragmentos de *cytb* foram realizadas num termociclador T100™ (Bio-Rad, EUA) e começaram com um passo de ativação da Taq a 94° C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 92° C por 30 segundos, hibridização a 50° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 30 segundos, terminando na extensão final a 72° C por 15 minutos. Para a amplificação dos fragmentos de HVRI, as PCR começaram com ativação da Taq a 95° C durante 15 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94° C por 30 segundos, hibridização a 58° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 30 segundos, terminando com um passo de extensão de 15 minutos a 72° C. Em cada conjunto de reações de PCR foi incluído um controlo negativo e os controlos negativos originários dos procedimentos de extração de DNA para averiguar a possibilidade de contaminação dos reagentes por DNA

exógeno ou se teriam ocorrido contaminações com o *DNA* do investigador ou entre amostras durante a extração.

Todas as *PCR* usando *DNA* obtido a partir de amostras de excrementos foram executadas numa sala dedicada a técnicas não-invasivas e foram adotados procedimentos para evitar potenciais contaminações (*e.g.*, foi utilizado equipamento de proteção apropriado e todo o material laboratorial foi utilizado pela primeira vez e exposto a radiação UV previamente à amplificação).

De forma a testar o sucesso de amplificação, os produtos de *PCR* foram sujeitos a eletroforese em géis de agarose a 2% marcados com GelRed™ (Biotium, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Em cada corrida, foram incluídos 2 µL do marcador de peso molecular NZYDNA Ladder V (NZYTech, Portugal). Os produtos de *PCR* de ambas as regiões mitocondriais em análise cuja amplificação foi bem-sucedida foram posteriormente purificados por EXOSAP, usando 1 µL (rácio ¼) de Exonuclease I (20 UµL<sup>-1</sup>) e FastAP (1 UµL<sup>-1</sup>) (Thermo Scientific™, EUA), segundo as instruções dos fabricantes. Após purificação, as amostras foram sequenciadas bidirecionalmente num sequenciador automático 3130XL (Applied Biosystems™, EUA) através do serviço comercial prestado pelo Centro de Testagem Molecular (CTM) nas instalações do CIBIO, Campus de Vairão, Vairão, Portugal.

As sequências obtidas foram corrigidas usando o programa Geneious v4.8.5 (Kearse *et al.*, 2012) e confirmando visualmente a sequenciação de cada uma das bases ao longo da sequência *Forward* e *Reverse*. As sequências *Forward* e *Reverse* foram alinhadas e obteve-se uma sequência de consenso para cada uma das amostras. As sequências de consenso de todas as amostras foram alinhadas usando o método MUSCLE (Edgar, 2004) e o número de interações predefinidas implementado no Geneious (ver Anexos, Figura A.IV.a). As posições polimórficas foram confirmadas com base num alinhamento construído com todas as amostras e que incluía sequências das diferentes espécies para identificar putativos erros de sequenciação e evitar que estes fossem confundidos com real variação mitocondrial, tais como posições polimórficas em regiões conservadas do fragmento.

O sucesso de amplificação foi calculado como a percentagem de amostras amplificadas (*i.e.*, para as quais foi tentada uma amplificação) por número total de amostras para as quais foi realizada, no mínimo, uma *PCR*.

Fragmentos de origem mitocondrial inseridos no genoma nuclear (*i.e.*, NUMT – *Nuclear Insertion of Mitochondrial DNA*, Bensasson *et al.*, 2001) podem ser amplificados de forma não intencional e levar a erros na interpretação de padrões, nomeadamente em filogenias (*e.g.*, Collura & Stewart, 1995). Consequentemente, estudos focados em *mtDNA* deverão evitar a amplificação preferencial de NUMT e/ou assegurar que os fragmentos amplificados são de *DNA* mitocondrial (Triant & DeWoody, 2007). Por não serem tendencialmente expressos, os NUMT podem hipoteticamente

ser evitados usando técnicas de *PCR* que usem como sequência molde o *RNA* mensageiro (*mRNA*; em português ácido ribonucleico mensageiro, ARNm), nomeadamente a técnica de *PCR* por transcriptase reversa (*RT-PCR*, do inglês *Reverse Transcriptase PCR*) (Triant & DeWoody, 2007). Contudo, uma vez que o *RNA* é consideravelmente mais instável e de difícil conservação que o *DNA*, a aplicabilidade de *RT-PCR* em estudos de genética não-invasiva é reduzida uma vez que a quantidade e qualidade dos ácidos nucleicos tende a ser mais baixa neste tipo de amostras (Broquet *et al.*, 2007). Para garantir que as sequências de *mtDNA* incluídas neste estudo eram autênticas, excluíram-se as sequências de HVRI que apresentassem picos eletroforéticos duplos e sequências de *cytb* cuja tradução para sequências aminoácidas apresentassem múltiplos codões STOP (Sorenson & Quinn, 1998).

Para identificar as amostras de tecido ao nível específico, procurou-se na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) as sequências semelhantes aos fragmentos de *cytb*, recorrendo à ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, disponível em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Altschul *et al.*, 1990) (ver Anexos, Figura A.IV.b). As amostras de excrementos foram identificadas até à espécie usando as sequências de HVRI. Para isso, primeiro construiu-se uma base de dados local com as amostras de referência identificadas *a priori* por *cytb* e dados do NCBI. Depois, sequências de HVRI de amostras de excrementos foram comparadas com sequências HVRI de amostras de referência através da execução do comando BLAST, recorrendo ao pacote de aplicações de linha de comandos BLAST+ (Camacho *et al.*, 2009).

O fragmento de HVRI poderá ser usado como ferramenta molecular para identificação taxonómica se a distância média interespecífica exceder a distância genética média intraespecífica em pelo menos 10x (Herbert *et al.*, 2004). Para avaliar a distância genética média inter e intraespecífica, foi construída uma árvore *Neighbor Joining* (NJ) no programa Mega v7.0 (Kumar *et al.*, 2016). O tipo de modelo de evolução não afeta significativamente a correta atribuição da identidade taxonómica em estudos de *DNA barcoding* (Collins *et al.*, 2012). Assim sendo, recorreremos ao modelo de evolução molecular Kimura-dois-parâmetros (K2P; Kimura, 1980) que é comumente usado em estudos semelhantes (*e.g.*, Hebert *et al.*, 2003, 2004; Hsieh *et al.*, 2001; Minhós *et al.*, 2013) tendo, conseqüentemente, maior potencial de comparação face a outros modelos de evolução molecular. O suporte estatístico para cada um dos nodos das árvores NJ foi obtido através de *bootstrap* (999 réplicas).

## Mapeamento da presença

Por não ter sido possível confirmar a informação referente à origem dos espécimes caçados localmente, apenas as sequências de *DNA* provenientes de amostras fe-

cais foram utilizadas para obter dados de presença das espécies no arquipélago. As localizações das amostras fecais identificadas molecularmente foram sobrepostas num mapa de uso do solo dos Bijagós produzido por Campredon e colaboradores (2001) e facilitado pelo Instituto Nacional de Estudos e Pesquisa (INEP). O mapeamento foi conduzido no software QGIS v2.18 (QGIS Development Team, 2016).

## Resultados

### Prospecções a ilhas do Arquipélago dos Bijagós

#### *Amostras de tecido*

Amostras de tecido de indivíduos caçados foram recolhidas junto de habitantes locais. Quatro amostras foram recolhidas perto de Anghôr (Orango), quatro amostras foram recolhidas na ilha de Caravela e uma em Endena (Canhabaque), tendo sido identificadas pelos caçadores como sendo de macaco verde (Orango) e de macaco petaurista (Caravela e Canhabaque), respetivamente. Uma amostra foi colhida na ilha de Caravela por L. Palma (CIBIO) em 2002 e terá sido obtida a partir de uma carcaça de macaco petaurista.

#### *Amostras fecais*

Nos 26 dias dedicados à prospeção de sete ilhas dos Bijagós foram recolhidas 378 amostras putativamente identificadas como sendo de macaco petaurista em Galinhas (n=60), Canhabaque (n=61), Uno (n=90), Uracane (n=78), e Caravela (n=89) e 91 amostras putativamente identificadas como sendo de macaco verde foram recolhidas em Ganogo (n=42) e Uno (n=49). Não foram colhidas amostras fecais em Orango. Nenhum grupo foi identificado como sendo de macaco mona durante as expedições.

### Extração de *DNA*, amplificação e sequenciação

Foi extraído o *DNA* de nove amostras de tecido de carcaças e de 117 amostras fecais, que foram selecionadas aleatoriamente das 469 amostras recolhidas para representar todo o espaço geográfico prospetado. Das 117 amostras de excremento extraídas, 111 (n=82 macaco petaurista e n=29 macaco verde) tiveram uma amplificação positiva para HVRI (resultando em 94,9% de sucesso de amplificação) e todas as amostras de tecido amplificaram positivamente para ambos os marcadores moleculares *cytb* e HVRI.

Foram sequenciadas nove amostras de tecido para o fragmento *cytb*. Após alinhamento e corte das sequências pela menor sequência dentro da respetiva espécie, foram obtidas sequências de *cytb* com 347 pb. As sequências geradas não apresenta-

vam picos eletroforéticos duplos, deleções, inserções nem mutações sem sentido quando traduzidas para sequências proteicas e foram consideradas verdadeiras sequências de *mtDNA*.

No total, 51 amostras de *DNA* obtido das amostras de excremento (n=38 macaco petaurista e n=13 macaco verde) foram sequenciadas para HVRI. As sequências obtidas após alinhamento e corte à menor sequência tinham um tamanho de 343 pb. Seis das sequências obtidas a partir de amostras de excrementos apresentavam picos eletroforéticos duplos, pelo que foram excluídas da base de dados final. As sequências obtidas eram iguais ou muito semelhantes entre amostras de tecido e de excremento. Alguns dos haplótipos de macaco petaurista produzidos usando os *primers* por nós desenhados e o par de *primers* usado por Thomas (2011) foram iguais. Considerou-se assim que as sequências incluídas na base de dados final eram verdadeiros fragmentos de *mtDNA*.

## Diversidade haplotípica e identificação molecular

Nos fragmentos de *cytb*, apenas foi encontrado um haplótipo por espécie. Usando o fragmento de HVRI, 18 haplótipos foram encontrados em amostras de macaco petaurista, quatro em macaco verde e um em macaco mona.

### ***Amostras de tecido***

Os BLAST das sequências de *cytb* na base de dados do NCBI permitiram a classificação das amostras de tecido de referência ao nível específico. Quatro das nove sequências obtidas foram identificadas como sendo de macaco petaurista (99% de identidade com o *voucher* JQ256983): uma amostra colhida em Anghôr (ilha de Orango), duas na ilha de Caravela e uma em Endena (ilha de Canhabaque). As restantes três amostras obtidas em Anghôr foram identificadas como sendo de macaco verde (99% de identidade com o *voucher* EF597503). Duas amostras colhidas em Caravela foram identificadas como macaco mona (95% de identidade com o *voucher* JQ256990).

### ***Amostras fecais***

A comparação das sequências HVRI com as amostras de referência, que foram previamente identificadas usando o fragmento *cytb*, permitiram identificar à espécie 51 amostras fecais: 40 como sendo de macaco petaurista (Galinhas, n=6; Canhabaque, n=7; Uno, n=13; Uracane, n=7; Caravela, n=7); sete como sendo de macaco verde (Ganogo) e quatro como sendo de macaco mona (Caravela) (Figura 2).

Verificou-se que tinham ocorrido erros na identificação visual durante as

prospeções: 1) na ilha de Caravela, onde todas as amostras foram recolhidas como pertencentes a macaco petaurista, mas quatro amostras foram identificadas molecularmente como sendo de macaco mona e 2) na ilha de Uno, em que seis amostras foram recolhidas como sendo de macaco verde, mas foram identificadas molecularmente como sendo de macaco petaurista (Tabela 1).

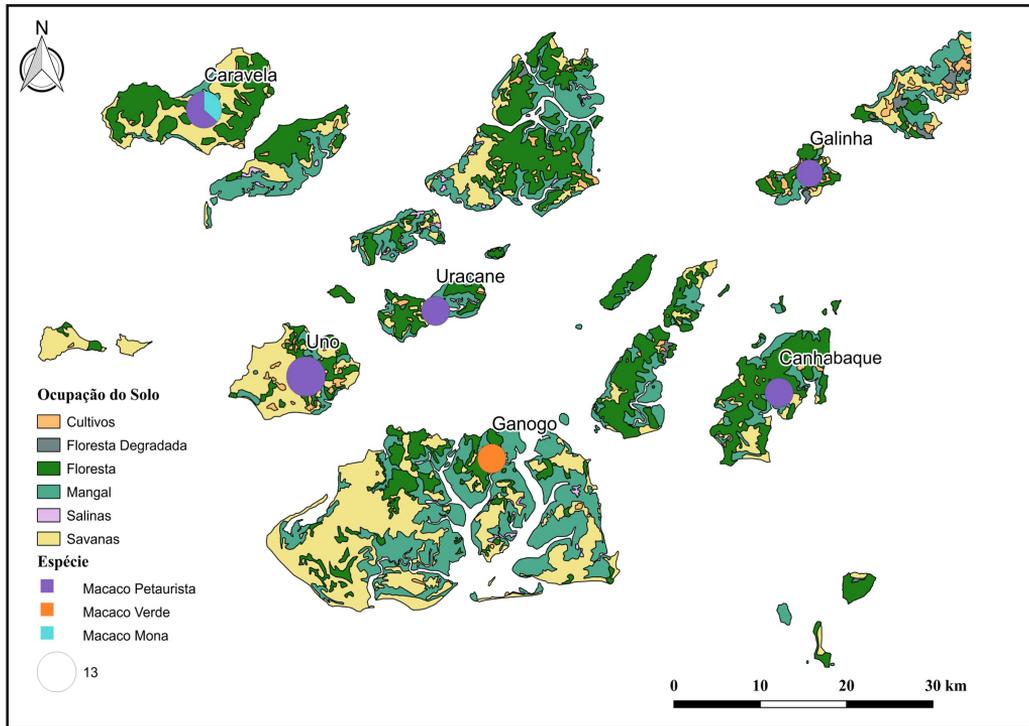


Figura 2 - Estimativa de distribuição dos primatas não-humanos no Arquipélago dos Bijagós, nas ilhas de Caravela, Uno, Uracane, Ganogo, Canhabaque e Galinhas em 2016, sobreposta num mapa representando a ocupação do solo cedido pelo Instituto Nacional de Estudos e Pesquisa (INEP) e adaptado de Campredon *et al.* (2001). A estimativa da distribuição foi obtida com dados de presença recolhidos em prospeções às ilhas e após correção da identificação visual por técnicas de *DNA barcoding*. No total, 51 sequências da região *D-loop* do *mtDNA* foram usadas. Os círculos sobre as ilhas mostram a identificação molecular ao nível específico de amostras de excremento. O tamanho do círculo é proporcional ao número de sequências obtidas para cada ilha. O círculo branco no fundo da legenda indica a área correspondente a 13 sequências.

As 60 sequências de HVRI (343 bp) foram agrupadas na árvore NJ em três ramos monofiléticos, com valor de *bootstrap*  $\geq 98\%$  (Figura 3). Todas as amostras agrupadas num dos três clades principais foram consideradas como pertencendo à mesma espécie. A distância genética média interespecífica estimada (i.e., entre clades) foi de

9,67% (6,38%–12,24%) e a máxima distância genética intraespecífica média estimada (i.e., no mesmo clade) foi de 0,45%.

Tabela 1 – Número de amostras analisadas e a respetiva identificação quanto à espécie, antes e depois da correção por identificação molecular.

Ilha	Identificação Visual			Identificação Molecular		
	Macaco Petaurista	Macaco Mona	Macaco Verde	Macaco Petaurista	Macaco Mona	Macaco Verde
Galinhas	6	-	-	6	-	-
Canhabaque	7	-	-	7	-	-
Uno	7	-	6	13	-	-
Uracane	7	-	-	7	-	-
Caravela	11	-	-	7	4	-
Ganogo	-	-	7	-	-	7
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>-</b>	<b>13</b>	<b>40</b>	<b>4</b>	<b>7</b>

## Atualização das estimativas de distribuição das espécies

Os resultados do estudo genético confirmaram a presença de macaco petaurista e mona nas ilhas onde a sua presença tinha sido registada por Da Silva (1994), Reiner & Simões (1999) e Gippoliti & Dell’Omo (2003) (Tabela 2). No entanto, o macaco verde previamente referido como ocorrendo em todas as ilhas do arquipélago (Gippoliti & Dell’Omo, 2003) foi apenas encontrado na ilha de Ganogo pelo nosso trabalho (Tabela 2).

Usando uma classificação do solo feita por Campredon e colaboradores (2001) para o Arquipélago dos Bijagós, foi possível verificar que a ocorrência das espécies nos habitats é concordante com a relatada para a Guiné-Bissau continental (Gippoliti & Dell’Omo, 2003). De facto, reportamos a ocorrência de macaco petaurista e mona em ilhas cujos habitats preponderantes são a floresta tropical e a savana arbórea (ilhas de Galinhas, Canhabaque, Uno, Uracane e Caravela; Figura 2) e, por outro lado, o macaco verde foi detetado na ilha onde o habitat predominante é a floresta de mangal (ilha de Ganogo; Figura 2).

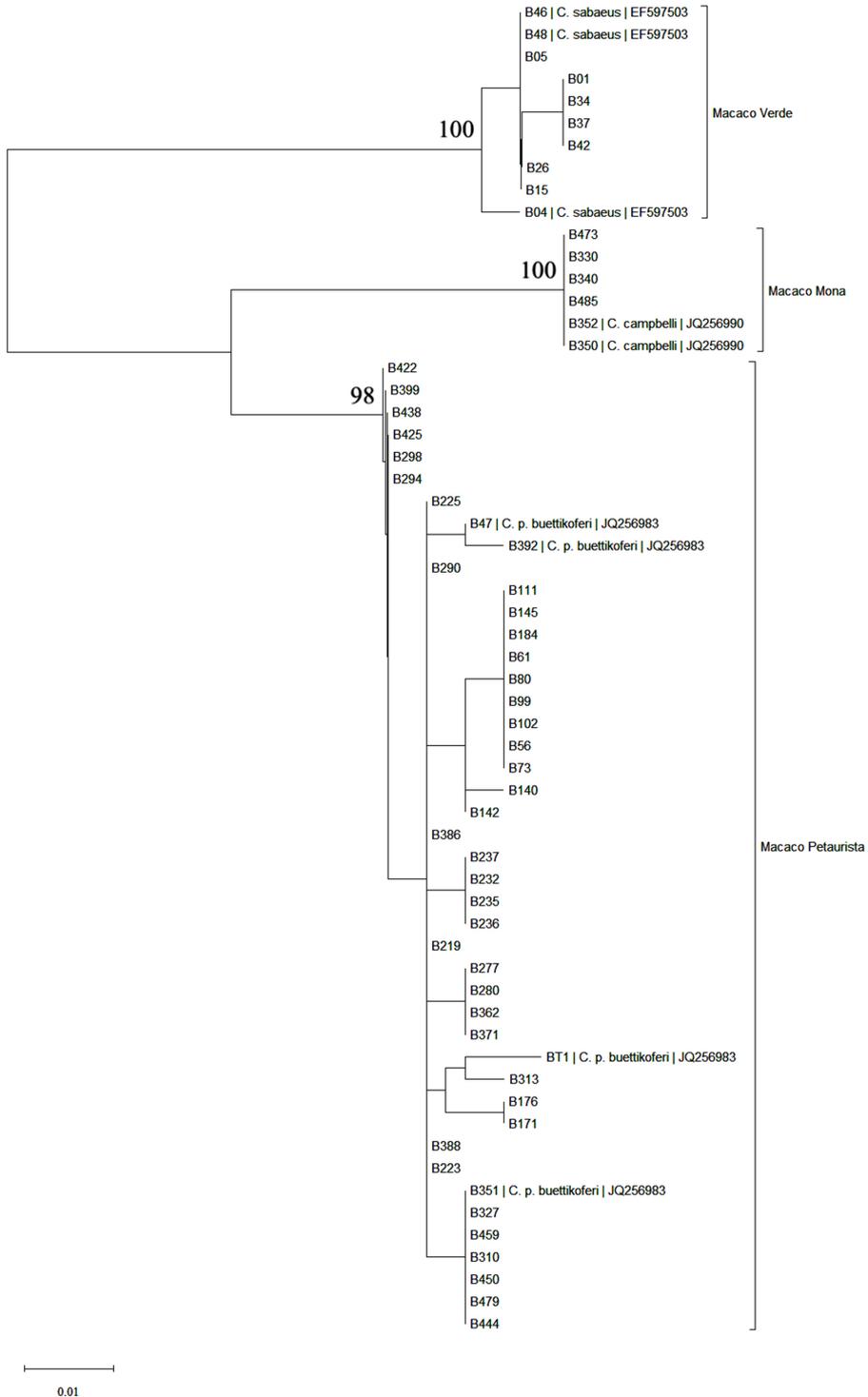


Figura 3 – Arvore *Neighbor-joining* construída usando 60 seqüências de 343 pares de bases da região HVRI do *DNA* mitocondrial calculada usando a distância genética Kimura-2-

parâmetros e com base em 999 réplicas. As sequências provenientes de amostras de tecido estão indicadas pelo nome da espécie e foram previamente identificadas ao nível específico usando uma região do gene citocromo *b* e comparadas com um *voucher* da base de dados do *GenBank* (respetivamente indicado na árvore com o seu código). Os três principais clades têm associado o seu valor de *bootstrap*.

## Discussão

Este é o estudo de distribuição mais recente dos últimos 20 anos das populações de primatas presentes no Arquipélago dos Bijagós. O nosso estudo identificou 51 amostras de *DNA* obtidas a partir de excrementos ao nível específico, usando *primers* desenhados no decorrer deste trabalho que são específicos da região HVRI do *D-loop* do *DNA* mitocondrial para primatas da família Cercopithecidae.

A prospeção molecular de sete ilhas do arquipélago permitiu confirmar a presença de macaco petaurista em cinco das ilhas amostradas (Galinhas, Canhabaque, Uno, Uracane e Caravela), de macaco verde em Ganogo e de macaco mona em Caravela e que a sua ocorrência aparenta estar associada ao tipo de habitat predominante em cada ilha.

A identificação molecular das amostras de tecido permitiu confirmar que os primatas são caçados no Arquipélago dos Bijagós. Dado o baixo número de amostras recolhidas e de forma não sistemática, o nosso estudo não permite concluir se a caça é dirigida a alguma espécie em específico.

## Eficácia de amplificação e autenticidade das sequências de *mtDNA*

O sucesso de amplificação dos fragmentos de HVRI neste estudo foi de 94,9%, que é semelhante à obtida noutros estudos sobre primatas usando *DNA* extraído a partir de excrementos (97%, Ferreira da Silva, 2012; 96%, Frantzen *et al.*, 1998). Contudo, o sucesso de amplificação foi superior ao sucesso de amplificação verificado por Thomas (2011) de 87,5% para excrementos de macaco petaurista. O elevado sucesso de extração poderá estar associado ao facto de a maioria das amostras terem sido recolhidas poucos minutos depois da observação dos grupos. Quando colhidas após pouco tempo de defecação (<1 dia), as amostras de excremento experimentam uma curta exposição a fatores ambientais (humidade, temperatura e radiação solar) que podem promover a degradação do *DNA* por enzimas e o *DNA* extraído de amostras frescas é normalmente em maior quantidade e qualidade (Agetsuma-Yanagihara *et al.*, 2017; Demay *et al.*, 2013). O alto sucesso de amplificação pode estar ainda relacionado com um menor tamanho do fragmento amplificado. Como verificado por Broquet e colaboradores (2007), uma taxa alta de amplificação a partir de

*DNA* obtido de amostras não-invasivas é conseguida quanto menor for o fragmento amplificado. No nosso estudo, o fragmento de HVRI possuía menos 177 pb face ao fragmento amplificado por Thomas (2011), o que poderá justificar um maior sucesso de amplificação em comparação com aquele estudo.

Não foi detetada a amplificação de NUMT nas sequências amplificadas para o fragmento de *cytb*, mas seis das sequências de HVRI apresentavam picos eletroforéticos duplos, o que poderá ser indicativo da amplificação indevida de NUMT ou de contaminação aquando da coleção *in situ*. Após a remoção destas sequências de HVRI, as evidências reunidas que sugerem que as restantes sequências obtidas são sequências de *DNA* mitocondrial são: (i) as sequências que integraram a base de dados final não apresentavam picos duplos; (ii) as amostras de tecido produziram haplótipos iguais ou semelhantes às de excremento; e (iii) certos haplótipos de macaco petaurista eram iguais aos haplótipos obtidos pelo estudo independente de Thomas (2011), que usou *primers* diferentes dos utilizados neste estudo.

## Diversidade haplotípica e identificação molecular

O número total de haplótipos de HVRI identificados (i.e., 21) foi muito superior ao número de haplótipos obtidos para o *cytb* (i.e., 3), o que é expectável considerando a elevada taxa evolutiva desta região não-codificante do *mtDNA* face aos restantes genes codificantes (Freeland *et al.*, 2011). Deste modo, o fragmento de HVRI poderá vir a ser usado para analisar a subestruturação das populações insulares amostradas, especialmente para o macaco petaurista (espécie na qual se identificaram 18 haplótipos diferentes; Colmonero-Costeira *et al.*, 2019).

Os três grupos filogenéticos revelados pelas árvores NJ são monofiléticos e relativamente bem diferenciados. Não se verificou qualquer sobreposição entre a variação inter e intraespecífica, sendo que a relação entre a distância média interespecífica e intraespecífica é duas vezes superior ao limite proposto por Hebert *et al.* (2004) para avaliar a eficácia de um dado fragmento como ferramenta de *DNA barcoding*. O uso deste *barcoding gap* como forma de corroborar a utilização de *DNA barcoding* como ferramenta de identificação taxonómica tem sido debatido ao longo dos anos. A sua existência é dependente do grupo taxonómico, pelo que necessita de ser analisada com especial cuidado (Candek & Kuntner, 2015; Meyer & Paulay, 2005). Contudo, o elevado suporte estatístico dos três principais clades por nós reportados é bastante semelhante aos evidenciados noutros estudos de *DNA barcoding* em primatas africanos (>75%, Gaubert *et al.*, 2015; 100%, Minhós *et al.*, 2013). Assim sendo, tendo-se observado a existência de um *barcoding gap*, e níveis de suporte estatísticos compatíveis com outros trabalhos publicados previamente, é possível afirmar que o marcador molecular (HVRI) desenvolvido no decorrer deste trabalho

consegue distinguir as espécies que ocorrem no Arquipélago dos Bijagós de forma coerente.

Adicionalmente, com este trabalho tornou-se evidente a necessidade de se efetuar correções às identificações visuais feitas *in situ* usando técnicas de identificação molecular. Isto é especialmente verdade em espécies cujo tamanho, forma corporal e cor do pelo na gama dos castanhos poderá dificultar a sua correta identificação visual, tal como acontece para o macaco petaurista, o macaco mona e o macaco verde (Rowe & Myers, 2016). Além disso, o caráter elusivo de primatas não-humanos, associado à dificuldade de observação direta em habitats de floresta que ocorrem nos Bijagós, são potenciais fatores que incitam à ocorrência de erros de classificação taxonómica baseados puramente em observações diretas (Guschanski *et al.*, 2009).

Corroborámos também, à semelhança do verificado por Minhós e colaboradores (2013) para a região continental da Guiné-Bissau, que a identificação das carcaças de primatas providenciada pelos locais não foi completamente precisa. O viés reportado, tal como proposto pelos autores do estudo, deverá estar associado à semelhança corporal entre as espécies em questão e ao facto de as carcaças terem já sido processadas através da queima do pelo e do esventramento do indivíduo (Minhós *et al.*, 2013).

## Distribuição das espécies

Globalmente, a distribuição atual dos primatas é consequência da interação de fatores bióticos e abióticos intrínsecos à sua sociobiologia, de fatores históricos relacionados com o clima e de ações antropogénicas (Lehman & Fleagle, 2006). A ocorrência dos primatas não-humanos no Arquipélago dos Bijagós parece estar associada à distribuição dos tipos de habitat reportados por mapas de ocupação do solo providenciados por organizações nacionais (Figura 2). Efetivamente, um dos principais fatores modeladores da distribuição das espécies de primatas à escala local é o tipo de habitat e as respetivas características bióticas e abióticas que permitem dar resposta às necessidades ecológicas específicas de cada espécie (Lehman *et al.*, 2006; Rendigs *et al.*, 2003). As florestas tropicais apresentam uma maior disponibilidade alimentar para espécies primatas frugívoras, como o macaco petaurista e o macaco mona (Galat & Galat-Luong, 1985) em comparação com as florestas de mangal (Matsuda *et al.*, 2009), o que poderá justificar a ocorrência preferencial destas espécies nas ilhas com uma maior área de ocupação deste habitat. Por outro lado, o mangal fornece uma maior variedade de itens alimentares que constituem parte da dieta omnívora do macaco verde, nomeadamente invertebrados terrestres (*e.g.*, insetos) e aquáticos (*e.g.*, crustáceos) e ainda peixes (Galat & Galat-Luong, 1976). Contudo, a história biogeográfica destes primatas nos Bijagós e na Guiné-Bissau continental encontra-se por estudar e futuros estudos poderão abordar a

colonização dos Bijagós por primatas não-humanos (Colmonero-Costeira *et al.*, 2019).

## Atualização da distribuição usando dados moleculares não-invasivos

As diferenças na distribuição das três espécies nos Bijagós verificadas entre este estudo e os censos realizados em anos anteriores (Campredon *et al.*, 2001; Gippoliti & Dell’Omo, 2003; Reiner & Simões, 1999) enfatizam as dificuldades em observar e identificar primatas não-humanos nestes ecossistemas (Guschanski *et al.*, 2009).

Obtivemos amostras de grupos de primatas com um esforço de amostragem relativamente baixo e confirmámos a presença de macaco petaurista e macaco mona nas ilhas onde a sua presença tinha sido previamente registada. Podemos concluir que, apesar da caça de primatas e de uma crescente desflorestação do arquipélago para cultivo de caju em monocultura (Madeira, 2016), os seus efeitos ainda não foram suficientes para extirpar estas espécies localmente. No entanto, o macaco verde, considerado a espécie mais abundante e amplamente distribuída no arquipélago e referido como ocorrendo em todas as ilhas do arquipélago por estudos passados (Gippoliti & Dell’Omo, 2003), foi apenas encontrado na ilha de Ganogo pela nossa prospeção. Este resultado poderá ser explicado por artefactos amostrais: 1) por um esforço desigual de amostragem na extensão das ilhas; e 2) possibilidade de terem ocorrido erros na identificação da espécie nos censos anteriores. Contudo, considerando que os grupos de macaco verde podem viajar uma distância diária de 11 km (Rowe & Myers, 2016), valor que se encontra no intervalo de distâncias máximas entre os dois extremos das diferentes ilhas e, dada a aparente inexistência de barreiras geográficas ao movimento destas espécies no interior das ilhas, seria de esperar a coleção e identificação molecular de amostras desta espécie. A pior hipótese explicativa destes resultados no âmbito da conservação dos primatas dos Bijagós é que os macacos verdes podem ter-se tornado mais raros e difíceis de amostrar nas ilhas de Galinhas, Canhabaque, Uracane, Uno e Caravela, e tal hipótese deverá ser confirmada em expedições futuras.

## Direções futuras para a conservação das populações de primatas do Arquipélago dos Bijagós

Este estudo inclui um número limitado de amostras e de ilhas. Assim sendo, estudos futuros deveriam alargar a prospeção para outras ilhas e confirmar a presença e ausência de primatas no arquipélago.

Chamamos a atenção que, à escala dos Bijagós, estas espécies aparentam ocorrer associadas a ecossistemas específicos, não sendo tão generalistas como sugerido pa-

ra outros locais (Rowe & Myers, 2016), o que poderá aumentar a suscetibilidade destas espécies aos impactos negativos da desflorestação (Ukizintambara & Thébaud, 2002). Estes resultados preliminares frisam a necessidade de mais estudos focados na ecologia e sociobiologia das populações destes primatas na Guiné-Bissau de forma a confirmar a preferência de habitat destas espécies ao nível local e estimar a sua vulnerabilidade à alteração e degradação dos ecossistemas onde ocorrem.

É de frisar também que este estudo veio confirmar molecularmente que as três espécies de primatas são caçadas no arquipélago, já que duas amostras foram obtidas de duas carcaças de macaco verde e uma de macaco pataurista. Considerando a caça documentada, aliada ao facto de não terem sido recolhidas evidências da presença de macaco verde em algumas das ilhas amostradas, o nosso estudo sugere que o estatuto de conservação local destas espécies no arquipélago deverá ser reavaliado. Neste âmbito, é ainda necessário estimar o tamanho e a densidade das populações e avaliar a sua vulnerabilidade à extinção avaliando, nomeadamente, a diversidade genética e a estrutura populacional. Esta informação será um forte contributo para a criação de planos de conservação eficazes que promovam a proteção destas populações e do seu ecossistema envolvente.

## Agradecimentos

Os autores deste trabalho gostariam de agradecer ao Instituto da Biodiversidade e das Áreas Protegidas (IBAP), nas pessoas de Aissa Regalla, Alfredo Simão da Silva e Justino Biai, por autorizarem a coleção de amostras no Arquipélago dos Bijagós e permitirem a sua exportação para Portugal, e à Direção-Geral de Florestas e Fauna, por autorizar a exportação das amostras de tecido para Portugal. Gostaríamos de agradecer ao Instituto da Conservação da Natureza e Florestas (ICNF) por autorizar a importação das amostras para Portugal. Agradecemos a Jaime Bijagó, Isabella Espinosa, Helena Foito e Vítor dos Santos pelo apoio em Bissau. Gostaríamos ainda de agradecer às populações locais e régulos por terem autorizado e facilitado o trabalho de campo, oferecendo informações sobre a localização de grupos de primatas nas ilhas. Este projeto foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) através do projeto PRIMATOMICS (PTDC/IVC-ANT/3058/2014), The Born Free Foundation, Chester Zoo Conservation Fund, Primate Conservation Incorporated, CAROSI, Cápsulas do Norte, Camarc, JA-Rolhas e Cápsulas. Este trabalho é publicado em memória de Alfredo Simão da Silva. Gostaríamos de agradecer publicamente o seu apoio e os seus comentários muito elucidativos a resultados preliminares deste estudo.

Tabela 2 – Atualização da distribuição de macaco petaurista, macaco mona e macaco verde no Arquipélago dos Bijagós face aos censos mais recentes de Da Silva (1994), Reiner & Simões (1999) e Gippoliti & Dell’Omo (2003).

Ilha	Macaco Petaurista				Macaco Mona				Macaco Verde			
	Da Silva (1994)	Reiner & Simões (1999)	Gippoliti & Dell’Omo (2003)	Este Estudo (2018)	Da Silva (1994)	Reiner & Simões (1999)	Gippoliti & Dell’Omo (2003)	Este Estudo (2018)	Da Silva (1994)	Reiner & Simões (1999)	Gippoliti & Dell’Omo (2003)	Este Estudo (2018)
Galinhas	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	✓	-
Canhabaque	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	✓	-
Uno	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	✓	-
Uracane	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	✓	-	✓	-
Caravela	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	-	-	✓	-
Canogo	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓

## Referências bibliográficas

- Agetsuma-Yanagihara, Y., Inoue, E., & Agetsuma, N. (2017). Effects of time and environmental conditions on the quality of DNA extracted from fecal samples for genotyping of wild deer in a warm temperate broad-leaved forest. *Mammal Research*, 62(2), 201-207.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
- Ang, A., Srivathsan, A., Meier, R., Luu, T. B., Le, Q. K., & Covert, H. (2016). No evidence for mitochondrial genetic variability in the largest population of critically endangered Tonkin snub-nosed monkeys in Vietnam. *Primates*, 57(4), 449-453.
- Bearder, S. (2008). *Galagoides thomasi*. Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da IUCN. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T40653A10350606.en> (Acedido a 6 de maio de 2019).
- Bearder, S. (2016). *Galagoides demidovii*. Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da IUCN. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20161.RLTS.T40649A95541498.en> (Acedido a 6 de maio de 2019).
- Bensasson, D., Zhang, D. X., Hartl, D. L., & Hewitt, G. M. (2001). Mitochondrial pseudogenes: Evolution’s misplaced witnesses. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(6), 314-321.

- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(DI), 36-42.
- Bersacola, E., Bessa, J., Frazão-Moreira, A., Biro, D., Sousa, C., & Hockings, K. J. (2018). Primate occurrence across a human-impacted landscape in Guinea-Bissau and neighbouring regions in West Africa: Using a systematic literature review to highlight the next conservation steps. *PeerJ*, 6, e4847.
- Biai, J. (2015). *Strategy and National Action Plan for the Biodiversity 2015-2020*. Bissau: The Republic of Guinea-Bissau – The State’s General Office of the Environment.
- Borges, F. (2017). *A country-level genetic survey of the IUCN critically endangered western chimpanzee (Pan troglodytes verus) in Guinea-Bissau*. Dissertação de mestrado, Universidade do Porto, Portugal.
- Boubacar-Sid, B., Creppy, E., Gacitua-Mario, E., & Wodon, Q. (2007). *Conflict, livelihoods, and poverty in Guinea-Bissau: A brief overview*. Washington DC: The World Bank.
- Broquet, T., Ménard, N., & Petit, E. (2007). Noninvasive population genetics: A review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. *Conservation Genetics*, 8(1), 249-260.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10, p. 421.
- Campredon, P., Cuq, F., Giraudet, E., Giraudet, J., Goulemon, F., Pennober, G., & Da Silva, A. S. (2001). *Un système d'information géographique pour l'aide à la gestion intégrée de l'archipel des Bijagos (Guinée-Bissau)*. Notice de la carte, constitution et exploitation du SIG. Plouzané: Géosystèmes-CNRS.
- Candek, K., & Kuntner, M. (2015). DNA barcoding gap: Reliable species identification over morphological and geographical scales. *Molecular Ecology Resources*, 15(2), 268-277.
- Catarino, L., Martins, E. S., Basto, M. F. P., & Diniz, M. A. (2008). An annotated checklist of the vascular flora of Guinea-Bissau (West Africa). *Blumea, Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, 53(1), 1-222.
- Catarino, L., Martins, E. S., & Moreira, I. (2001). Influence of environmental features in the phytogeographic framework of Guinea-Bissau. Plant systematics and phytogeography for the understanding of African biodiversity, *Proceedings of the XVIth AETFAT Congress*, 71(2), 1079-1086.
- Catry, P., Barbosa, C., Indjai, B., Almeida, A., Godley, B. J., & Vié, J. C. (2002). First census of the green turtle at Poilão, Bijagós Archipelago, Guinea-Bissau: The most important nesting colony on the Atlantic coast of Africa. *Oryx*, 36(4), 400-403.

- Chaves, P. B., Graeff, V. G., Lion, M. B., Oliveira, L. R., & Eizirik, E. (2012) DNA barcoding meets molecular scatology: Short mtDNA sequences for standardized species assignment of carnivore noninvasive samples. *Molecular Ecology Resources*, 12(1), 18-35.
- Chimbo. (2015). *Annual report 2015*. CHIMBO Foundation.
- Collins, R. A., Boykin, L. M., Cruickshank, R. H., & Armstrong, K. F. (2012). Barcoding's next top model: An evaluation of nucleotide substitution models for specimen identification. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(3), 457-465.
- Collura, R. V., & Stewart, C. B. (1995). Insertions and duplications of mtDNA in the nuclear genomes of Old World monkeys and hominoids. *Nature*, 378(6556), 485-489.
- Colmonero-Costeira, I. (2019). *Insights into insular primates: Conservation genetics of Cercopithecus petaurista buettikoferi, Cercopithecus campbelli and Chlorocebus sabaeus in the Bijagós Archipelago, Guinea-Bissau*. Dissertação de mestrado, Universidade do Minho, Portugal.
- Demay, S. M., Becker, P. A., Eidson, C. A., Rachlow, J. L., Johnson, T. R., & Waits, L. P. (2013). Evaluating DNA degradation rates in faecal pellets of the endangered pygmy rabbit. *Molecular Ecology Resources*, 13(4), 654-662.
- Diagne, K. L. (2015). *Trichechus senegalensis*. Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da UICN 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T22104A81904980.en> (Acedido a 6 de maio de 2019).
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2018). *FAOSTAT Database*. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data> (Acedido a 26 de abril de 2018).
- Ferreira da Silva, M. J. (2012). *Hunting pressure and the population genetic patterns and sex-mediated dispersal in the Guinea Baboon in Guinea-Bissau*. Dissertação de doutoramento, Universidade de Cardiff, Reino Unido.
- Ferreira da Silva, M. J. (2017). *Protecting the Western Chimpanzee and threatened primates from logging and illegal hunting in Guinea-Bissau*. Second year progress report. Reino Unido.
- Ferreira da Silva, M. J., Godinho, R., Casanova, C., Minhós, T., Sá, R. M., & Bruford, M. W. (2014). Assessing the impact of hunting pressure on population structure of Guinea baboons (*Papio papio*) in Guinea-Bissau. *Conservation Genetics*, 15(6), 1339-1355.
- Ferreira da Silva, M. J., Kopp, G. H., Casanova, C., Godinho, R., Minhós, T., Sá, R., Zinner, D., & Bruford, M. W. (2018). Disrupted dispersal and its genetic

- consequences: Comparing protected and threatened baboon populations (*Papio papio*) in West Africa. *PLoS ONE*, 13(4), e0194189.
- Frantzen, M. A. J., Silk, J. B., Ferguson, J. W. H., Wayne, R. K., & Kohn, M. H. (1998). Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology*, 7(10), 1423-1428.
- Freeland, J. R., Kirk, H., & Petersen, S. (2011). *Molecular ecology*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Galat-Luong, A., & Galat, G. (2000). *Les primates des monts Nimba. Perturbation et grande faune sauvage*. Dacar: Institut de Recherche pour le Développement.
- Galat-Luong, A., Galat, G., Oates, J. F., Struhsaker, T., McGraw, S., & Ting, N. (2016). *Ptilocolobus temminckii*. Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da UICN 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20161.RLTS.T18247A92646945.en> (Acedido a 6 de maio de 2019).
- Galat, G., & Galat-Luong, A. (1976). La colonisation de la mangrove par *Cercopithecus aethiops sabaesus* au Sénégal. *Revue d'Écologie (Terre et Vie)*, 30, pp. 3-30.
- Galat, G., & Galat-Luong, A. (1977). Demographie et regime alimentaire d'une troupe de *Cercopithecus aethiops sabaesus* en habitat marginal au nord Sénégal. *Revue d'Écologie (Terre et Vie)*, 31, pp. 557-577.
- Galat, G., & Galat-Luong, A. (1985). La communauté de primates diurnes de la forêt de Tai, Côte-d'Ivoire. *Revue d'Écologie (Terre et Vie)*, 40, pp. 3-32.
- Gaubert, P., Njiokou, F., Olayemi, A., Pagani, P., Dufour, S., Danquah, E., Nutsuakor, M. E., et al. (2015). Bushmeat genetics: Setting up a reference framework for the DNA typing of African forest bushmeat. *Molecular Ecology Resources*, 15(3), 633-651.
- Gerini, F. (2018). *Structure and connectivity of sympatric primate species across a human-dominated landscape: Population genetics of Western Chimpanzee (Pan troglodytes verus) and Guinea Baboon (Papio papio) in Guinea Bissau, West Africa*. Dissertação de mestrado, Universidade de Pisa, Itália.
- Gippoliti, S., & Dell'Omo, G. (2003). Primates of Guinea-Bissau, West Africa: Distribution and conservation status. *Primate Conservation*, 19(19), 73-77.
- Guschanski, K., Vigilant, L., McNeilage, A., Gray, M., Kagoda, E., & Robbins, M. M. (2009). Counting elusive animals: Comparing field and genetic census of the entire mountain gorilla population of Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *Biological Conservation*, 142(2), 290-300.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.

- Hebert, P. D. N., & Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5), 852-859.
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S., & Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, 2(10): e312.
- Hernandez, P. A., Graham, C., Master, L. L., & Albert, D. L. (2006). The effect of sample size and species characteristics on performance of different species distribution modeling methods. *Ecography*, 29(5), 773-785.
- Horrocks, J. A. (1986). Life-history characteristics of a wild population of vervets (*Cercopithecus aethiops sabaues*) in Barbados, West Indies. *International Journal of Primatology*, 7(1), 31-47.
- Hsieh, H. M., Chiang, H. L., Tsai, L. C., Lai, S. Y., Huang, N. E., Linacre, A., & Lee, J. C. I. (2001). Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals. *Forensic Science International*, 122(1), 7-18.
- Humle, T., Boesch, C., Campbell, G., Junker, J., Koops, K., Kuehl, H., & Sop, T. (2016). *Pan troglodytes ssp. verus*. Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da UICN 2016c. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T15935A17989872.en> (Acedido a 6 de maio de 2019).
- IBAP (Instituto da Biodiversidade e das Áreas Protegidas). (2016). *Relance da candidatura do Arquipélago Bolama-Bijagós ao sítio de património mundial da UNESCO*. Bissau: IBAP. Disponível em: <https://www.ibapgbissau.org/images/galeria/pdfs/Ficha-Resumo-Projeto-RBABB.pdf> (Acedido a 26 de abril de 2018).
- IBAP (Instituto da Biodiversidade e das Áreas Protegidas). (2018). *Áreas Protegidas*. Bissau: IBAP. Disponível em: <https://www.ibapgbissau.org/index.php/areas-protegidas> (Acedido a 26 de abril de 2018).
- INE (Instituto Nacional de Estatística). (2015). *Guiné-Bissau em números 2015*. Bissau: INE.
- Jiang, Y., Nie, L. W., Huang, Z. F., Jing, W. X., Wang, L., Liu, L., & Dai, X. T. (2011). Comparison of complete mitochondrial DNA control regions among five Asian freshwater turtle species and their phylogenetic relationships. *Genetics and Molecular Research*, 10(3), 1545-1557.
- Karibuhoye, C. (2004). *Mammal conservation status and prospects for community-based wildlife management in coastal Guinea-Bissau, West Africa*. Dissertação de doutoramento, Georg-August-Universität Göttingen, Alemanha.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., *et al.* (2012). Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.

- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111-120.
- Kingdon, J., & Gippoliti, S. (2008). *Chlorocebus sabaues*. Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da UICN 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T136265A4267012.en> (Acedido a 6 de maio de 2019).
- Kopp, G. H., Fischer, J., Patzelt, A., Roos, C., & Zinner, D. (2015). Population genetic insights into the social organization of Guinea baboons (*Papio papio*): Evidence for female-biased dispersal. *American Journal of Primatology*, 77(8), 878-889.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Lehman, S., & Fleagle, J. (2006). *Primate biogeography*. Nova Iorque: Springer Science+Business Media.
- Lehman, S., Sussman, R. W., Phillips-Conroy, J., & Prince, W. (2006). Ecological biogeography of primates in Guyana. Em: S. Lehman, & J. Fleagle (Eds.), *Primate biogeography* (pp. 105-130). Nova Iorque: Springer Science & Business Media.
- Lewison, R., & Pluháček, J. (2017). *Hippopotamus amphibius*. Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da UICN 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-2.RLTS.T10103A18567364.en> (Acedido a 6 de maio de 2019).
- Li, J., Cui, Y., Jiang, J., Yu, J., Niu, L., Deng, J., Shen, F., *et al.* (2017). Applying DNA barcoding to conservation practice: A case study of endangered birds and large mammals in China. *Biodiversity and Conservation*, 26(3), 653-668.
- Liu, Z., Ren, B., Wu, R., Zhao, L., Hao, Y., Wang, B., Wei, F., *et al.* (2009). The effect of landscape features on population genetic structure in Yunnan snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus bieti*) implies an anthropogenic genetic discontinuity. *Molecular Ecology*, 18(18), 3831-3846.
- Lyra, M. L., Haddad, C. F. B., & Azeredo-Espin, A. M. L. de. (2017). Meeting the challenge of DNA barcoding Neotropical amphibians: Polymerase chain reaction optimization and new COI primers. *Molecular Ecology Resources*, 17(5), 966-980.
- Madeira, J. P. (2016). Bijagos Archipelago: Impacts and challenges for environmental sustainability. *InterEspaço: Revista de Geografia e Interdisciplinaridade*, 2(5), 291-305.
- Matsuda, I., Tuuga, A., & Higashi, S. (2009). Ranging behavior of proboscis monkeys in a riverine forest with special reference to ranging in inland forest. *International Journal of Primatology*, 30(2), 313-325.
- MAVA (MAVA Fondation Pour la Nature). (2018). *Bijagos Islands in Guinea Bissau*. Disponível em: <http://mava-foundation.org/about-us/our-story/bijagos-islands-in-guinea-bissau/> (Acedido a 26 de abril de 2018).

- Meyer, C. P., & Paulay, G. (2005). DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*, 3(12), 1-10.
- Minhós, T., Wallace, E., Ferreira da Silva, M. J., Sá, R., Carmo, M., Barata, A., & Bruford, M. W. (2013). DNA identification of primate bushmeat from urban markets in Guinea-Bissau and its implications for conservation. *Biological Conservation*, 167, pp. 43-49.
- Minhós, T., Chikhi, L., Sousa, C., Vicente, L. M., Ferreira da Silva, M., Heller, R., Casanova, C., *et al.* (2016). Genetic consequences of human forest exploitation in two colobus monkeys in Guinea Bissau. *Biological Conservation*, 194, pp. 194-208.
- Morin, P. A., Wallis, J., Moore, J. J., Chakraborty, R., & Woodruff, D. S. (1993). Non-invasive sampling and DNA amplification for paternity exclusion, community structure, and phylogeography in wild chimpanzees. *Primates*, 34(3), 347-356.
- Mwale, M., Dalton, D. L., Jansen, R., De Bruyn, M., Pietersen, D., Mokgokong, P. S., & Kotzé, A. (2017). Forensic application of DNA barcoding for identification of illegally traded African pangolin scales. *Genome*, 60(3), 272-284.
- Myers, N. (1993). Tropical forests: The main deforestation fronts. *Environmental Conservation*, 20(1), 9-16.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.
- Oates, J. F., Butynski, T. M., Kingdon, J., Bearder, S., Pimley, E., & De Jong, Y. (2016a). *Perodicticus potto*. Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da UICN 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T91995408A91995190.en> (Acedido a 6 de maio de 2019).
- Oates, J. F., Gippoliti, S., & Groves, C. P. (2016b). *Cercopithecus campbelli*. Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da UICN 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T136930A92367772.en> (Acedido a 6 de maio de 2019).
- Oates, J. F., Gippoliti, S., & Groves, C. P. (2008a). *Cercopithecus petaurista* spp. *buettikoferi*. Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da UICN 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T4222A10677731.en> (Acedido a 6 de maio de 2019).
- Oates, J. F., Gippoliti, S., & Groves, C. P. (2008b). *Colobus polykomos*. Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da UICN 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T5144A11116648.en> (Acedido a 6 de maio de 2019).
- Oklander, L. I., Kowalewski, M. M., & Corach, D. (2010). Genetic consequences of habitat fragmentation in black-and-gold howler (*Alouatta caraya*): Populations from northern Argentina. *International Journal of Primatology*, 31(5), 813-832.

- QGIS Development Team. (2016). *QGIS Geographic Information System*. Open Source Geospatial Foundation.
- Reiner, F., & Simões, P. (1999). *Mamíferos selvagens da Guiné-Bissau*. Lisboa: Projeto Delfim, Centro Português de Estudos dos Mamíferos Marinhos.
- Rendigs, A., Radespiel, U., Wrogemann, D., & Zimmermann, E. (2003). Relationship between microhabitat structure and distribution of mouse lemurs (*Microcebus* spp.) in northwestern Madagascar. *International Journal of Primatology*, 24(1), 47-64.
- Roeder, A. D., Archer, F. I., Poinar, H. N., & Morin, P. A. (2004). A novel method for collection and preservation of faeces for genetic studies. *Molecular Ecology Notes*, 4(4), 761-764.
- Rowe, N., & Myers, M. (2016). *All the world's primates*. Charlestown: Pogonias.
- Sá, R. (2013). *Phylogeography, conservation genetics and parasitology of chimpanzees (Pan troglodytes verus) in Guinea-Bissau, West Africa*. Dissertação de doutoramento, Universidade Nova de Lisboa, Portugal.
- Salvig, J. C., Asbirk, S., Kjeldsen, J. P., & Rasmussen, P. A. F. (1994). Wintering waders in the Bijagos Archipelago, Guinea-Bissau 1992-1993. *Ardea*, 82, pp. 137-142.
- Seminoff, J. A. (2004). *Chelonia mydas*. Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da IUCN 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T4615.A11037468.en> (Acedido a 6 de maio de 2019).
- Shotake, T., Saijuntha, W., Agatsuma, T., & Kawamoto, Y. (2016). Genetic diversity within and among gelada (*Theropithecus gelada*) populations based on mitochondrial DNA analysis. *Anthropological Science*, 124(3), 157-167.
- Sorenson, M. D., & Quinn, T. W. (1998). Numts: A challenge for avian systematics and population biology. *The Auk*, 115(1), 214-221.
- Thomas, N. E. (2011). *Mitochondrial DNA variation of the lesser spot-nosed guenon (Cercopithecus petaurista) from the Canhabaque island, Bijogo Archipelago, West Africa*. Dissertação de bacharelato, Universidade de Cardiff, Reino Unido.
- Triant, D. A., & DeWoody, J. A. (2007). The occurrence, detection, and avoidance of mitochondrial DNA translocations in mammalian systematics and phylogeography. *Journal of Mammalogy*, 88(4), 908-920.
- Ukizintambara, T., & Thébaud, C. (2004). Assessing extinction risk in *Cercopithecus* monkeys. Em: M. E. Glenn, & M. Cords (Eds.), *The guenons: Diversity and adaptation in African monkeys* (pp. 393-409). Nova Iorque: Kluwer Academic/Plenum.
- UNDP (United Nations Development Programme). (2016). *Human Development Report 2016*. Disponível em <http://www.undp.org/content/undp/en/home/> (Acedido a 26 de abril de 2018).

- UNESCO (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization). (2006). *Réserve de Biosphère de l'Archipel des Bijagos*. Disponível em: <http://whc.unesco.org/en/tentativelists/5081/> (Acedido a 26 de abril de 2018).
- Valentini, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(2), 110-117.
- Whittaker, D. J., Morales, J. C., & Melnick, D. J. (2007). Resolution of the *Hylobates* phylogeny: Congruence of mitochondrial D-loop sequences with molecular, behavioral, and morphological data sets. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45(2), 620-628.
- Yang, C., Xiao, Z., Zou, Y., Zhang, X., Yang, B., Hao, Y., Moermond, T., *et al.* (2015). DNA barcoding revises a misidentification on musk deer. *Mitochondrial DNA*, 26(4), 605-612.

## Anexos



Figura A – Representação esquemática da metodologia de identificação molecular com base num fragmento do gene mitocondrial citocromo *b* (*cytb*). I – Coleção de amostras fecais no campo (continua na página seguinte).

### III. Amplificação por PCR e sequenciação

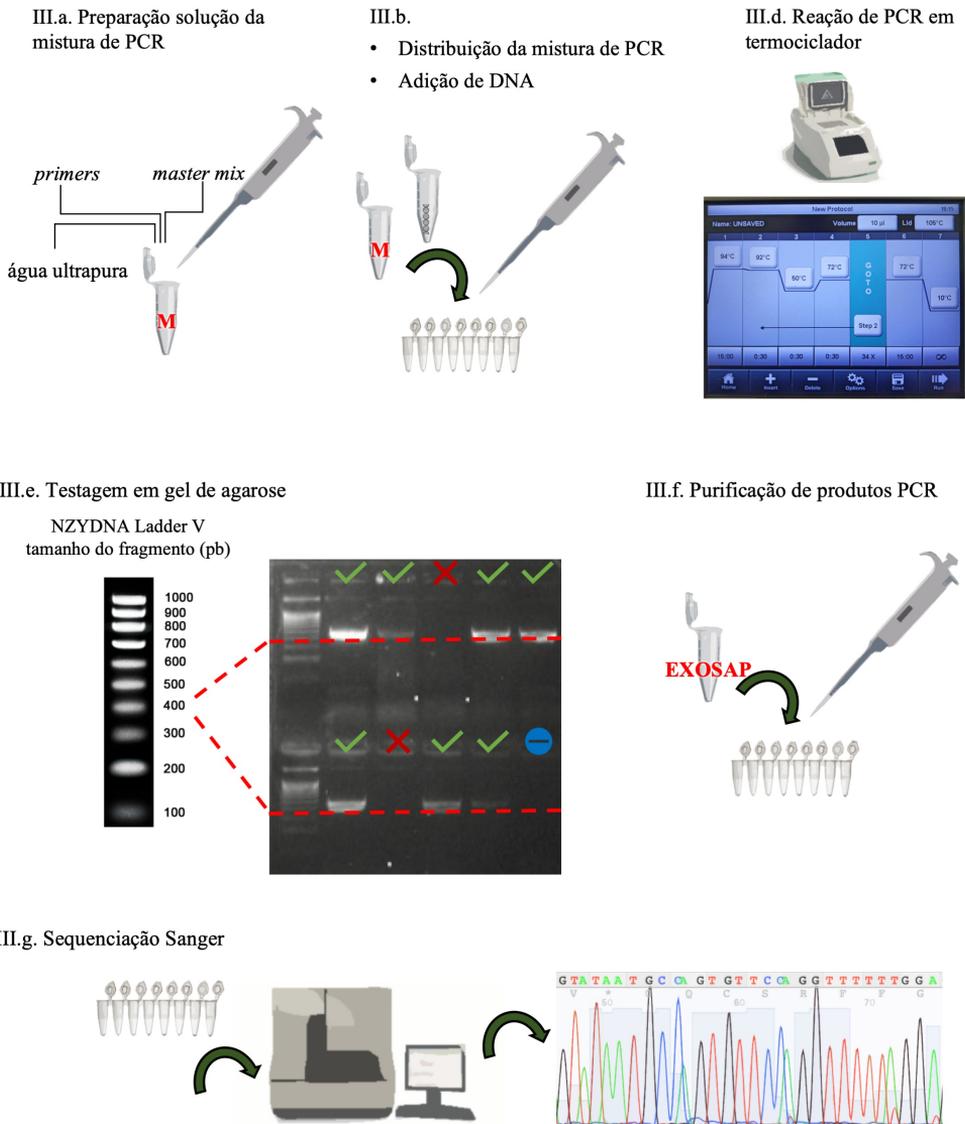


Figura A (continuação) – (II) Extração de *DNA* fecal; (III) Amplificação do marcador molecular, *cytb*, com recurso à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (RCP) (III.e. Testagem em gel de agarose: linhas a tracejado representam o tamanho esperado do fragmento de *cytb* em pares de base (pb); vistos verdes e cruzes vermelhas representam amostras com amplificação positiva e negativa, respetivamente; o controlo negativo encontra-se representado por um sinal matemático negativo azul) (continua na página seguinte).

