

IDENTIFICACIÓN DE MAMÍFEROS SILVESTRES Y CONFIRMACION DE SU PRESENCIA, POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC) DE SUS ÁCIDOS BILIARES FECALES

Ada V. Cazón¹ y Víctor D. Juárez¹

RESUMEN

El patrón de ácidos biliares fecales es específico para cada especie, las condiciones ambientales pueden modificar su concentración y no se afecta por la composición de la dieta. La Cromatografía de Capa Fina (TLC) permite determinar el patrón de ácidos biliares fecales de carnívoros. El objetivo de este trabajo fue confirmar la presencia de especies de mamíferos silvestres en el Parque Nacional El Rey (Salta), por TLC a través del patrón de ácidos biliares fecales. Se estudió el Orden Carnivora (*Puma concolor*, *Panthera onca*, *Herpiliurus yaguarundi*, *Leopardus pardalis*, *Felis wiedi*, *Procyon cancrivorus*), el Orden Artiodactyla (*Tayassu pecari*, *Mazama gouazoupira*) y el Orden Perissodactyla (*Tapirus terrestris*). Se extrajo un gramo de hez con benceno: metanol. Se sembró en placas de silicagel con ácidos biliares estándares, extractos de heces conocidas y de campo. Las placas fueron eluidas con tolueno: ácido acético: agua y reveladas con anisaldehído: ácido acético glacial: ácido sulfúrico. La presencia del ácido quenodeoxicólico en puma, permitió diferenciar sus heces de jaguar. En mayuato (*Procyon cancrivorus*) se observó la presencia de dos bandas desconocidas. En los herbívoros se dificultó la detección del patrón de ácidos biliares por la presencia de pigmentos vegetales. Se destaca la utilidad de esta técnica para el monitoreo de fauna silvestre por ser económica y simple. Su aplicación permitirá seguir realizando estudios de distribución y dinámica poblacional de especies de vida silvestre.

INTRODUCCIÓN

En la identificación de especies se utilizan técnicas muy variadas tales como la fórmula dentaria, huellas, elementos del cráneo, análisis de ADN, análisis organolépticos de heces, patrones cuticulares y medulares de pelos, entre otras.

Actualmente es posible distinguir especies mediante el patrón único de sus ácidos biliares fecales (Kritchovsky *et al.*, 1963; Haslewood, 1963; Major *et al.*, 1980; Capurro *et al.*, 1996; Fernández *et al.*, 1997; Cazón y Sühring, 1999) por medio de la Cromatografía en Capa Fina (TLC).

La técnica TLC junto con evidencias complementarias como huellas y otros signos, puede conducir a una identificación más efectiva (Fernández *et al.*, 1997), además sirve de base para estudios de tamaño, distribución y dieta de una población (García Esponda *et al.*, 2009).

Con las características fecales externas, los investigadores se enfrentan con la dificultad de determinar el material colectado a campo sólo en base a éstos caracteres, cuando las especies son

simpátricas como el puma (*Puma concolor*) y el jaguar (*Panthera onca*) (Fernández *et al.*, 1997; Cazón *et al.*, 2009).

Se ha sugerido que la disminución de los ácidos biliares de las heces por la acción atmosférica, puede incrementar el error de identificación. Sin embargo el análisis por TLC resultó útil para identificar heces colectadas con un tiempo desconocido desde la deposición (Fernández *et al.*, 1997), aunque se observó dificultad en la determinación cuando las heces experimentaron dilución de ácidos biliares por la acción atmosférica (Khorozyan *et al.*, 2007).

De todos los estudios realizados se ha encontrado que las heces de los carnívoros son fácilmente determinadas por TLC ya que sus dietas son pobres de material vegetal (fibras y pigmentos) las cuales pueden interferir en la determinación del patrón de ácidos biliares e inclusive distorsionar los resultados de la TLC (Quinn y Jackman, 1994).

La TLC del patrón de ácidos biliares fecales fue recientemente aplicada para la identificación de heces de *Xenarthra* (Araujo *et al.*, 2010), teniendo

¹ Cátedra de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Naturales, CIUNSa, Universidad Nacional de Salta. Av. Bolivia 5150, 4400, Salta.
Emails: cazon@unsa.edu.ar, vdjuarez@unsa.edu.ar

en cuenta que algunas especies de armadillos estudiadas son simpátricas, con características físicas externas similares. También permitió confirmar la identificación visual de heces encontradas en el campo en Armenia, atribuirles al leopardo (*Panthera pardus ciscaucasica*) y determinar áreas de distribución prioritarias (PLECA's) (Khorozyan *et al.*, 2007).

El objetivo de este trabajo fue identificar especies de mamíferos de fauna silvestre en el Parque Nacional El Rey, por determinación del patrón de sus ácidos biliares fecales usando la cromatografía en capa fina (TLC).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio

El estudio se realizó en el Parque Nacional El Rey (44.162 ha) ubicado en el Norte Andino de la Provincia de Salta- Argentina, en el Departamento de Anta (24° 45' Sur; 64° 40' Oeste).

Colecta de muestras

Las heces (N=127) fueron colectadas de caminos principales y secundarios durante tres campañas en el Parque Nacional El Rey. En planillas se registró la localización geográfica, fecha, hora, dimensiones de cada hez, cantidad de hez en el sitio y posible procedencia a partir del análisis de las características organolépticas (forma, color, olor, etc.), se fotografiaron las huellas asociadas y se realizaron moldes de yeso de las mismas. Los senderos secundarios fueron marcados y recorridos 100 m. Las muestras fueron colectadas con pinzas y guardadas en bolsas de papel.

Las heces de especies autóctonas (N=31) utilizadas como patrón, fueron colectadas de la Estación de Fauna Autóctona (EFA) perteneciente a la Secretaría de Medio Ambiente de la Provincia de Salta, ubicada en Finca las Costas-Salta. También se colectaron heces patrones de zoológicos y otras estaciones de cría.

Metodología de trabajo en laboratorio

Para determinar el patrón de ácidos biliares se usó la cromatografía en capa fina (TLC) desarrollada por Cazón y Sühling (1999). La siembra se realizó junto con los ácidos biliares estándares (cólico, quenodeoxicólico, desoxicólico, litocólico, dehidrocólico, cólico-metil ester, glicocólico, glicoquenodeoxicólico) y colesterol. Las placas se desarrollaron en cámaras de vidrio con mezcla de tolueno: ácido acético: agua (5:5:1,5, v/v). Se revelaron con anisaldehído: ácido acético glacial: ácido sulfúrico (0,5:50:1, v/v) y se secaron en estufa durante 15 minutos a 150 °C para producir la oxidación de las bandas.

Se determinó los valores de relación de frente ($R_f = \text{distancia recorrida por cada banda} / \text{distancia recorrida por el solvente}$) de cada banda en las diferentes corridas de las muestras analizadas. Además, se determinó la concentración relativa de los ácidos por la intensidad del color de las bandas.

RESULTADOS

Análisis organoléptico

El análisis organoléptico realizado en las heces colectadas en la EFA se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Características organolépticas de las heces colectadas de la EFA (n= número de heces). Media \pm Desvío Estándar.

Especie	Color	Forma	Largo (cm)	Ancho (cm)	Peso (g)
Pecarí de collar (n=3)	Gris-Verdoso	alargada	6,05 \pm 0.05	2,5 \pm 0.03	9.30 \pm 3.0
Tapir (n=5)	Marrón-verdoso	ovalada	10.9 \pm 2.0	5,8 \pm 0.2	38.15 \pm 20
Puma (n=5)	Marrón-Grisáceo	alargada	7,2 \pm 0.2	2,2 \pm 0.3	11,23 \pm 4.5
Mono caí (n=3)	Marrón oscuro	amorfa	-	-	2,6
Zorro gris (n=3)	gris	amorfa	-	-	3,53
Coipo (n=3)	negra	Cilíndrica	1.9 \pm 4.3	1,1 \pm 0.1	0,80 \pm 0.3
Corzuela parda (n=3)	Verde oscuro	Ovalada con punta en un extremo	1,2 \pm 0.1	0,6 \pm 0.1	11.45 \pm 0.8
Oso hormiguero (n=3)	Gris oscuro	Amorfa	-	-	8.61 \pm 0.9
Oso melero (n=3)	Marrón claro	Cilíndrica alargada	4.02 \pm 1.2	1,8 \pm 0.2	10.95 \pm 2.1

Las características organolépticas de las muestras colectadas en el Parque Nacional El Rey fueron comparadas con las heces colectadas en las estaciones de cría (Tabla 1), asimismo se

compararon y consideraron las características asociadas para determinar la procedencia de la hez (Figura 1 y Figura 2). Esta comparación permitió identificar el 70 % de las muestras.

Figura 1. Heces de mamíferos colectados en el Parque Nacional El Rey. A: férido. B: pecarí. C: tapir.

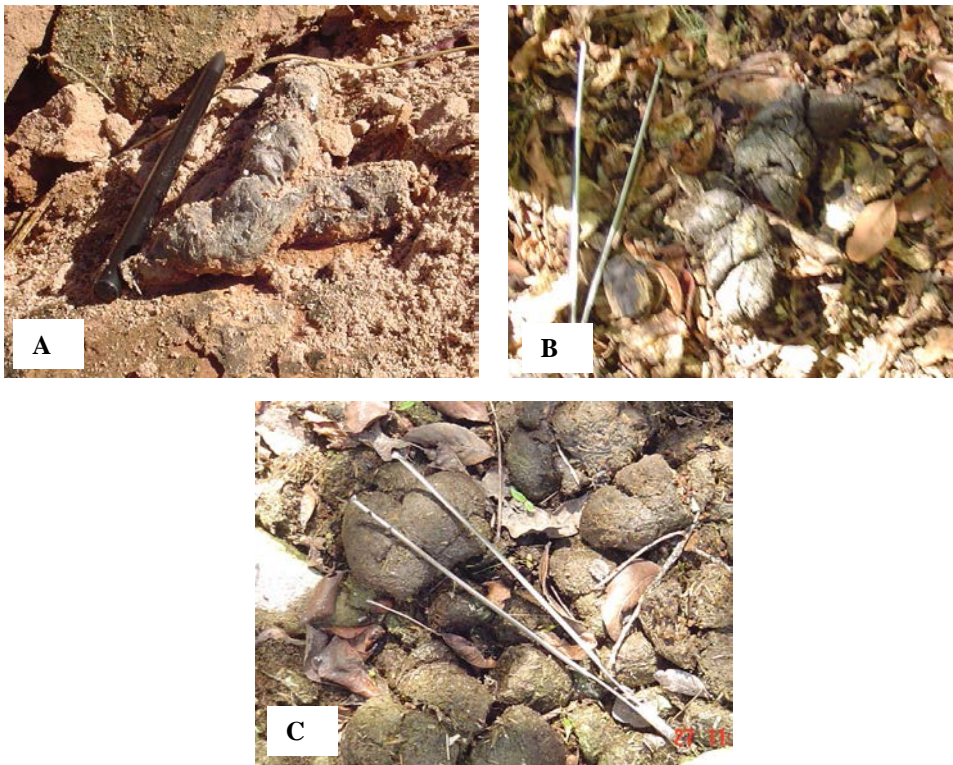
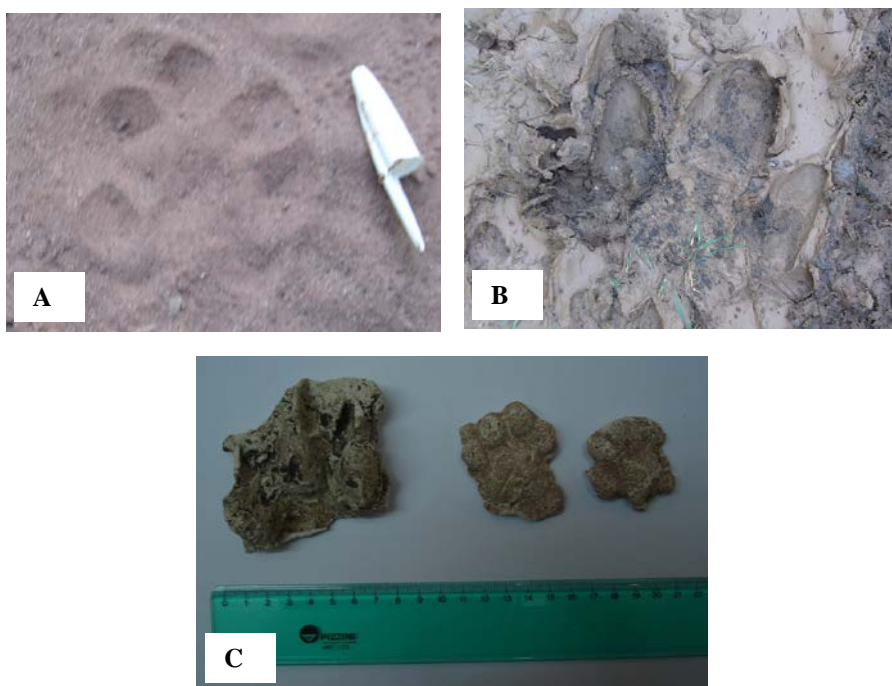


Figura 2. Huellas de mamíferos y moldes de yeso de huellas. A: Huella de férido. B: Huella de tapir. C: Moldes de yeso de féridos.



Identificación de carnívoros del Parque Nacional El Rey por TLC

Se realizó cromatografía de las muestras de félidos junto a ácidos biliares estándares y a félidos citados para el área de estudio: *Herpilurus yaguarundi* (eira), *Leopardus pardalis* (ocelote), *Felis wiedi* (margay), *Puma concolor* (puma) y *Pantera onca* (jaguar). El patrón de ácidos biliares fecales de las muestras de félidos encontradas en el

Parque Nacional El Rey correspondió a puma (Figura 3), deducido por la presencia del ácido quenodeoxicólico. También fueron identificados en el patrón de ácidos biliares ác. litocólico, ác. dehidrocólico, ác. deoxicólico, ác. cólico metil ester, ác. glicoquenodeoxicólico y colesterol. Se observó también la presencia de cuatro compuestos no identificados (Tabla 2).

Figura 3. Patrón de ácidos biliares de félidos encontrados en Parque Nacional El Rey.

1= ácido taurocólico. 2= ácido glicoquodeoxicólico. 3= ácido glicocólico. 4= ácido cólico. 5= ácido quenodeoxicólico. 6= ácido deoxicólico. 7= ácido dehidrocólico. 8= ácido litocólico. 9= colesterol. 10= punto mezcla de ácidos biliares. 11-12= *H yaguarundi*. 13= *L. pardales*. 14-15= *F. wiedi*. 16-17= *F. concolor*. 18-19= *P. onca*. 20= M46 PNR. 21= M69 PNR. 22= M83 PNR. 23= M86 PNR.

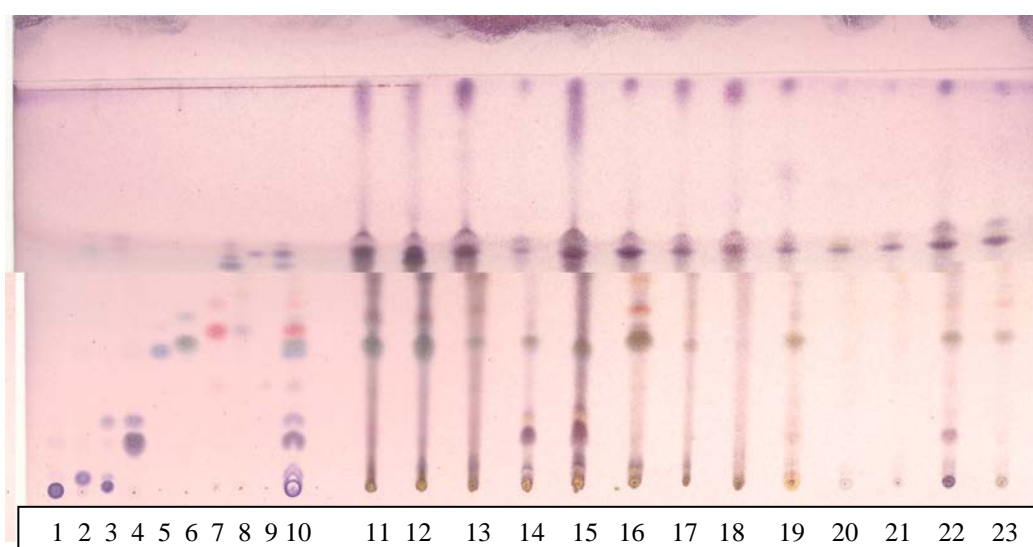


Tabla 2. Patrón de ácidos biliares de heces de puma colectadas en Parque Nacional El Rey.

Valor de $R_f \pm DE$, color y concentración relativa de las bandas. (xxx). Banda muy concentrada. (xx). Banda concentrada. (x). Concentración baja de la banda. N= número de repeticiones.

Ác. Biliares, Colesterol y compuestos no identificados (NN)	Puma (N=10)
Colesterol (violeta)	0.61 ± 0.04 (xxx)
Ác. litocólico (azul-violáceo)	0.56 ± 0.02 (xxx)
Ác. Dehidrocólico (naranja)	0.34 ± 0.01 (xx)
Ác. Deoxicólico (marrón-verdoso)	0.31 ± 0.01 (xx)
Ác. Quenodeoxicólico (azul-violáceo)	0.30 ± 0.02 (xx)
Ác. cólico (gris)	0.08 ± 0.02 (xx)
Ác. Glicoquenodeoxicólico (azul- violáceo)	0.03 ± 0.02 (x)

En el mayuato (*Procyon cancrivorus*) se determinó el perfil, detectándose los siguientes compuestos: ác. litocólico, ác. deoxicólico, ác.

quenodeoxicólico, ác. cólico, ác. glicodeoxicólico, ác. glicoquenodeoxicólico, dos compuestos desconocidos y colesterol (Tabla 3).

Tabla 3. Patrón de ácidos biliares fecales de Mayuato (*Procyon cancrivorus*) del Parque Nacional El Rey. Valor de $R_f \pm DE$, color y concentración relativa de las bandas. (xxx). Banda muy concentrada. (xx). Banda concentrada. (x). Concentración baja de la banda. N= número de repeticiones

Ác. Biliares, Colesterol y compuestos no identificados (NN)	Mayuato (N=10)
NN (violeta)	0.63 \pm 0.03 (x)
Colesterol (violeta)	0.62 \pm 0.03 (xx)
Ác. litocólico (azul-violáceo)	0.56 \pm 0.02 (x)
Ác. Deoxicólico (marrón-verdoso)	0.31 \pm 0.01 (x)
Ác. Quenodeoxicólico (azul-violáceo)	0.30 \pm 0.01 (x)
NN (azul)	0.24 \pm 0.02 (x)
Ác. Glicoquenodeoxicólico (azul- violáceo)	0.03 \pm 0.02 (x)

El análisis de los patrones de ácidos biliares entre puma y mayuato permitió diferenciarlos por la presencia de 2 (dos) bandas desconocidos, presentes en mayuato una con $R_f = 0.63$ (violeta) y otra con $R_f = 0.24$ (azul).

Análisis de heces de ungulados (corzuela parda, pecarí de collar y tapir) del Parque Nacional El Rey por TLC

Cuando se analizaron las heces de este grupo se observó en placa cromatográfica sin revelar (Figura 4 A) la presencia de pigmentos vegetales específicos en las especies analizadas pecarí de collar (*Tayassu pecari*), corzuela parda (*Mazama gouazoubira*) y tapir (*Tapirus terrestris*), que permitirían diferenciarlos. La placa sin revelar de las heces mostró que las especies de la EFA tanto de

tapir como de pecarí de collar presentaron bandas coloreadas de pigmentos vegetales muy diluidas, en comparación con las heces de las mismas especies colectadas en el Parque Nacional El Rey. También se destaca la presencia de un pigmento amarillo ($R_f = 0.539$) muy concentrado en corzuela, que permitiría diferenciarla de los otros ungulados estudiados.

Las tres especies estudiadas presentaron ácido litocólico y colesterol, en pecarí de collar se observó una banda color verde en forma de sombrero con R_f mayor que el colesterol. El ácido glicocólico se presentó en pecarí de collar y el ácido dehidrocólico en corzuela (Tabla 4). Además en ambas especies se encontraron dos compuestos desconocidos de color azul, con mayor concentración en pecarí de collar (Figura 4).

Figura 4. Placas cromatográficas sin revelar y reveladas de Ungulados (corzuela parda, pecarí de collar y tapir). Placa (A) muestra los pigmentos vegetales y Placa (B) se observa el solapamiento de los pigmentos con los ácidos biliares.

1= corzuela de la EFA, 2= Corzuela del Parque Nacional el Rey (muestra 19), 3= Corzuela del Parque Nacional el Rey (muestra 19) enriquecida con ácidos biliares estándares, 4= Pecarí de collar de la EFA, 5= Pecarí de collar (muestra 30) de Parque Nacional El Rey, 6= Pecarí de collar (muestra 30) de Parque Nacional El Rey enriquecida con ácidos biliares estándares, 7= Tapir de la EFA, 8= Tapir del Parque Nacional el Rey (muestra 14), 9= Tapir del Parque Nacional el Rey (muestra 14) enriquecida con ácidos biliares estándares, 10= Mezcla de ácidos biliares estándares.

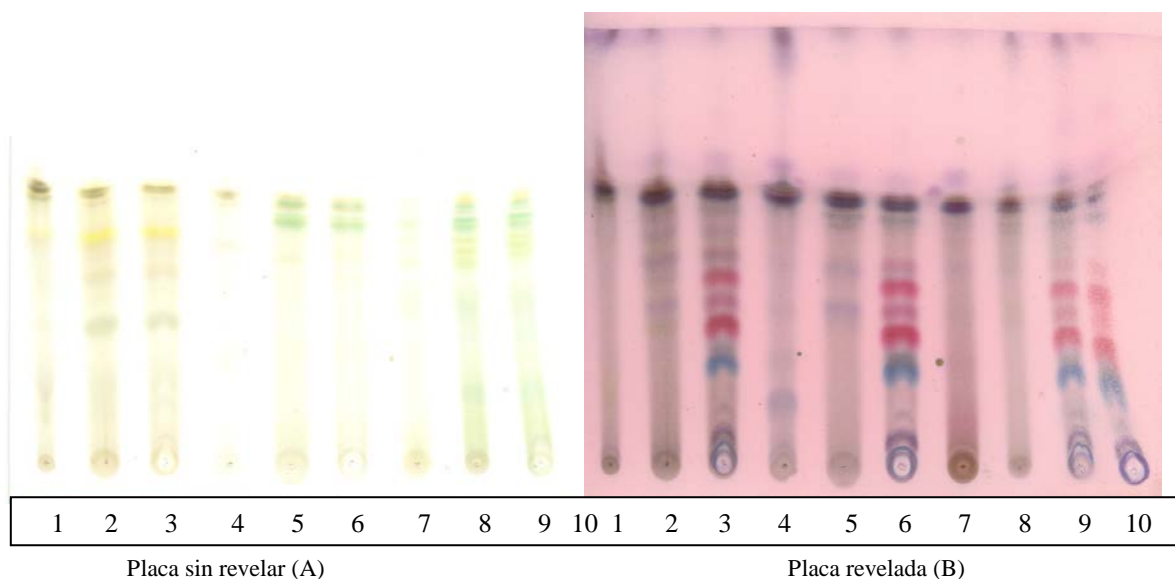


Tabla 4. Patrón de ácidos biliares de heces colectadas en Parque Nacional El Rey de pecarí de collar, tapir y corzuela parda. Valor de $R_f \pm DE$, color y concentración relativa de las bandas. (xxx). Banda muy concentrada. (xx). Banda concentrada. (x). Concentración baja de la banda. N= número de repeticiones.

Ác. Biliares, Colesterol y compuestos no identificados (NN)	Pecarí de collar (N=20)	Tapir (N=20)	Corzuela parda (N=20)
NN (verde)	0.68 \pm 0.05 (xxx)	0.68 \pm 0.03 (xx)	-
NN (violeta)	0.64 \pm 0.03 (xx)	-	-
Colesterol (violeta)	0.62 \pm 0.03 (xx)	0.62 \pm 0.03 (xx)	0.62 \pm 0.03 (xx)
Ác. litocólico (azul-violáceo)	0.56 \pm 0.02 (xx)	0.56 \pm 0.03 (xx)	0.56 \pm 0.02 (xx)
NN (azul-violáceo)	0.48 \pm 0.01 (xxx)	0.48 \pm 0.01 (x)	0.48 \pm 0.01 (x)
NN (azul-violáceo)	0.42 \pm 0.02 (xxx)	-	-
Ác. Dehydrocólico (naranja)	-	-	0.34 \pm 0.01 (x)
Ác. Quenodeoxicólico (azul-violáceo)	0.30 \pm 0.01 (xx)	-	-
NN (azul)	0.22 \pm 0.02 (xxx)	-	-
Ác. Glicocólico (azul-violáceo)	1.02 \pm 0.02 (x)	-	-
Ác. cólico (gris)	0.08 \pm 0.02 (xx)	-	-
Ác. Glicoquenodeoxicólico (azul- violáceo)	0.03 \pm 0.02 (xx)	-	0.03 \pm 0.02 (xx)

CONCLUSIONES

Con este trabajo se pudo discriminar la procedencia de 111 (87.4 %) muestras colectadas en el Parque Nacional El Rey, mediante determinación organoléptica y por TLC. Correspondieron 38 a tapir, 32 a corzuela parda, 24 a pecarí de collar, 13 a mayuato y 4 a puma.

Las heces de pecarí de collar, corzuela parda y de tapir son inconfundibles organolépticamente y por cromatografía. Cuando se usó cromatografía se observó un patrón característico de pigmentos vegetales, es así como se puede discriminar las heces de corzuela parda por la presencia de un pigmento amarillo intenso con R_f ligeramente inferior al del colesterol (Figura 4). Estos pigmentos vegetales, luego se solapan con las bandas de los ácidos biliares oxidadas, situación muy evidente en los patrones de tapir y corzuela que dejan visualizar muy pocos ácidos biliares en las condiciones de trabajo (Figura 4).

Las muestras de carnívoros correspondieron a puma y mayuato. El primero se discriminó de jaguar por la presencia del ácido quenodeoxicólico, y el segundo por la presencia de 2 (dos) bandas de ácidos biliares desconocidas (Tabla 2 y Tabla 3).

La técnica bioquímica TLC resulto fundamental para discriminar las heces afectadas por el paso del tiempo o el desgaste por la acción atmosférica, dado que esas muestras se encontraron sin formas o disgregadas o con un color diferente y no pudieron ser identificadas organolépticamente.

Se destaca la utilidad de esta técnica para el monitoreo de fauna silvestre por ser económica, simple y no invasiva. Se deberían proponer métodos que permitan aislar los pigmentos vegetales para poder visualizar mejor los ácidos biliares presentes en menor concentración.

Su aplicación permitirá seguir realizando estudios de distribución y dinámica población de especies de vida silvestre.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Consejo de Investigación de la UNSa. por el subsidio otorgado para la realización de este trabajo y al apoyo logístico de la Delegación Regional NOA de la Administración de Parques Nacionales y a la Secretaría de Medio ambiente de la Provincia ya que sin su autorización no podríamos haber realizado el proyecto.

LITERATURA CITADA

- Araujo, M., M. Ciuccio, A. Cazón y E. Casanave. 2010. Differentiation of Xenarthra (Mammalia) species thorough the identification of their fecal bile acid patterns: An ecological toll. *Revista Chilena de Historia Natural* **83**: 335-347.
- Capurro, A. F., A. J. Novaro y A. Travaini. 1996. Improved bile acid thin-layer chromatography to identify feces of neotropical carnivores. *Journal of Wild. Management* **61**:1424-1427.
- Cazón Narváez, A. y S. Sühling. 1999. A technique for extraction and thin layer chromatography visualization of fecal bile acids applied to neotropical felid scats. *Revista Biología Tropical* **47**(1-2): 245-249.
- Cazón, A., V. Juárez, J. Monjeau y M. Lilienfeld. 2009. Discriminación de heces de puma (*Puma concolor*) y jaguar (*Panthera onca*) por identificación y cuantificación de sus ácidos biliares: una técnica para el monitoreo de carnívoros silvestres. *Revista de Mastozoología Neotropical* **16**(2): 449-453. ISSN 0327-9383.
- Fernández, G., J. Corley y A. Capurro. 1997. Identification of cougar and jaguar feces through bile acid chromatography. *Journal Wild. Manage* **61**(2): 506-510.
- García Esponda, C., D. Carrera, G. Moreira, A. Cazón y L. De Santis. 2009. Microvertebrados depredados por *Leopardus pajeros* (Carnivora: Felidae) en el sur de la provincia de Mendoza, Argentina. *Mastozoología Neotropical* **16** (2): 455-457.
- Haslewood, P. 1963. Thin-layer chromatography of bile acids. *Journal of Lipid Research* **4**:11-16.
- Khorozyan, I.G., A. Cazón, A. Malkhasyan y A. Abramos. 2007. Using Thin-Layer Chromatography of fecal bile acids to study the Leopard (*Pantera pardus ciscaucasica*) population. *Biology Bulletin* **34** (4): 361- 366.
- Kritchevsky, D., D. Martak y G. Rothblat. 1963. Detection of bile acids Thin-Layer Chromatography. *Analytical Biochemistry* **5**: 388-392.
- Major, M., M. Johnson, W. Shaw Davis y TF Kellogg. 1980. Identifying scats by recovery of bile acids. *Journal Wildl. Manage* **44**:290-293.
- Quinn, T. y W. Jackman. 1994. Influence of diet on detection of fecal bile acids by thin- layer chromatography. *Journal Wildl. Manage* **58**: 295-299.