DANIEL BERNARDO CHABU

Determinação não-invasiva da concentração de metabólitos de
hormônios gonadais em excretas de ranfastídeos

São Paulo

2014

DANIEL BERNARDO CHABU

Determinação não-invasiva da concentração de metabólitos de
hormônios gonadais em excretas de ranfastídeos

São Paulo

2014

DANIEL BERNARDO CHABU

Determinação não-invasiva da concentração de metabólitos de hormônios gonadais em excretas de ranfastídeos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães

De acordo: _____

Orientador

São Paulo

2014

Obs: a versão original se encontra disponível na biblioteca da FMVZ-USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2977
FMVZ

Chabu, Daniel Bernardo
Determinação não-invasiva da concentração de metabólitos de hormônios gonadais em excretas de ranfastídeos / Daniel Bernardo Chabu. -- 2014.
84 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento Reprodução Animal, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães.

1. Reprodução. 2. Tucanos. 3. Testosterona. 4. Progesterona. 5. Estradiol. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Determinação não-invasiva da concentração de metabólitos de hormônios gonadais em excretas de ranfastídeos", protocolado sob o nº 2562/2012, utilizando 12 (doze) tucanos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 14/3/2012.

We certify that the Research "Non-invasive measurements of gonadal hormones metabolites concentrations in ranfastides droppings", protocol number 2562/2012, utilizing 12 (twelve) toucans, under the responsibility Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/14/2012.

São Paulo, 15 de março de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CHABU, Daniel Bernardo

Título: Determinação não-invasiva da concentração de metabólitos de hormônios gonadais em excretas de ranfastídeos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Este projeto foi realizado com a autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (**SISBIO**), de número: **34450-1**.

O projeto obteve o auxílio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), processo número **2012/05763-0**; que também concedeu a bolsa de mestrado, de processo número: **2012/05764-6**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fapesp pela concessão da bolsa e do auxílio para este projeto. Ao Parque das Aves, em especial à Dra. Anna, Yara e Mathias por me receber e permitir a realização deste projeto pesquisa.

Ao Mathias também, pelo interesse, sugestões e trocas constantes de ideias acerca do projeto. À Laiz por toda a ajuda durante as coletas e o posterior processamento das amostras. Também aos demais profissionais do hospital do Parque: Adriana, Flávia e Ewerton; e às estagiárias que por lá passaram enquanto eu realizava as coletas: Stephanie, Carolina Melchior, Fernanda e Carolina Lorieri.

Ao Sr. Francisco, tratador dos animais que participaram do experimento e a todos os outros tratadores que na época colaboraram com as atividades no Parque: Amarildo, Giovane, Sr. Mario, Paulinho, Pedro e Wanderlei; bem como às moças da cozinha das aves, responsáveis pelo preparo da ração de tucanos; e de forma geral a todos os funcionários do Parque.

Aos que de uma forma ou outra me auxiliaram com o projeto na FMVZ: Harumi, Ísis, Marcílio, Miguel e Priscila; e também a todos os meus amigos que participando diretamente ou não do projeto foram fontes essenciais de força, dos quais ainda não citados: Alana, Bruno, Carol, Jhennifer, Patrícia e Raquel.

Aos meus pais e familiares, por todo o apoio prestado até aqui e em diante; ao prof. Marcelo pelo exemplo e estímulo para trabalhar com animais selvagens; e à minha grande fonte de inspiração, que me permitiu diariamente continuar este trabalho e que motivou os meus futuros projetos de vida, à você Angelita.

RESUMO

CHABU, D. B. **Determinação não-invasiva da concentração de metabólitos de hormônios gonadais em excretas de ranfastídeos.** [Non-invasive measurements of gonadal hormones metabolites concentrations in ranfastides droppings]. 2014. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Pouco se conhece acerca dos aspectos fisiológicos da reprodução de ranfastídeos, sendo estas informações importantes para sua conservação e criação em cativeiro. Métodos não-invasivos permitem análises a longo prazo e em espécies pequenas, além de facilitar estudos em vida livre e minimizar o estresse causado aos animais. Este trabalho teve por intuito a dosagem de metabólitos de testosterona (machos e fêmeas), progesterona e estradiol (somente fêmeas) nas excretas de 3 casais de tucano-toco (*Ramphastos toco*) e 3 casais de tucano-de-bico-verde (*Ramphastos dicolorus*), dentro e fora da estação reprodutiva. Dados de observações comportamentais mostraram que os animais foram mais ativos durante a estação reprodutiva, porém comportamentos sociais e proximidade entre o casal se mostraram raros nas duas fases durante as seções de observação. Concentrações de metabólitos de progesterona foram obtidos para as duas espécies na Fase Reprodutiva, mas não foram detectados nos ensaios para a Fase Não-reprodutiva. Metabólitos de testosterona puderam ser dosados em ambas as espécies, nas duas fases, tanto em machos quanto em fêmeas; sendo que os resultados mostraram para a maioria dos indivíduos concentrações maiores na Fase Reprodutiva. Aumentos acima de variações basais de metabólitos de testosterona foram associados à ocorrência de posturas, que ocorreram durante a Fase Reprodutiva numa das fêmeas de *R. toco*. Não foram obtidos resultados de metabólitos de estradiol em nenhuma das duas espécies, possivelmente pela falha do anticorpo utilizado em reconhecer os metabólitos. No entanto, este trabalho mostrou que a técnica utilizada foi eficaz para dosagem de metabólitos de testosterona e progesterona nas excretas destas espécies, evidenciando variações sazonais nas concentrações hormonais e indicando uma relação entre a concentração de metabólitos de testosterona e as posturas.

Palavras-chave: Reprodução. Tucanos. Testosterona. Progesterona. Estradiol.

ABSTRACT

CHABU, D. B. **Non-invasive measurements of gonadal hormones metabolites concentrations in ranfastides droppings.** [Determinação não-invasiva da concentração de metabólitos de hormônios gonadais em excretas de ranfastídeos]. 2014. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Little is known about reproductive physiology in Ranfastidae and this knowledge is needed for the development of conservation programs and for successful captive breeding. Non-invasive methods allow long-term analysis in small animals, facilitate studies with free-living animals and minimize the handling stress. The purpose of this work was to measure the testosterone (males and females), progesterone and oestrogen (females) metabolites concentrations in the droppings of Toco-toucan (*Ramphastos toco*) and Red-billed-toucan (*Ramphastos dicolorus*), inside and outside the reproductive season. Three captive couples of each species were studied. Collected behavioural data showed that the animals were more active during reproductive season, but social behaviours and the couple proximity were rare in the two phases during the observation sessions. Progesterone metabolites concentrations could be obtained in the Reproductive Phase for both species, but weren't detected in the Non-reproductive Phase. Testosterone metabolites could be measured for both species in the two phases, in males and females; and the results showed higher concentrations in most of individuals in the Reproductive Phase. Concentrations of testosterone metabolites above basal levels were associated to egg laying, which occurred during Reproductive Phase in one of the *R. toco* females. Results of oestrogen metabolites concentrations could not be obtained in both species, probably because the fail of the antibody in detecting these metabolites. However, this work showed that the utilized technique was efficient to measure testosterone and progesterone metabolites in those species droppings, evidencing seasonal variations in hormonal concentrations and indicating a relationship between testosterone concentrations and oviposition.

Keywords: Reproduction. Toucans. Testosterone. Progesterone. Oestrogen.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Características biológicas de ranfastídeos.....	19
2.2	Características reprodutivas em aves.....	20
2.3	Métodos não-invasivos de monitoramento endócrino em aves	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Animais e ambiente	25
3.2	Coleta e conservação das amostras.....	28
3.3	Extração e dosagem dos metabólitos.....	32
3.4	Validações	35
3.5	Análise da variação diurna hormonal	35
3.6	Observação de comportamento e eventos reprodutivos	36
3.7	Análise estatística.....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Condições ambientais nos períodos experimentais	41
4.2	Análises gerais do comportamento	44
4.3	Variação diurna dos metabólitos de testosterona	49
4.4	Resultados hormonais principais	51
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
6	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICE	79

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A manutenção e reprodução em cativeiro desempenham importante papel como ferramentas auxiliares para a conservação das espécies. Estas ferramentas possibilitam a realização de pesquisas com diferentes espécies, agregando conhecimentos fundamentais para o sucesso de projetos de conservação.

Segundo Andriolo (2007), nesse contexto priorizam-se estudos como comportamento alimentar, reprodução orientada para manutenção da variabilidade genética no cativeiro e treinamento para possíveis reintroduções. Pode-se também salientar a importância da determinação das características fisiológicas, comportamentais e reprodutivas básicas de cada espécie.

Pertencentes à fauna nativa brasileira, os tucanos e araçarís são classificados dentro da família Ramphastidae e pouco ainda se conhece sobre suas características endócrino-reprodutivas. Mesmo entre as espécies que se reproduzem bem em cativeiro, não são descritas as características endócrinas do ciclo ovulatório e das posturas.

Figura 1 – Tucano toco (*Ramphastos toco*)

Fonte: CHABU, D. B.

Estas informações são de suma importância para a melhoria do manejo e para a potencial aplicação de técnicas de reprodução assistida, usadas como ferramenta no intento de melhorar o desempenho reprodutivo destas espécies. O estudo endócrino nas espécies silvestres como os ranfastídeos, depende da aplicação de técnicas não-invasivas que permitam estudos longitudinais sem a interferência de ações estressantes como colheitas de sangue e contenções físicas.

Desta forma, este trabalho teve por objetivo extrair e mensurar os metabólitos dos hormônios gonadais (progesterona e estradiol nas fêmeas; e testosterona nos machos e fêmeas) nos excretas do Tucano-toco (*Ramphastos toco*; figura 1) e Tucano-de-bico-verde (*Ramphastos dicolorus*; figura 2), dentro e fora da estação reprodutiva, descrevendo os perfis endócrinos de destas espécies de ranfastídeos.

Figura 2 – Tucano-de-bico-verde (*Ramphastos dicolorus*)

Fonte: CHABU, D. B.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características biológicas de ranfastídeos

Ramphastidæ é uma família da ordem dos Piciformes com ocorrência no bioma neotropical, do sul do México até o norte da Argentina (CUBAS, 2007). Compreende diversas espécies distribuídas em 5 gêneros, sendo popularmente chamados de tucanos ou arazáris.

De hábitos predominantemente florestais, sua dieta é essencialmente frugívora, sendo considerados entre os grandes dispersores de sementes, podendo também pregar (em especial os tucanos) qualquer animal pequeno, variando de insetos a ovos e filhotes de aves (SICK, 1997). Em vida livre ocorrem em casais, em bandos de animais jovens, ou em grupos familiares, formados pelos pais e filhotes de anos anteriores (HOYO; ELLIOTT; SARGATAL, 2002).

São espécies monogâmicas territorialistas, com o casal defendendo agressivamente seu território, motivo pelo qual Cubas (2007) recomenda que os viveiros de reprodução em cativeiro não permitam a visão de outros ranfastídeos. Entre o casal, no entanto, costumam ser gentis: ficam constantemente próximos, tocam-se e arrumam mutuamente a plumagem, trazem comida para o parceiro e dividem os cuidados com o ninho. Reproduzem-se principalmente no final da primavera e verão, quando a fêmea põe de 2 a 4 ovos pequenos e elípticos em fendas de árvores ou ninhos de pica-paus (SICK, 1997; CUBAS, 2007). A incubação ocorre em 15-18 dias e os filhotes nascem totalmente dependentes dos pais, sendo que casais inexperientes ou agressivos podem matar os próprios filhotes (CUBAS, 2007).

A maioria das espécies é considerada de menor preocupação pela lista vermelha da International Union for Conservation of Nature (IUCN), porém há uma pressão importante sobre elas. Segundo Cubas (2007), a caça e a coleta de filhotes de ranfastídeos nos ninhos para o tráfico de animais são ameaças à conservação das espécies, além de que o

desmatamento e a extração seletiva de árvores de grande e médio porte reduzem a oferta de ninho e alimento, contribuindo para a redução de suas populações.

Hoyo, Elliott e Sargatal (2002) fazem uma extensa descrição das características de Ranfastidæ e proveem detalhes sobre suas espécies.

2.2 Características reprodutivas em aves

Relativamente pouco se conhece sobre fisiologia reprodutiva em aves selvagens, sendo que a maior parte do conhecimento proveniente de estudos com aves domésticas, especialmente frangos. Detalhes sobre fisiologia reprodutiva podem ser encontrados em Etches (1996).

Em aves há somente uma fase folicular, não ocorrendo a formação de corpo lúteo; e os eventos de crescimento folicular e mudanças hormonais que culminam na ovulação são chamados de ciclo ovulatório (FROMAN; KIRBY; PROUDMAN, 2004). Hormônios estão entre os principais fatores reguladores da fisiologia reprodutiva, sendo estrógeno, progesterona e testosterona os principais esteróides produzidos pelas gônadas.

Em galinhas pode ser observado um aumento sérico da concentração de hormônios gonadais (testosterona – 10-6h; estradiol e progesterona – 6-4h) antes da ovulação, originado pelo aumento da secreção destes hormônios pelos maiores folículos (JOHNSON, 2000). Além disto, estes hormônios são essenciais no desenvolvimento das características sexuais secundárias, como plumagem e coloração, bem como para a exibição de comportamentos reprodutivos pelas aves.

É descrito para diversas aves uma marcada sazonalidade reprodutiva, iniciando a reprodução em resposta ao aumento do período de luz do dia (FROMAN; KIRBY; PROUDMAN, 2004). A duração do fotoperíodo também é relatada como o principal fator ambiental que

estimula a espermatogênese em galiformes (KIRBY; FROMAN, 2000). No entanto, animais que ocorrem na zona tropical e equatorial – incluindo-se aí os ranfastídeos, ao menos em parte da sua distribuição – não estão submetidos a grandes variações de duração do período de luminosidade e mesmo assim tendem a apresentar alguma sazonalidade (SICK, 1997; CUBAS, 2007).

Wikelski, Hau e Wingfield (2000), em trabalho na América Central com uma espécie de passeriforme, determinaram que a taxa de crescimento das gônadas era influenciada pelo aumento das chuvas, o que estava correlacionado com o aumento da disponibilidade de alimentos.

Dislich, em comunicação pessoal, relata que os casais de tucanos no Parque das Aves, em Foz do Iguaçu – Brasil, apesar de serem mantidos juntos o ano todo, iniciam os comportamentos reprodutivos em meados de outubro, com as posturas ocorrendo até dezembro/janeiro; e sem atividade reprodutiva no resto do ano. Além disso, endoscopias clínicas realizadas ocasionalmente nos animais do Parque mostraram gônadas aumentadas tanto em machos como em fêmeas, e com folículos mais desenvolvidos nas fêmeas, durante a fase reprodutiva, quando comparados à endoscopias fora dessa fase.

Dessa forma, é esperado que as concentrações dos hormônios gonadais em ranfastídeos sofram alterações sazonais em suas concentrações, estando mais baixas fora e mais altas dentro da estação reprodutiva.

2.3 Métodos não-invasivos de monitoração endócrina em aves

As dosagens hormonais possibilitam a determinação dos ciclos e o status reprodutivo, permitindo uma avaliação dos animais em diferentes situações e manejos, sendo em muitos casos, uma etapa importante na conservação das espécies. Quando realizadas no soro ou plasma sanguíneo, encontram-se várias dificuldades, desde o volume das amostras que

poderiam ser coletadas, até a própria representatividade destas amostras, uma vez que, sendo necessariamente pouco freqüentes devido ao estresse das colheitas, representariam apenas poucos momentos dentro do período de variações das concentrações.

O próprio estresse das colheitas pode influenciar na concentração dos hormônios e seus metabólitos. Goymann (2002) relata que o manuseio pode influenciar a mensuração dos andrógenos, foco de seu estudo, e cita o trabalho de Wingfield, Vleck e Moore (1992) na determinação de que o manuseio causa estresse. Uma possibilidade que tem se tornado muito interessante é a análise não-invasiva pela dosagem de metabólitos de hormônios esteróides nos excretas.

Vários são os trabalhos que incluem a mensuração dos metabólitos de hormônios gonadais em excretas de aves de forma não-invasiva: com galo doméstico (*Gallus gallus*) (COCKREM; ROUNCE, 1994); “kakapo” (*Strigops habroptilus*) (COCKREM; ROUNCE, 1995); ganso-comum-ocidental (*Anser anser*) (HIRSCHENHAUSER; MÖSTL; KOTRSCHAL, 1999); canário (SOCKMAN; SCHWABL, 1999); cartaxo-europeu (*Saxicola torquata rubicola*) (GOYMANN, 2002); ferreirinha-comum (*Prunella modularis*) (LANGMORE; COCKREM; CANDY, 2002); três espécies de coruja (*Strix varia*; *Bubo virginianus*; e *Strix occidentalis caurina*) (WASSER; HUNT, 2005); kiwi-marrom (*Apteryx mantelli*) (JENSEN; DURRANT, 2006); ibis-branco (*Eudocimus albus*) (ADAMS et al., 2008); falcão-americano (*Falco sparverius*) (PEREIRA; GRANZINOLLI; DUARTE, 2009); abetarda-gigante (*Ardeotis kori*) (PENFOLD et al., 2013); abetarda-comum (*Otis tarda*) (BAUTISTA et al., 2013); ararajuba (*Guaruba guarouba*) (SINHORINI, 2013); e êider-de-óculos (*Somateria fischeri*) (ELLSWORTH et al., 2014).

Quando as excretas são usadas para análise dos hormônios, a colheita de amostras não influencia muito o comportamento, e múltiplas amostras podem ser obtidas de um mesmo indivíduo (GOYMANN, 2005) sem promover o estresse da contenção, o que é interessante para todos os animais, ainda mais quando se trata de uma espécie ameaçada. Da mesma forma viabiliza trabalhos de campo, nos quais a contenção repetida dos animais é inviável. Outra vantagem é que em geral flutuações periódicas encontradas no plasma sanguíneo são suavizadas nas excretas (TOUMA; PALME, 2005).

Como descrito também por Touma e Palme (2005), recentemente, esta técnica não-invasiva tem sido estabelecida em um crescente número de espécies, variando de animais de laboratório, companhia e de produção, até animais selvagens (em zoológicos e a campo).

Devem, no entanto, ser levados em consideração alguns fatores: a taxa metabólica, influenciando na metabolização e excreção dos hormônios; a dieta do animal, que influencia na quantidade das excretas e consequentemente na concentração dos metabólitos, e na própria capacidade de detecção do teste, bem como em sua validade biológica.

Segundo Klasing (1998) em aves, fibras dietéticas aumentam o tempo de passagem intestinal e ao mesmo tempo aumentam o bolo fecal. Da mesma forma, outros fatores que afetam a quantidade de fezes e tempo de passagem, como por exemplo o parasitismo gastrointestinal, podem influenciar a concentração dos metabólitos. Goymann et al. (2006) encontrou concentrações significativamente menores em fezes de aves mantidas a 5°C do que a 22°C, associando este fator com o volume de fezes, que foi maior nas aves mantidas em temperatura mais baixa, uma vez que elas comeram mais em função de sua demanda energética aumentada.

Palme (2005) explica que por conta do metabolismo e excreção dos esteróides diferirem significativamente entre espécies, e às vezes mesmo entre os sexos, esses métodos não-invasivos devem ser rigorosamente validados para cada espécie antes da aplicação.

Assim como os ensaios convencionais para hormônios no plasma, cada ensaio para mensurar metabólitos de esteróides nas excretas requer etapas de validação analítica para demonstrar paralelismo, acurácia e precisão; e Chard (1995) provê excelentes descrições dessas validações analíticas (GOYMANN, 2005). O mesmo autor comenta ainda que é necessário mais de um tipo de validação, por exemplo, a fisiológica, para provar que o anticorpo é capaz de detectar os metabólitos do hormônio em questão.

Como descrito no trabalho de Touma e Palme (2005) a validação fisiológica pode ser realizada induzindo farmacologicamente mudanças nos níveis hormonais circulantes e avaliando o quanto essas mudanças refletem nas concentrações de metabólitos mensuradas nas fezes. Além disso, é argumentado que fortes correlações entre os níveis encontrados no plasma e as de seus metabólitos nas fezes indicam que o ensaio aplicado é válido. Os próprios

autores reconhecem, no entanto, que em espécies ameaçadas ou de difícil manejo uma validação fisiológica rigorosa pode não ser possível, ressaltando-se assim a importância da validação biológica.

A validação biológica é necessária para dizer se as variações de metabólitos dosadas possuem alguma relevância biológica (TOUMA; PALME, 2005), ou seja, se elas se correlacionam com outras variações observáveis e biologicamente esperadas nos animais, como a atividade comportamental reprodutiva, a postura e incubação, entre outros.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e ambiente

Foram estudados 12 animais, sendo: 3 casais de tucano-de-bico-verde (*Ramphastos dicolorus*) e 3 casais de tucano-toco (*Ramphastos toco*), todos adultos, com diferentes idades, origens e sem históricos reprodutivos; cujas informações estão compiladas no quadro 1, incluso na próxima página. Com exceção dos discriminados na tabela, os casais foram formados nas datas de entrada no recinto, especificamente para o experimento, sem nenhuma experiência reprodutiva prévia.

Todo o experimento ocorreu no “Foz Tropicana - Parque das Aves”, empreendimento privado localizado no município de Foz do Iguaçu, Paraná – Brasil, nas coordenadas 25°36’50’’S/54°28’57’’W, com altitude média de 215m.

Criado em 1994 com intento àquela época de ser um zoológico dedicado à conservação dos animais, hoje é uma das duas únicas instituições brasileiras associadas à World Association of Zoos and Aquariums (WAZA). Localizado em área de floresta úmida subtropical da região, seus objetivos vão da educação ambiental, pesquisa, trabalhos de reintrodução à reprodução de aves em cativeiro, sendo atualmente o maior parque de aves da América Latina.

Os animais que participaram do experimento foram alojados numa bateria de recintos construída pelo Parque das Aves exclusivamente para reprodução de ranfastídeos, numa área sem visitação. Sendo integrados no meio da mata, os recintos (figura 3) respeitam os requisitos legais para as espécies, além de permitirem o voo, com medidas aproximadas de 3m frente, 10m de comprimento e 5m de altura. Incluem diversos poleiros de diferentes formatos e tamanhos e plantas frutíferas plantadas em seu interior; fundo natural de terra/areia e folhas, além um lago para água e banho e do chuveirinho (ligado por alguns minutos à tarde nos dias muito quentes); além de um corredor externo elevado na altura dos ninhos, permitindo a verificação dos mesmos sem a entrada no recinto com escadas.

Quadro 1 – Informações dos Animais

Animal Experimental	Nºs dos indivíduos	Origem e recebimento dos animais	Entrada no recinto	Saída do recinto*	Observações
Toco 1 – fêmea (T1F)	LT2243	CETAS Lorena 14/11/2008	24/12/2012	21/06/2013	Óbito em 22/06/2013
	LT3559 ¹	Mata Ciliar 30/08/2013	08/10/2013	-	-
Toco 1 – macho (T1M)	LT2300	CETAS Goiás 10/02/2009	24/12/2012	-	Esteve em outro recinto entre 30/09 e 07/10/2013
Toco 2 – fêmea (T2F)	LT2839	CRAS-PET 26/05/2011	21/04/2013	-	-
Toco 2 – macho (T2M)	LT3256	Zoo Bauru 23/10/2012	21/04/2013	-	-
Toco 3 – fêmea (T3F)	LT3259	Zoo Bauru 23/10/2012	19/12/2012	-	-
Toco 3 – macho (T3M)	LT2178	PE São Carlos 22/10/2008	19/12/2012	-	-
Bico-verde 1 – fêmea (V1F)	LT1776 ²	Zoo Santur 10/03/2006	19/12/2012	-	Esteve internada entre 09/08 e 21/08/2013
Bico-verde 1 – macho (V1M)	LT2125 ²	Força Verde 28/06/2008	19/12/2012	-	Esteve internado entre 10/08 e 21/08/2013
Bico-verde 2 – fêmea (V2F)	LT3020	CRAS-PET 08/07/2012	19/12/2012	17/04/2013	Óbito
	LT3390	CRAS-PET 05/02/2013	22/04/2013	29/04/2013	Óbito 30/04/2013
	LT3387	CRAS-PET 05/02/2013	29/04/2013	22/06/2013	Óbito; esteve internada entre 26/05 e 08/06/2013
	LT3507	CETAS Tijucas 17/05/2013	23/06/2013	-	Esteve internada entre 30/10 e 12/11/2013
Bico-verde 2 – macho (V2M)	LT2096	Zoo Santur 06/05/2008	19/12/2012	-	-
Bico-verde 3 – fêmea (V3F)	LT2811 ³	CETAS PUC-PR 23/03/2011	19/12/2012	-	-
Bico-verde 3 – macho (V3M)	LT693 ³	Pol. Amb. Fl. 28/02/2003	19/12/2012	09/06/2013	Óbito
	LT3504	CETAS Tijucas 17/05/2013	14/06/2013	-	-

1 - outra fêmea foi tentada no mesmo dia com este macho, sem sucesso, pois estava sendo agredida

2 - casal formado desde abril/2010

3 - casal formado desde junho/2012

* - todos os casais foram desmanchados após o experimento e os animais foram retirados dos recintos em 27 de janeiro de 2014, com exceção das fêmeas LT3507 (óbito em 05/01/2014), LT2811 (óbito em 07/01/2014) e do macho LT3504 (óbito em 06/01/2014)

Figura 3 – Recintos de reprodução de ranfastídeos no Parque das Aves

Fonte: CHABU, D. B.; Parque das Aves

Legenda: **(a)** vista da bateria de recintos pela frente; **(b)** vista interna de um dos recintos; **(c)** corredor externo para verificação dos ninhos; **(d)** vista interna do ninho a partir da janela de inspeção; **(e)** detalhe de animal saindo do ninho

A alimentação era fornecida duas vezes ao dia (8:30 e 14:30) em bandejas, ficando à disposição dos animais durante o dia, só sendo retiradas ao final da tarde (17:30). Era servida uma ração úmida específica para tucanos formulada e preparada no próprio Parque, acompanhada de mamão e banana picados. Esta dieta era a mesma para todos os casais e foi mantida constante durante todo o período de coleta.

A manutenção dos recintos e limpeza dos lagos era normalmente feita ao final da manhã, de forma esporádica. Também era colocado raramente enriquecimento ambiental

alimentar (banana verde inteira, casca de ovo cozida ou neonato de rato vivo); e nos dias muito quentes, era ligado o chuveirinho por alguns minutos no meio da tarde, para refrescar os animais.

Foram levantadas as seguintes informações climáticas locais durante os períodos de coleta:

- fotoperíodo (via aplicativo Sun Seeker 3.2.1 Lite);
- quantidade de chuva diária (via pluviômetro do Parque das Aves);
- temperaturas máxima, mínima e média diárias (via plotagem de Metar para SBFI);

Também foram anotadas a inclinação solar (aplicativo Sun Seeker), temperatura, pressão e nebulosidade (plotagem de Metar) durante os momentos de observação de comportamento.

3.2 Coleta e conservação das amostras

As coletas foram realizadas em dois períodos, sendo o primeiro fora da estação reprodutiva – 23/04/2013 a 23/06/2013 – e o segundo dentro da estação reprodutiva – 30/09/2013 a 28/11/2013 – conforme a sazonalidade apresentada pelos tucanos no Parque das Aves. Foram coletadas amostras diárias para as fêmeas e três vezes por semana para os machos, excetuando-se em dias com chuva, nos quais não era possível coletar.

Todas as amostras do experimento principal foram coletadas sempre pela manhã. Para assegurar a procedência das amostras (se são originárias do macho ou da fêmea do casal), foi fornecido logo pela manhã, antes da ração habitual, uma quantidade de ração de tucano produzida no Parque misturada com substâncias corantes inertes de cor diferente para o macho e para a fêmea. Com o objetivo de garantir a correta administração dos corantes para os diferentes sexos, as “bolinhas coloridas” eram administrados diretamente no bico de cada animal pelo experimentador (figura 4).

Figura 4 – Procedimento de coletas

Fonte: RODRIGUES, F. P.; Parque das Aves

Legenda: **(a)** e **(b)** distribuição das bolinhas coloridas para os animais; **(c)** limpeza das excretas antigas no chão do recinto; **(d)** coleta das excretas; **(e)** excretas de um casal.

Uma prévia habituação dos animais já definidos ao procedimento e treinamento do experimentador foi realizada em novembro/dezembro de 2012, bem como um experimento piloto para a determinação das quantidades de corante e ração a ser fornecidas para cada animal (descrito no Apêndice), objetivando obter uma quantidade de excretas adequada no menor tempo e com menor uso de corante possível para todos os animais.

Dessa forma estipulamos nosso protocolo para coleta:

A ração a ser corada era separada em dois bolos de 150g da mistura total feita na cozinha do Parque, sendo fornecida aos animais nos dois dias subsequentes. Um dos bolos recebia 15-18 gotas do corante alimentar líquido "rosa" da Arcolor®; e o outro recebia 18-21 gotas do corante alimentar líquido "azul" da Arcolor®. Cada um dos bolos era homogeneizado e repartido em 60 bolinhas coloridas de aproximadamente 2,5g cada.

Sempre às 8:00 no horário da zona (não foi adotado o horário legal por conta da mudança de horário de verão) se iniciava o fornecimento das bolinhas coloridas, mantendo-se sempre a mesma sequência de casais, da esquerda para a direita, olhando pela frente dos recintos. Após entrar em cada recinto as bolinhas eram dadas diretamente no bico dos animais (rosa para as fêmeas e azul para os machos, na quantidade de 3-4 bolinhas para cada tucano-de-bico-verde e 5-7 bolinhas para cada tucano-toco). Imediatamente após o casal ingerir as bolinhas o recinto era varrido, eliminando as excretas antigas. Então seguia para o próximo recinto. Esta etapa se completava sempre entre 8:17-8:20.

Os pratos com o alimento normal da manhã eram então preparados e colocados nos recintos até às 8:30, pelo próprio experimentador – o tratador continuava sendo responsável pela alimentação da tarde, à exceção dos dias em que houve coleta à tarde (ver seção “Análise da variação diurna”). Isto era feito para padronizar o horário em que os animais recebiam o prato de comida, uma vez que no experimento piloto se verificou que a ingestão subsequente de alimento influenciou no tempo e qualidade das primeiras excreções.

Às 9:30, na mesma sequência de casais que o fornecimento das bolinhas, as excretas começavam a ser recolhidos nos recintos com auxílio de palitos de madeira individuais, tentando coletar o menos possível de contaminantes, como areia, terra ou pedaços de folhas. Coletavam-se todas ou ao menos parte de todas as excreções encontradas, as quais eram

transportadas em toalhas de papel até o hospital do Parque, onde então eram acondicionadas em criotubos previamente identificados e mergulhadas em nitrogênio líquido até entre 9:50-10:00 (Figura 5).

Figura 5 – Acondicionamento das amostras

Fonte: (a) e (d), CHABU, D. B.; (b) e (c), RODRIGUES, F. P.; Parque das Aves

Legenda: **(a)** excretas coletados; **(b)** envasando as amostras em criotubos pré-identificados; **(c)** congelando em nitrogênio líquido; **(d)** amostras envasadas nos criotubos – rosas: fêmeas, verdes: machos.

Em momento algum houve qualquer tipo de contenção física ou química dos animais para o experimento, tendo por princípio a realização de avaliação não-invasiva.

3.3 Extração e dosagem dos metabólitos

A extração dos metabólitos hormonais presentes nas amostras de excretas (figura 6) foi realizada em dezembro de 2013 no Laboratório de Dosagens Hormonais da FMVZ-USP pela técnica de uma passagem em metanol 80% descrita por Palme (2005), seguindo o seguinte protocolo:

- os criotubos contendo as amostras eram retirados do nitrogênio líquido, abertos e imediatamente posicionados nas placas de liofilização, passando por um período de 24h congelados em freezer a -30°C , então indo para o liofilizador por um período de também 24h;
- uma vez liofilizadas as amostras eram mantidas à temperatura ambiente, sendo pesada uma alíquota de $0,2\text{g}\pm 0,005\text{g}$ para o processo de extração;
- em cada tubo de ensaio contendo a amostra pesada eram adicionados 5mL de metanol a 80% (previamente diluído), sendo os tubos fechados e levados logo em seguida ao agitador por um período de 15 minutos a 2500rpm;
- saindo do agitador, os tubos iam diretamente para a centrífuga, por um período de 15 minutos a 2200rpm;
- então uma alíquota de 1mL era pipetada (em duplicata) em um novo criotubo já identificado, o qual permanecia aberto no ambiente para evaporação dos solventes, resultando apenas nos extratos secos das amostras.

A opção por esta técnica se deu em decorrência da necessidade de que o processo de extração seja o mais simples possível, já que como afirmado no mesmo trabalho, etapas adicionais no processo aumentam a variação das concentrações determinadas; além de este método ter alta taxa de recuperação.

Após a extração os tubos secos contendo os metabólitos foram enviados para o Laboratório de Bioquímica da Universidade de Medicina Veterinária de Viena, Áustria, onde foram mensurados sob a supervisão do Prof. Dr. Rupert Palme.

Figura 6 – Extração dos metabólitos das amostras

Fonte: CHABU, D. B.; Laboratório de Dosagens Hormonais - FMVZ - USP

Legenda: **(a)** liofilização; **(b)** pesagem das excretas liofilizadas; **(c)** passagem no agitador; **(d)** pipetando os extratos

As concentrações dos metabólitos hormonais foram quantificadas pela metodologia de ensaio imunoenzimático baseando-se nos procedimentos descritos por Palme e Möstl (1994), Palme e Möstl (1997), Möstl e Palme (2002) e Möstl, Rettenbacher e Palme (2005). De forma resumida, o ensaio imunoenzimático detecta os metabólitos através da sua ligação com anticorpos grupo-específicos para o hormônio aderidos à uma placa. Sendo esta reação feita em competição com antígenos padrão similares ligados previamente a uma enzima (a qual

será responsável por gerar alguma alteração induzida no meio), é possível quantificar indiretamente a quantidade relativa de metabólitos nas amostras.

Foram utilizados os anticorpos 5 β -pregnane-3 α -ol-20-one 3HS: BSA para mensurar metabólitos de progesterona (SCHWARZENBERGER et al., 1996); 17 β -oestradiol-17-HS: BSA para mensurar metabólitos de estrógeno e 5 α -androstane-3 α -ol-17-one-HS:BSA para mensurar metabólitos de testosterona (PALME; MÖSTL, 1994), realizando-se o seguinte protocolo:

- microplacas de 96 poços foram preparadas com uma solução de 50 μ g de proteína A (Sigma P-7837) dissolvidas em 25 ml de solução tampão (Na₂CO₃: 1,59g/L; NaHCO₃: 2,93g/l; pH 9,6) marcadas com o anticorpo diluído em solução de marcação (Na₂CO₃: 1,59g/L; NaHCO₃: 2,93g/l; pH 9,6);

- as placas foram incubadas a 4°C por 16 horas e após este período, foram submetidas a um ciclo de três lavagens com solução de lavagem (NaCl: 87,66 g/L; Tween-20: 0,5 %);

- os extratos foram ressuspensos, conjugados com a enzima horseradishperoxidase e diluídos em solução tampão (NaH₂PO₄.H₂O: 5,421 g/L; Na₂HPO₄: 8,662 g/L; NaCl: 8,7 g/L; albumina sérica bovina: 1,0 g/L; pH 7,0);

- foram então pipetados nas placas, que foram seladas e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente;

- após a incubação, as placas foram lavadas, secas e receberam o substrato cromógeno, sendo a reação cromógena parada com 10% de solução de H₂SO₄ 96%;

- a densidade ótica resultante foi medida em espectrofotômetro MultiPROBE®, sendo que todas as amostras foram dosadas em duplicatas.

3.4 Validações

Foram realizadas a validação laboratorial pelo teste de paralelismo e a validação biológica:

✓ Validação Laboratorial

O teste do paralelismo foi feito pela execução de uma regressão linear simples entre a curva de diluição de cada ensaio e uma curva de diluição semelhante realizada com amostra de alta concentração do metabólito sendo testado.

✓ Validação Biológica

Esta validação foi realizada pela constatação da existência de variação sazonal das concentrações de metabólitos nas excretas conforme o esperado (concentrações mais altas na estação reprodutiva), bem como pela associação entre as concentrações de metabólitos encontradas e a existência de comportamentos diretamente relacionados à reprodução, como por exemplo a postura de ovos (Ver detalhes do protocolo na seção “Observação de comportamento e eventos reprodutivos”).

3.5 Análise da variação diurna hormonal

Como estudo complementar ao experimento, foram analisadas amostras para verificação de possíveis variações diurnas nas concentrações dos metabólitos hormonais nas fases matutina e vespertina. O protocolo de colheita de amostras foi idêntico ao do experimento principal (ver detalhes na seção “Coleta das amostras”) e obedeceu ao seguinte formato:

Foram coletadas e identificadas duas amostras diárias, sendo uma na fase da manhã e outra na fase da tarde, por dois dias na estação não-reprodutiva (somente machos) e dois na estação reprodutiva (machos e fêmeas). Para que pudessem ser coletadas estas amostras, o alimento com corante alimentar foi fornecido uma segunda vez nestes dias, logo antes da alimentação da tarde, e a coleta feita do modo habitual. Essas amostras tiveram os metabólitos de testosterona extraídos e dosados. Foi feita então uma comparação das médias individuais e a partir dos valores obtidos nas fases “manhã” e “tarde”.

3.6 Observação de comportamento e eventos reprodutivos

As observações (figura 7) se iniciaram juntamente com as coletas da fase não-reprodutiva, em abril de 2013. Nos primeiros dias foi realizada apenas uma observação *ad libitum* com anotação dos eventos ocorridos, acostumando os animais com a presença do experimentador sentado em frente aos recintos; e possibilitando a definição prévia das categorias de comportamento usadas para as observações posteriores. Então se iniciou a coleta de dados para análise com o uso de amostragem pontual no tempo com intervalo fixo sob os preceitos descritos em ALTMANN (1974) como “Instantaneous Sampling”, gerando uma estimativa da percentagem de tempo gasta em cada atividade por cada indivíduo.

Contingenciadas pela rotina de coletas, as observações eram feitas sempre entre 10:00 e 11:30, não tendo sido determinado o pico de atividade ideal para as mesmas. As observações eram feitas em sessões de 20 minutos para cada animal, com intervalos de 30 segundos entre pontos, sendo possível amostrar 4 animais simultaneamente. Foi mantida sempre a mesma sequência de observação dos casais, alternando diariamente a ordem para que ao final todos os animais tivessem sido observados o mesmo número de vezes no mesmo momento sequencial. Assim obtivemos em torno de 100 horas-casal observadas tanto dentro como fora da época reprodutiva.

Logo após estas observações era feita diariamente a checagem dos ninhos para verificação de posturas, seguindo-se sempre uma mesma ordem de recintos. Esta checagem

era realizada por fora dos recintos, através do corredor suspenso, abrindo-se brevemente a porta externa do ninho e olhando seu interior, sem gerar grandes distúrbios nos animais do recinto. Este procedimento foi realizado inclusive fora da estação reprodutiva para que houvesse a habituação dos animais e passasse a não ser um estresse para os mesmos durante a estação reprodutiva.

Figura 7 – Observação de comportamento

Fonte: (a) e (c), CHABU, D. B.; (b), RODRIGUES, F.; Parque das Aves

Legenda: **(a)** sentado em frente aos recintos realizando escaneamento; **(b)** preenchendo planilha de escaneamento instantâneo; **(c)** ovo tucano toco dentro do ninho.

Foram adotadas as seguintes categorias de estados comportamentais individuais:

- **Inativo (In)**: animal parado, seja acordado ou dormindo, ou com apenas pequenos movimentos (movimentos lentos e sem locomoção, por exemplo, olhar para o lado);
- **Ativo (A)**: animal desempenhando qualquer atividade intensa (que não se enquadrem nas categorias descritas abaixo), como locomoção ou vocalização;
- **Conforto (L)**: animal limpando/organizando as penas ou o bico, com movimentos característicos destas atividades;
- **Alimentação (Ca)**: animal comendo ou bebendo, seja no prato ou fora dele;
- **Social (S)**: animal interagindo com o parceiro no recinto, incluindo interações agressivas;
- **Ninho (N)**: animal dentro do ninho, tanto ativo como inativo, ou pousado na entrada do ninho;
- **Não-visível (x)**: animal não encontrado no momento, por exemplo, escondido atrás da folhagem.

Também era anotada para o casal, em cada ponto de amostragem, a informação **Juntos (J)**, indicando a proximidade entre ambos; sendo que eram arbitrariamente considerados “juntos” os animais que estivessem ao alcance do bico do parceiro.

As informações numéricas obtidas pelo escaneamento foram compiladas e transformadas em percentagem do tempo despendido por cada animal em cada categoria de estado comportamental. Foram então analisadas em conjunto para criar um quadro geral do comportamento do grupo de indivíduos, dentro e fora da estação reprodutiva.

É comentado em literatura (SICK, 1997; HOYO et al., 2002) que nas horas mais quentes do dia os animais ficam parados, às vezes dormindo, e isto é condizente com a experiência do

Parque, na qual os animais são menos ativos durante a tarde, especialmente no verão por conta do calor em Foz do Iguaçu (motivo pelo qual é essencial o chuveirinho nos recintos). Com relação a isto foi feito um estudo paralelo com as médias de 9 dias de escaneamento dos animais, dentro e fora da estação, comparando as fases da manhã e tarde. As observações à tarde foram feitas entre 15:30 e 16:30, com o mesmo procedimento das observações da manhã.

Para as análises do experimento, no entanto, foram consideradas somente as observações da manhã, quando os animais estavam mais ativos, e o que evitaria um possível viés em decorrência de menor atividade no verão por conta da temperatura mais alta à tarde.

As categorias **Social**, **Ninho** e **Juntos** foram ainda analisadas individualmente para cada animal/casal, por sua relevância reprodutiva. Isto se deu em consonância ao relatado por Dislich (comunicação pessoal)¹ de que os casais de tucanos do Parque das Aves na época reprodutiva passam a ficar mais juntos, aceitando a presença do outro ao seu lado; e eventualmente engajando em comportamentos sociais como “allopreening” e alimentação do parceiro; além de passarem a frequentar mais os ninhos disponíveis nos recintos.

Ocorrências gerais que ocorreram durante os períodos experimentais que poderiam interferir no comportamento foram também anotadas, como manutenção dos recintos, trocas de animais (ver quadro 1, na seção “Animais e ambiente”).

3.7 Análise estatística

Foram realizadas as análises estatísticas descritivas para as concentrações encontradas de todos os metabólitos hormonais de cada animal, com o cálculo de mediana e alcance para representação gráfica, uma vez que estas não passaram no teste de normalidade de D’Agostino & Pearson.

1 – Informações fornecidas por Mathias Dislich no Parque das Aves, Foz do Iguaçu, 2012

Estas concentrações no entanto puderam ser transformadas, animal por animal, para respeitar as premissas de normalidade, homogeneidade das variâncias e ausência de outliers (transformações diversas: $1/Y$; $\log(Y)$; $1/\sqrt{Y}$), sendo então comparadas as médias dos dados transformados pelo teste T de Student para dentro e fora da estação reprodutiva – somente nos animais que permaneceram no experimento nas duas fases; aqueles que só participaram de uma delas não tiveram suas médias comparadas com o seu substituto nesta etapa, sendo analisado separadamente.

Procedimento similar foi realizado para a categoria **Juntos** de comportamento, considerando-se a estimativa dos valores percentuais diários neste estado comportamental. Estes dados de comportamento não puderam ser transformados, sendo analisados pelo teste de comparação de distribuições de Kolgomorov-Smirnov, individualmente para cada casal.

Num segundo momento, as concentrações de cada metabólito foram comparadas entre machos e fêmeas, de cada espécie separadamente, durante cada uma das fases – incluindo-se aqui os animais que não participaram das duas fases –, usando-se para tanto o teste de Kruskal-Wallis, já que desta forma os valores não puderam ser todos transformados para respeitar as premissas.

Os demais dados de comportamento foram analisados para toda a população – na média percentual de todos os animais – de forma descritiva, comparando-se as fases da manhã e tarde; e reprodutiva e não-reprodutiva (somente manhã). A categoria **Inativo** foi então escolhida como parâmetro para a análise estatística do comportamento geral dos animais. Para garantir a validade dos valores médios da população, foi realizada estatística descritiva dos valores individuais desta categoria, os quais passando no teste de normalidade de D'Agostino & Pearson, tiveram suas médias percentuais comparadas por ANOVA de duas vias seguida de teste de análises múltiplas de Tukey.

As concentrações de metabólitos de testosterona foram também graficamente comparadas com as datas das posturas, sendo que para tanto foi calculado o limiar de variações basais a partir da média mais dois desvios-padrão dos valores das concentrações, eliminando-se os que estivessem acima e repetindo o mesmo cálculo até que todos os valores usados estivessem abaixo deste limite.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir estão os principais resultados obtidos para as diferentes avaliações propostas neste trabalho. Optamos por já os apresentar juntamente com a sua discussão por motivos de praticidade e fluidez no encadeamento de ideias, uma vez que o trabalho enfoca diversas questões, com abordagens e resultados distintos.

4.1 Condições ambientais nos períodos experimentais

O primeiro período experimental ocorreu entre 23/04/2013 e 23/06/2013, num total de 62 dias experimentais representando a Fase Não-reprodutiva (NR).

Esta fase ocorreu no outono em Foz do Iguaçu, com variação negativa do fotoperíodo (gráfico 1) e incluiu o solstício de inverno, numa média de 10h47m de luz. Houve também grande precipitação durante o período, o que não era o esperado da região para a época, chovendo ao todo 407,0mm, distribuídos conforme visto no gráfico 1. A média de temperatura na fase Não-reprodutiva foi de 18,2°C, com variação negativa ao longo do período, conforme gráfico 2.

O segundo período experimental ocorreu entre 30/09/2013 e 28/11/2013, num total de 60 dias experimentais representando a Fase Reprodutiva (R).

Esta fase ocorreu na primavera, com variação positiva do fotoperíodo e média de 13h de luz; além de precipitação total de 231,7mm, distribuídos conforme gráfico 3. A média da temperatura foi de 23,4°C, com variação positiva ao longo do período, conforme gráfico 4.

Gráfico 1 – Fotoperíodo e pluviosidade na Fase Não-reprodutiva

Gráfico 2 – Temperaturas mínima, máxima e média, com regressão linear da média ao longo da Fase Não-reprodutiva

Gráfico 3 – Fotoperíodo e pluviosidade na Fase Reprodutiva

Gráfico 4 – Temperaturas mínima, máxima e média, com regressão linear da média ao longo da Fase Reprodutiva

4.2 Análises gerais do comportamento

As observações de comportamento mostraram que de forma geral a atitude dos animais era influenciada pelos outros e pelas condições externas ao recinto. A agitação gerada pela vocalização de um indivíduo, presença de um animal de vida livre nas adjacências ou interferência humana era refletida na atitude geral de todos os animais contactantes.

Entre as espécies no entanto a resposta a um estímulo possivelmente estressante (por exemplo, um caminhão descarregando areia ou pedra imediatamente em frente aos recintos) era diferente. Numa situação como esta, os tucanos toco tendiam a ficar agitados, voando de um lado para o outro do recinto e vocalizando; já os tucanos-de-bico-verde voavam para o fundo do recinto e se escondiam na folhagem, permanecendo quietos.

Diferenças individuais no comportamento eram evidentes, com animais mais agitados do que outros, preferências quanto ao uso de áreas do recinto (inclusive do ninho) e atitude com relação a outros animais e ao experimentador. As observações mostraram também que a atividade geral de cada indivíduo variava de um dia para o outro, não mantendo necessariamente valores próximos em cada categoria na sequência dos dias experimentais. Nota-se a ampla variação inclusive nas médias diárias de todos os animais, como pode ser visto nos gráficos 5 e 6.

No entanto, a ANOVA com teste de comparações múltiplas de Tukey mostrou que as médias de cada animal das percentagens de tempo gastas na categoria **Inativo** não apresentaram diferenças significativas entre si nem fora da estação reprodutiva (exceto para os animais V2M e V1F), nem na estação reprodutiva (exceto para os animais T1M e T3F). Desta forma, consideramos os valores médios nesta categoria como representativos da população e os utilizamos para as análises do comportamento geral dos animais.

Os gráficos 5 e 6 sugerem também um aumento dos valores da categoria **Inativo** durante a Fase Não-reprodutiva e uma diminuição durante a Fase Reprodutiva. Essa aparente variação não foi particularmente correlacionada com nenhum fator, porém poderia ter diversas interpretações, seja como consequência da variação de temperatura ou fotoperíodo ou ainda como um viés metodológico.

Gráfico 5 – Médias de *R. toco* e *R. dicolorus* (fêmeas e machos), em porcentagem do tempo, nas categorias da observação de comportamento ao longo dos dias experimentais na Fase Não-reprodutiva (dados em barra colocados apenas para ilustrar sua baixa percentagem)

Gráfico 6 – Médias de *R. toco* e *R. dicolorus* (fêmeas e machos), em porcentagem do tempo, nas categorias da observação de comportamento ao longo dos dias experimentais na Fase Reprodutiva (dados em barra colocados apenas para ilustrar sua baixa percentagem)

A questão do viés pode ser endereçada porque as observações foram realizadas sempre no mesmo horário do dia, o que é apenas uma convenção humana. Estudos mostram no entanto que diversas espécies, incluindo aves, ajustam seu comportamento diário baseadas no posicionamento do Sol (ROZHOK, 2008; GOODENOUGH; MCGUIRE; JAKOB, 2010). Mantendo o mesmo horário para as observações, as mesmas foram realizadas em momentos com diferentes posicionamentos do Sol ao longo dos períodos experimentais – variando de 035,42º de azimute com +31,74º de elevação até 088,52º de azimute com +59,80º de elevação –, podendo significar diferentes momentos no “dia” das aves.

Os gráfico 7 mostra as médias gerais de todos os animais da percentagem de tempo em todas as categorias nas Fases Não-reprodutiva e Reprodutiva, respectivamente, sendo que o Teste t com correção de Welch para diferentes desvios-padrão mostrou haver diferença significativa ($p=0,001$) entre as médias da categoria **Inativo**, significando que os animais ficaram mais ativos na estação reprodutiva durante as sessões de observação.

Gráfico 7 – Médias de *R. toco* e *R. bicolorus* (fêmeas e machos) da percentagem de tempo gasta em cada categoria durante a observação nos dois períodos experimentais

Com relação à variação diurna de comportamento, os animais foram como esperado mais ativos de manhã, também com diferença significativa nas médias da categoria **Inativo**

segundo teste t de Student. Isto se repetiu tanto na Fase Não-reprodutiva ($p < 0,0001$) como na Fase Reprodutiva ($p < 0,0001$), conforme visto nos gráficos 8 e 9.

Gráfico 8 – Médias de 9 dias de *R. toco* e *R. dicolorus* (fêmeas e machos) da percentagem de tempo gasta em cada categoria da observação de comportamento nas sessões de observação da manhã e tarde, fora da estação reprodutiva

Gráfico 9 – Médias de 9 dias de *R. toco* e *R. dicolorus* (fêmeas e machos) da percentagem de tempo gasta em cada categoria da observação de comportamento nas sessões de observação da manhã e tarde, na estação reprodutiva

A adaptação dos animais ao manejo das coletas se deu de maneira muito rápida, com vários animais aceitando prontamente as bolinhas na mão. Os que inicialmente não aceitavam passaram a aceitar em até 3 a 5 dias de habituação. Mesmo os animais mais agressivos deixaram de atacar ou ameaçar o experimentador, com apenas uma das fêmeas de tucano-de-bico-verde ainda demonstrando agressão algumas vezes. Curiosamente, essa fase de adaptação realizada em 2012 não perdeu o efeito quando começaram as coletas em 2013; e mesmo no segundo período experimental, meses depois que o manejo havia sido interrompido, os animais que já tinham sido habituados responderam imediatamente da forma esperada.

Da mesma forma, a habituação ao procedimento de checagem dos ninhos transcorreu de forma muito boa, apesar de o procedimento ter sido interrompido nos meses em que não houve coleta. Nas primeiras vezes os animais ficavam agitados e vocalizando, com os mais agressivos atacando o observador pela tela do recinto, assim que este se aproximava dos ninhos. Porém com a habituação os animais passaram a ficar mais calmos, frequentemente observando a pessoa que estava checando o ninho pela entrada do mesmo e por vezes, quando dentro do ninho, nem saindo do mesmo durante a checagem.

Somente uma das fêmeas (T3) realizou postura durante o experimento. Foi observado para ela uma mudança consistente em seu comportamento nos dias próximos à postura: durante o fornecimento das bolinhas coloridas ela não descia para pegar, aparentemente ignorava as bolinhas e a pessoa no recinto; ficava mais parada, como se estivesse mais “séria”, “concentrada”, mas não necessariamente dentro do ninho. Uma mudança na característica das excretas também era notável: as excretas apareciam mais escuras e granuladas, como se contivessem areia; além disso a fêmea defecava muito menos e sempre mais tarde (algumas coletas neste dia só puderam ser realizadas após às 11:30). Estas alterações, de comportamento e nas excretas ocorreram todas as vezes em que houve posturas, dentro de um dia antes do aparecimento de ovos até dois/três dias depois, quando a fêmea voltava ao comportamento normal, mesmo que o ovo ainda estivesse presente.

As fêmeas V1 e T2 também apresentaram essas mudanças comportamentais e nas excretas, apesar de não ter sido encontrado ovo nestes casos. Como será visto adiante, no

entanto, essas mudanças puderam ser correlacionadas com aumentos da concentração de metabólitos de testosterona, assim como no caso das posturas da T3.

4.3 Variação diurna dos metabólitos de testosterona

As médias com desvio-padrão individuais dos dois dias de coleta para comparação entre as concentrações de metabólitos de testosterona são mostradas nos gráficos 10, 11 e 12. Apesar de na Fase Reprodutiva, as concentrações dos machos parecerem maiores de manhã do que à tarde (não acontecendo com as fêmeas ou com os machos fora da estação reprodutiva), em nenhum dos casos pode ser demonstrada diferença estatística significativa. Isto, no entanto, poderia ser relacionado a pequena quantidade de dados obtidos.

Gráfico 10 – Médias e desvio-padrão das concentrações de metabólitos de testosterona nas excretas liofilizadas (mte) de cada macho de *R. toco* (T1, T2, T3) e *R. bicolorus* (V1, V2 e V3) nas fases da manhã (M) e tarde (T) durante a Fase Não-reprodutiva

Gráfico 11 – Médias e desvio-padrão das concentrações de metabólitos de testosterona nas excretas liofilizadas (mte) de cada macho de *R. toco* (T1, T2, T3) e *R. dicolorus* (V1, V2 e V3) nas fases da manhã (M) e tarde (T) durante a Fase Reprodutiva

Gráfico 12 – Médias e desvio-padrão das concentrações de metabólitos de testosterona nas excretas liofilizadas(mte) de cada fêmea de *R. toco* (T1, T2, T3) e *R. dicolorus* (V1, V2 e V3) nas fases da manhã (M) e tarde (T) durante a Fase Reprodutiva

4.4 Resultados hormonais principais

A seguir são apresentados em gráficos os resultados obtidos das análises de metabólitos hormonais (testosterona para machos e fêmeas e progesterona para fêmeas) nas excretas liofilizadas de cada animal, dentro e fora da estação reprodutiva, seguindo a ordem de casais (gráficos 13 ao 36, exceto 14, 18, 22, 26, 30 e 34). Os indivíduos que não participaram das duas fases foram considerados separadamente, não tendo sido comparadas as concentrações hormonais entre si; e a fêmea de tucano-de-bico-verde 2 não foi avaliada na Fase Não-reprodutiva por ter sido trocada várias vezes nesta fase.

São também mostrados graficamente os resultados em percentuais de tempo durante as sessões de observação de comportamento na categoria **Juntos** para cada casal (gráficos 14, 18, 22, 26, 30 e 34), tendo as diferenças sido analisadas estatisticamente. As categorias **Ninho** e **Social** foram apenas avaliadas descritivamente no texto, pois na maioria dos casos não obtiveram valores suficientes para uma análise estatística.

Médias com desvio-padrão das concentrações de metabólitos encontradas foram calculadas para cada espécie e sexo em cada uma das fases, sendo as de:

- progesterona nas fêmeas: *R. toco* - $6,16 \pm 8,30 \text{ ng/g}$ e *R. dicolorus* - $6,05 \pm 6,87 \text{ ng/g}$ (Fase Reprodutiva; não foram detectados valores na Fase Não-reprodutiva).

- testosterona nas fêmeas: *R. toco* - $2,47 \pm 2,68 \text{ ng/g}$ e *R. dicolorus* - $0,97 \pm 1,31 \text{ ng/g}$ (Fase Não-reprodutiva); *R. toco* - $3,99 \pm 5,23 \text{ ng/g}$ e *R. dicolorus* - $4,05 \pm 4,66 \text{ ng/g}$ (Fase Reprodutiva).

- testosterona nos machos: *R. toco* - $1,58 \pm 2,93 \text{ ng/g}$ e *R. dicolorus* - $0,80 \pm 1,00 \text{ ng/g}$ (Fase Não-reprodutiva); *R. toco* - $4,43 \pm 5,69 \text{ ng/g}$ e *R. dicolorus* - $8,87 \pm 9,92 \text{ ng/g}$ (Fase Reprodutiva).

No entanto, o teste de Kruskal-Wallis demonstrou haver diferença significativa ($p < 0,05$) entre os animais em todas as médias calculadas acima, as quais foram então consideradas como não representativas. Assim, nenhuma análise (inclusive a da variação diurna) foi realizada pela média dos animais, sendo somente considerado cada animal individualmente para a apresentação dos demais resultados e discussão.

Gráfico 13 – Mediana e alcance das concentrações de metabólitos de testosterona nas excretas liofilizadas (mte) do animal **Toco 1 – macho**, fora (NR) e dentro (R) da estação reprodutiva (letras diferentes indicam diferença estatística significativa)

Gráfico 14 – Distribuição com mediana e quartis evidenciados (quando possível) da percentagem de tempo em que o **casal Toco 1** passou junto fora (NR) e dentro (R) da estação reprodutiva durante as sessões de observação

Gráfico 15 – Mediana e alcance das concentrações de metabólitos de testosterona nas excretas liofilizadas (mte) do animal **Toco 1 – fêmea**, fora (NR) e dentro (R) da estação reprodutiva (indivíduos diferentes, sem comparação estatística)

Gráfico 16 – Mediana e alcance das concentrações de metabólitos de progesterona nas excretas liofilizadas (mpe) do animal **Toco 1 – fêmea**, na Fase Reprodutiva

Gráfico 17 – Mediana e alcance das concentrações de metabólitos de testosterona nas excretas liofilizadas (mte) do animal **Toco 2 – macho**, fora (NR) e dentro (R) da estação reprodutiva (letras diferentes indicam diferença estatística significativa)

Gráfico 18 – Distribuição com mediana e quartis evidenciados (quando possível) da percentagem de tempo em que o **casal Toco 2** passou junto fora (NR) e dentro (R) da estação reprodutiva durante as sessões de observação

Gráfico 19 – Mediana e alcance das concentrações de metabólitos de testosterona nas excretas liofilizadas (mte) do animal **Toco 2 – fêmea**, fora (NR) e dentro (R) da estação reprodutiva (letras diferentes indicam diferença estatística significativa)

Gráfico 20 – Mediana e alcance das concentrações de metabólitos de progesterona nas excretas liofilizadas (mpe) do animal **Toco 2 – fêmea**, na Fase Reprodutiva

Gráfico 21 – Mediana e alcance das concentrações de metabólitos de testosterona nas excretas liofilizadas (mte) do animal **Toco 3 – macho**, fora (NR) e dentro (R) da estação reprodutiva (letras diferentes indicam diferença estatística significativa)

Gráfico 22 – Distribuição com mediana e quartis evidenciados (quando possível) da percentagem de tempo em que o **casal Toco 3** passou junto fora (NR) e dentro (R) da estação reprodutiva durante as sessões de observação

Gráfico 23 – Mediana e alcance das concentrações de metabólitos de testosterona nas excretas liofilizadas (mte) do animal **Toco 3 – fêmea**, fora (NR) e dentro (R) da estação reprodutiva (letras diferentes indicam diferença estatística significativa)

Gráfico 24 – Mediana e alcance das concentrações de metabólitos de progesterona nas excretas liofilizadas (mpe) do animal **Toco 3 – fêmea**, na Fase Reprodutiva

Gráfico 25 – Mediana e alcance das concentrações de metabólitos de testosterona nas excretas liofilizadas (mte) do animal **Verde 1 – macho**, fora (NR) e dentro (R) da estação reprodutiva (letras diferentes indicam diferença estatística significativa)

Gráfico 26 – Distribuição com mediana e quartis evidenciados (quando possível) da percentagem de tempo em que o **casal Verde 1** passou junto fora (NR) e dentro (R) da estação reprodutiva durante as sessões de observação

Gráfico 27 – Mediana e alcance das concentrações de metabólitos de testosterona nas excretas liofilizadas (mte) do animal **Verde 1 – fêmea**, fora (NR) e dentro (R) da estação reprodutiva (letras diferentes indicam diferença estatística significativa)

Gráfico 28 – Mediana e alcance das concentrações de metabólitos de progesterona nas excretas liofilizadas (mpe) do animal **Verde 1 – fêmea**, na Fase Reprodutiva

Gráfico 29 – Mediana e alcance das concentrações de metabólitos de testosterona nas excretas liofilizadas (mte) do animal **Verde 2 – macho**, fora (NR) e dentro (R) da estação reprodutiva (letras diferentes indicam diferença estatística significativa)

Gráfico 30 – Distribuição com mediana e quartis evidenciados (quando possível) da percentagem de tempo em que o **casal Verde 2** passou junto fora (NR) e dentro (R) da estação reprodutiva durante as sessões de observação

Gráfico 31 – Mediana e alcance das concentrações de metabólitos de testosterona nas excretas liofilizadas (mte) do animal **Verde 2 – fêmea**, dentro (R) da estação reprodutiva

Gráfico 32 – Mediana e alcance das concentrações de metabólitos de progesterona nas excretas liofilizadas (mpe) do animal **Verde 2 – fêmea**, na Fase Reprodutiva

Gráfico 33 – Mediana e alcance das concentrações de metabólitos de testosterona nas excretas liofilizadas (mte) do animal **Verde 3 – macho**, fora (NR) e dentro (R) da estação reprodutiva (indivíduos diferentes, sem comparação estatística)

Gráfico 34 – Distribuição com mediana e quartis evidenciados (quando possível) da percentagem de tempo em que o **casal Verde 3** passou junto fora (NR) e dentro (R) da estação reprodutiva durante as sessões de observação

Gráfico 35 – Mediana e alcance das concentrações de metabólitos de testosterona nas excretas liofilizadas (mte) do animal **Verde 3 – fêmea**, fora (NR) e dentro (R) da estação reprodutiva (letras diferentes indicam diferença estatística significativa)

Gráfico 36 – Mediana e alcance das concentrações de metabólitos de progesterona nas excretas liofilizadas (mpe) do animal **Verde 3 – fêmea**, na Fase Reprodutiva

As dosagens de metabólitos de estradiol não foram bem sucedidas em nenhuma das duas fases. Acreditamos que isto tenha decorrido porque o anticorpo utilizado nos testes não foi capaz de detectar os metabólitos nestas espécies, já que a existência de metabólitos de testosterona e progesterona nos resultados mostraram que houve atividade gonadal e não ocorreram problemas com a conservação e processamento das amostras.

Nas dosagens de metabólitos de progesterona, apesar de terem sido encontrados valores mensuráveis na Fase Reprodutiva, não foram detectadas concentrações destes metabólitos na Fase Não-reprodutiva em nenhuma das fêmeas. Isto pode ter ocorrido pela baixa produção do hormônio nesta fase, uma vez que não havia atividade gonadal, sendo que a principal fonte de progesterona são os folículos em desenvolvimento (FROMAN; KIRBY; PROUDMAN, 2004).

As concentrações de metabólitos de testosterona foram significativamente maiores na Fase Reprodutiva do que na Fase Não-reprodutiva, exceto para os animais T3M, T2F e V3F. Isso é condizente com o esperado de que na estação reprodutiva os animais estivessem com as gônadas aumentadas, com maior produção de hormônios; e condiz com resultados de literatura que encontraram essa diferença sazonal, frequentemente relacionada ao período fértil das espécies (COCKREM; ROUNCE, 1995; HIRSCHENHAUSER; MÖSTL; KOTRSCHAL, 1999; GOYMANN, 2002; LANGMORE; COCKREM; CANDY, 2002; PEREIRA; GRANZINOLLI; DUARTE, 2009; PENFOLD et al., 2013; SINHORINI, 2013; ELLSWORTH et al., 2014).

Os resultados dos animais que não obtiveram variação significativa poderiam estar associados à uma característica individual dos mesmos ou a não terem entrado fisiologicamente na estação reprodutiva por algum motivo, como infertilidade, doença, troca de parceiro, entre outros. Penfold et al. (2013) relata que diferenças sazonais de testosterona só ocorreram nos animais férteis; e Hirschenhauser, Möstl e Kotrschal (1999) mostrou variações nas concentrações de metabólitos entre animais de diferentes grupos sociais e performances reprodutivas, além de comentar que a estimulação do parceiro é essencial para ocorrerem as mudanças sazonais características. O macho T3, no entanto, apesar de não apresentar diferença nas concentrações entre as fases, provou ser fértil e ter copulado com a fêmea, pois os ovos quebrados que puderam ser avaliados pelos veterinários do Parque da Aves comprovaram estar fecundados.

Já com relação ao comportamento, não foi encontrada diferença significativa dentro ou fora da estação com relação à percentagem de tempo que os animais passaram juntos durante as sessões de observação, exceto para os casais T1 e V3. E mesmo nestes casais, em que houve diferença, esta foi negativa, com os animais passando mais tempo juntos fora da estação. Isto não era o esperado, já que se supunha que durante a estação macho e fêmea ficassem mais próximos e mantivessem maior interação social (SICK, 1997).

A falta do comportamento **Juntos** poderia estar associada ao fato de os animais estarem presos em recintos, mas isto não justifica a falta de comportamentos sociais durante a fase reprodutiva. No entanto, mesmo sem diferença entre as fases, os casais formados a mais tempo (V1 e V3 fora da estação) mantiveram algum comportamento social. No caso dos casais V3 e T1, houve até redução no comportamento social da Fase Não-reprodutiva para a Fase Reprodutiva, o que pode estar associado ao fato de que os parceiros (a fêmea T1 e o macho V3) foram trocados entre os períodos experimentais.

Toda a questão acerca da adequada formação do casal é importante para a reprodução de espécies monogâmicas (ANDERSON, 1984; HIRSCHENHAUSER; MÖSTL; KOTRSCHAL, 1999). Dislich (comunicação pessoal) relata ainda que o ideal para a formação de casais de tucanos é a realização do “flocking”, no qual um indivíduo macho é colocado num recinto com um grupo de fêmeas e é permitido tempo para que eles se escolham e formem o casal, quando então começam a ficar agressivos com os outros animais e são retirados para um recinto separado de reprodução.

No caso deste trabalho, a formação da maioria dos casais ocorreu pouco tempo antes do início das coletas, sem o “flocking”, e ainda houve trocas de indivíduos entre as fases do experimento, com recolocação de novos indivíduos dias antes do início das coletas na Fase Reprodutiva. Assim, os animais podem não ter tido tempo e opção para parear propriamente, o que provavelmente foi prejudicial, não apenas com relação aos resultados do comportamento como também interferindo no desempenho reprodutivo destes animais durante o experimento, apesar da obtenção de alguns resultados hormonais condizentes com a existência de atividade fisiológica reprodutiva.

É de se notar que um outro casal formado por um flocking não-intencional no Parque, no qual o macho ficara esquecido no recinto das fêmeas por quase um ano, apresentou

comportamento agressivo característico da estação reprodutiva, foi separado num recinto de casal e reproduziu satisfatoriamente na mesma época em que ocorreu a Fase Reprodutiva do experimento, com 4 filhotes criados. Isso pode ser um insight quanto ao tempo necessário para a formação e conhecimento mútuo do casal, bem como da necessidade de escolha do parceiro para que ocorra a reprodução.

Outra questão é a experiência reprodutiva do casal. Estudos em outras espécies de aves mostraram que o desempenho reprodutivo aumenta com a experiência e o tempo de convívio entre os mesmos parceiros (VAN DE POL et al., 2006; RIECHERT; CHASTEL; BECKER, 2012). Pôde ser observado no Parque, também fora do experimento, um casal de tucanos-toco formado há vários anos, com tentativas de reprodução não sucedidas, mas que a cada ano eram aprimoradas (inicialmente perdendo os ovos antes do nascimento, depois com o nascimento, mas a perda dos filhotes). Até que no ano em que ocorreu o experimento, a fêmea, já com várias tentativas de experiência, conseguiu criar filhotes com sucesso – o macho antigo havia morrido e sido substituído por outro naquele ano, o que também pode ter influenciado o sucesso da reprodução. Também, no ano anterior ao experimento, um casal de tucanos-de-bico-verde, formado há vários anos, havia realizado as primeiras posturas (sem sucesso na criação dos filhotes), mas este casal foi separado antes da estação reprodutiva seguinte, não tendo como saber como estaria seu desempenho reprodutivo.

Dos animais do experimento nenhum tinha experiência reprodutiva (além de serem casais formados recentemente), e apenas a fêmea de **Toco 3** realizou posturas, todas com os ovos ou aparecendo quebrados fora do ninho ou com o sumiço dos ovos do ninho alguns dias depois. Esse quadro geral, com a falta de posturas e comportamentos reprodutivos (apesar de terem gônadas funcionais, como demonstrado pelos resultados hormonais) poderia ser também explicado ou pelo menos influenciado pela inexperiência dos casais.

Com relação aos comportamentos sociais, uma questão a ser considerada é que sua ocorrência pode ter sido maior fora das sessões de observação – uma vez que o horário para as observações foi contigenciado pela rotina de coletas, não necessariamente caindo no melhor momento para a observação dos comportamentos sociais –, o que justificaria a pequena quantidade de dados nessa categoria. No entanto um padrão similar ao da categoria **Juntos** pôde ser observado: os casais formados a mais tempo (V1 e V3) eram os únicos que

realizavam “allopreening”, e a direção era quase sempre unilateral, possivelmente do animal subordinado para o dominante, não importando o sexo (macho para fêmea no casal V1 e fêmea para macho no casal V3).

Já o casal T3, apesar de ter feito diversas posturas durante a Fase Reprodutiva, apresentou pouco comportamento social nas duas fases durante as sessões de observação, o qual na sua maioria aparentava serem interações agressivas. Esta grande proporção de interações aparentemente agressivas nos comportamentos sociais observados também ocorreu nos raros eventos sociais dos demais casais.

O uso do ninho era muito específico para cada animal. O macho T1 por exemplo, aparentemente gostava do ninho e pôde ser observado o ocupando em diversas ocasiões; já alguns dos outros animais nem chegavam perto de seus ninhos, isso tanto dentro como fora da estação. No casal que fez as posturas (T3), as visitas ao ninho eram mais frequentes quando havia ovo no mesmo, tanto do macho quanto da fêmea. Em geral a fêmea entrava no ninho mais vezes do que o macho, mas não necessariamente permanecia lá dentro por mais do que alguns minutos, não chegando a incubar os ovos.

Neste mesmo casal, o macho apresentou algumas vezes um comportamento singular relacionado ao ninho: logo cedo, no momento da distribuição das bolinhas, o macho comia as primeiras oferecidas e então pegava uma, levava no bico até o ninho, colocava a cabeça para dentro produzindo uma vocalização similar ao chamado dos filhotes, sem no entanto que houvessem filhotes ou ovos no ninho. De fato, este animal repetiu este comportamento inclusive fora da estação reprodutiva.

Com relação às posturas, estas podem estar relacionadas com aumentos da testosterona sérica, refletida pelo aumento das concentração de metabólitos de testosterona nas excretas da fêmea, como visualizado no gráfico 37 na próxima página – apesar de terem ocorrido posturas próximas, nunca houve dois ovos ao mesmo tempo no ninho: ou o ovo já era encontrado quebrado no chão do recinto (primeira postura de posturas em dias consecutivos) ou sumia dias antes da postura seguinte.

Em geral os ovos apareciam um/dois dias após o aumento da concentração de metabólitos de testosterona detectado nas excretas, exceto nos casos dos ovos que

apareceram nos dias 38 e 39. No entanto, um aumento da concentração não detectado poderia ter ocorrido no dia 36, já que neste dia não foi possível coletar as excretas por conta da chuva. Outra possibilidade seria um atraso na metabolização ou excreção dos metabólitos nesse período, a princípio sem uma causa identificada.

Gráfico 37 – Concentração de metabólitos de testosterona nas excretas liofilizadas (mte) ao longo dos dias experimentais (lacunas ligadas) da **fêmea Toco 3**, mostrando o limiar de variações basais e datas de postura visualizada

Aumentos de testosterona nos dias antes do aparecimento dos ovos possivelmente estão relacionados com as mudanças endócrinas ocorridas no momento e após a ovulação (JENSEN; DURRANT, 2006; PENFOLD et al., 2013). Esses resultados sugerem um período curto entre a ovulação e postura em tucanos. Houve ainda um intervalo de 14-16 dias entre os eventos de postura, bem como das variações hormonais, o que poderia indicar este como sendo o período do ciclo ovulatório nesta espécie.

Como dito anteriormente, alterações no comportamento e na característica das excretas acompanhavam as posturas. Essas alterações puderam ser vistas em outras fêmeas (T2 e V1); e nestas, aparentemente também acompanharam aumentos dos valores das

concentrações de metabólitos de testosterona conforme gráficos 38 e 39, sugerindo que de alguma forma essas alterações poderiam ser associadas à atividade ovulatória.

Gráfico 38 – Concentração de metabólitos de testosterona nas excretas liofilizadas (mte) ao longo dos dias experimentais (lacunas ligadas) da **fêmea Toco 2**, mostrando o limiar de variações basais e datas com alterações detectadas

Gráfico 39 – Concentração de metabólitos de testosterona nas excretas liofilizadas (mte) ao longo dos dias experimentais (lacunas ligadas) da **fêmea Verde 1**, mostrando o limiar de variações basais e datas das alterações detectadas

Nota-se nestas outras fêmeas que no início do período experimental ocorreram aumentos sem a detecção de alterações comportamentais ou nas excretas. Isto poderia ser relacionado a falta de experiência do observador em perceber tais alterações. No entanto, um estudo mais aprofundado e focado nesta questão ainda é necessário para que a detecção dessas alterações possa ser usada como um indício de atividade reprodutiva nestas espécies.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proposta inicial deste trabalho era a de avaliar um grupo estabilizado e reprodutivamente ativo de casais de tucanos-toco e tucanos-de-bico-verde, descrevendo os perfis de metabólitos hormonais dentro e fora da estação reprodutiva.

O fato de termos utilizado casais recém formados, sem experiência reprodutiva; além de infelizmente terem ocorrido mortes no meio do experimento, com necessidade de trocas dos animais entre os períodos experimentais, foram grandes comprometimentos à consistência dos nossos resultados.

No entanto, conseguimos demonstrar a ocorrência de variações nas concentrações de metabólitos de testosterona e progesterona nas excretas, com maiores concentrações ocorrendo na Fase Reprodutiva, tanto em machos quanto em fêmeas, o que estava de acordo com o esperado.

Também pudemos associar, de forma descritiva, a ocorrência de posturas – na única fêmea que as realizou – com aumentos da concentração de testosterona em suas excretas em relação às variações basais; e obtivemos indícios que determinadas alterações comportamentais e nas características das excretas poderiam estar relacionadas com a atividade ovulatória nas fêmeas.

Nossos resultados, além de serem inéditos, geraram interessantes indicativos acerca da fisiologia reprodutiva de tucanos-toco e tucanos-de-bico-verde; e todas essas questões deverão ainda ser abordadas mais a fundo para que sejam plenamente comprovadas e descritos os perfis hormonais destas espécies.

6 CONCLUSÕES

- ✓ A metodologia usada neste trabalho para dosagem hormonal não-invasiva se mostrou eficaz para dosagem de metabólitos de testosterona e progesterona nas excretas de *R. toco* e *R. dicolorus*;
- ✓ Foram encontradas variações sazonais da concentração de metabólitos de testosterona e progesterona nas excretas destes ranfastídeos, com valores maiores na estação reprodutiva;
- ✓ Aumentos da concentração de metabólitos de testosterona nas excretas da fêmea de *R. toco* T1 puderam ser associados graficamente às posturas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, E. M.; FREDERICK, P. C.; LARKIN, I. L. V.; GUILLETTE JR., L. J. Sublethal effects of methylmercury on fecal metabolites of testosterone, estradiol, and corticosterone in captive juvenile white ibises (*Eudocimus albus*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 5, p. 982-989, 2009.
- ALTMANN, J. Observational study of behaviour: sampling methods. **Behaviour**, v. 49, 3/4, p. 227-267, 1974.
- ANDERSON, M. G. Parental investment and pair-bond behavior among canvas backed ducks (*Aythya valisineria*, Anatidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 15, p. 81-90, 1984.
- ANDRIOLO, A. Desafios para a conservação da fauna. In: CUBAS, Z. S.; SILVA J. C. R. e CATÃO-DIAS, J. L (Ed.). **Tratado de Animais Selvagens**: medicina veterinária. São Paulo: Roca, 2007. p. 19-25.
- BAUTISTA, L. M.; SILVÁN, G.; CÁCERES, S.; MARTÍNEZ-FERNÁNDES, L.; BRAVO, C.; ILLERA, J. C.; ALONSO, J. C.; BLANCO, G. Faecal sexual steroids in sex typing and endocrine status of great bustards. **European Journal of Wildlife Research**, v. 59, p. 815-822, 2013.
- CHARD, T. **An Introduction to radioimmunoassay and related techniques**. Amsterdam: Elsevier, 1995.
- COCKREM, J. F.; ROUNCE, J. R. Faecal measurement of oestradiol and testosterone allow the non-invasive estimation of plasma steroid concentrations in the domestic fowl. **British Poultry Science**, v. 35, p. 433-443, 1994.
- COCKREM, J. F.; ROUNCE, J. R. Non-invasive Assessment of the Annual Gonadal Cycle in Free-living Kakapo (*Strigops habropilus*) Using fecal Steroid Measurements. **The Auk**, v. 112, n. 1, p. 253-257, 1995.
- CUBAS, Z. S. Piciformes (Tucano, Araçari, Pica-pau). In: CUBAS, Z. S.; SILVA J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L (Ed.). **Tratado de animais selvagens**: medicina veterinária. São Paulo: Roca, 2007. p. 210-221.
- ELLSWORTH, A.; BUCK, C. L.; ATKINSON, S.; HOLLMÉN, T. Longitudinal monitoring of sex steroid hormones in excrement of spectacled eiders (*Somateria fischeri*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 198, p. 59-65, 2014.
- ETCHES, R. J. **Reproduction in poultry**. Wallingford, Oxon: CAB International, 1996. 318 p.
- FROMAN, D. P.; KIRBY, J. D.; PROUDMAN, J. A. Reprodução em aves: macho e fêmea. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B (Ed.). **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri, SP: Manole, 2004. p. 237-257.

GOODENOUGH, J.; MCGUIRE, B.; JAKOB, E. **Perspectives on Animal Behavior**. 3. ed. [S.l.]: Wiley, 2010. 528 p.

GOYMANN, W.; MÖSTL, E.; GWINNER, E. Non-invasive methods to measure androgen metabolites in excrements of European Stonechats, *Saxicola torquata rubicola*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 129, p. 80-87, 2002.

GOYMANN, W. Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings: physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 35-53, 2005.

GOYMANN, W.; TRAPPSCHUH, M.; JENSEN, W.; SCHWABL, I. Low ambient temperature increases food intake and dropping production, leading to incorrect estimates of hormone metabolite concentrations in European stonechats. **Hormones and Behavior**, v. 49, p. 644-653, 2006.

HIRSCHENHAUSER, K.; MÖSTL, E.; KOTRSCHAL, K. Seasonal Patterns of Sex Steroids Determined from Feces in Different Social Categories of Greylag Geese (*Anser anser*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 114, p. 67-79, 1999.

HIRSCHENHAUSER, K.; KOTRSCHAL, K.; MÖSTL, E. Synthesis of Measuring Steroid Metabolites in Goose Feces. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 138-153, 2005.

HOYO, J. D.; ELLIOTT, A.; SARGATAL, J. (Ed.). **Handbook of the birds of the world: jacamars to woodpeckers**. [S.l.]: Lynx Editions, 2002. v. 7. 613 p.

JENSEN, T.; DURRANT, B. Assessment of Reproductive Status and Ovulation in Female Brown Kiwi (*Apteryx mantelli*) Using Fecal Steroids and Ovarian Follicle Size. **Zoo Biology**, v. 25, p. 25-34, 2006.

JOHNSON, A. L. Reproduction in the Female. In: WHITTOW, G. C (Ed.). **Sturkie's avian physiology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2000. p. 569-596.

KIRBY, J. D.; FROMAN, D. P. Reproduction in male birds. In: WHITTOW, G. C (Ed.). **Sturkie's avian physiology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2000, p. 597-615.

KLASING, K. C. **Comparative avian nutrition**. New York: CAB International Publishing, 1998.

LANGMORE, N. E.; COCKREM, J. F.; CANDY, E. J. Competition for male reproductive investment elevates testosterone levels in female dunnocks, *Prunella modularis*. **Proceedings of Royal Society of London**, v. 269, p. 2473-2478, 2002.

MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 67-74, 2002.

MÖSTL, E.; RETTENBACHER, S.; PALME, R. Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: an analytical approach. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 17-34, 2005.

PALME, R. Measuring fecal steroids: guidelines for practical application. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 75-80, 2005.

PALME, R.; MÖSTL, E. Biotin-streptavidin enzyme immunoassay for the determination of oestrogens and androgens in boar faeces. In: GÖRÖG, S. (Ed.). **Advances of steroid analysis**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1994. p. 111-117.

PALME, R.; MÖSTL, E. Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. **International Journal of Mammalian Biology**, v. 62, p. 192-197, 1997. Supplement, 2.

PENFOLD, L. M.; HALLAGER, S.; BOYLAN, J.; WIT, M.; METRIONE, L. C.; OLIVA, M. Differences in fecal androgen patterns of breeding and nonbreeding kori bustards (*Ardeotis kori*). **Zoo Biology**, v. 32, p. 54-62, 2013.

PEREIRA, R. J. G.; GRANZINOLLI, M. A. M.; DUARTE, J. M. B. Annual profile of fecal androgen and glucocorticoid levels in free-living male American kestrels from southern mid-latitude areas. **General and Comparative Endocrinology**, v. 166, p. 94-103, 2010.

RIECHERT, J.; CHASTEL, O.; BECKER, P. H. Why do experienced birds reproduce better? Possible endocrine mechanisms in a long-lived seabird, the common tern. **General and Comparative Endocrinology**, v. 178, p. 391-399, 2012.

ROZHOK, A. **Orientation and navigation in vertebrates**. Berlin: Springer, 2008. 166 p.

SCHWARZENBERGER, F.; TOMÁSOVÁ, K.; HOLECKOVÁ, D.; MATERN, B.; MÖSTL, E. Measurements of fecal steroids in the black rhinoceros (*Dicerus dicornis*) using group-specific enzyme immunoassays for 20-oxo-pregnanes. **Zoo Biology**, v. 15, p. 159-171, 1996.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 910 p.

SINHORINI, J. A. **Estudo endócrino-reprodutivo, não invasivo de ararajubas, *Guaruba guarouba* (Gmelin, 1788), mantidas em cativeiro**. 2013. 103 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SOCKMAN, K. W.; SCHWABL, H. Daily estradiol and progesterone levels relative to laying and onset of incubation in canaries. **General and Comparative Endocrinology**, v. 114, p. 257-268, 1999.

TOUMA C.; PALME, R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 54-74, 2005.

- VAN DE POL, M.; HEG, D.; BRUINZEEL, L. W.; KUIJPER, B.; VERHULST, S. Experimental evidence for a causal effect of pair-bond duration on reproductive performance in oystercatchers (*Haematopus ostralegus*). **Behavioral Ecology**, v. 17, p. 982-991, 2006.
- WASHBURN, B. E.; TEMPEL, D. J.; MILLSPAUGH, J. J.; GUTIÉRREZ, R. J.; SEAMANS, M. E. Factors related to fecal estrogens and fecal testosterone in California spotted owls. **The Condor**, v. 106, p. 567-579, 2004.
- WASSER, S. K.; HUNT, K. E. Noninvasive measures of reproductive function and disturbance in the barred owl, great horned owl, and northern spotted owl. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 109-137, 2005.
- WIKELSKI M.; HAU, M.; WINGFIELD, J. Seasonality of reproduction in a neotropical rain forest bird. **Ecology**, v. 81, n. 9, p. 2458-2472, 2000.
- WILSON, E. O. **Sociobiology**: the new synthesis. 25th Anniversary ed. [S.l.]: Belknap Harvard, 2000. 697 p.
- WINGFIELD, J. C.; VLECK, C. M.; MOORE, M. C. Seasonal changes of the adrenocortical response to stress in birds of the Sonoran desert. **Journal of Experimental Zoology**, v. 264, p. 419-428, 1992.
- ZIEGLER, T. E.; SCHEFFLER, G.; WITTWER, D. J.; SCHULTZ-DARKEN, N.; SNOWDON, C. T.; ABBOTT, D. H. Metabolism of reproductive steroids during the ovarian cycle in two species of callitrichids, *Saguinus oedipus* and *Callithrix jacchus*, and estimation of ovulatory period from the fecal steroids. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 91-99, 1996.

APÊNDICE

-

Estudo piloto para definição do protocolo de uso dos corantes

Foram testadas 4 diferentes cores do corante alimentar líquido da marca Arcolor®, em diferentes concentrações de diluição na ração para tucanos produzida pelo Parque das Aves.

Os produtos testados são corantes alimentares líquidos aprovados e usados em culinária humana, cuja composição inclui água, álcool etílico e a(s) substância(s) corante(s), sendo: corante artificial azul II (Azul); corante artificial amarelo tartrazina (Amarelo); corante artificial vermelho III (Rosa); e corantes artificiais vermelho VI e vermelho II (Vermelho).

Inicialmente foi testada a eficiência de cada cor em alterar a aparência da ração para tucanos, a partir de uma base de ração de 100g e se adicionando gota a gota de corante até que se chegou numa quantidade mínima aproximada cuja cada cor fosse claramente identificável na mistura. A avaliação foi realizada subjetivamente pelo olhar do experimentador. Obteve-se o seguinte resultado:

- Azul: 12 a 15 gotas (com 5 a 8 gotas já se cora levemente, mas há uma tendência a confundir com verde)

- Amarelo: 25 a 30 gotas

- Rosa: 8 a 10 gotas

- Vermelho: 12 a 15 gotas (cora levemente com 5 a 8 gotas)

A cor Azul se mostrou ser eficiente para corar a ração, no entanto em concentrações menores (5 a 8 gotas por 100g de ração) ela se parece com verde, podendo causar dúvida quando nas excretas. A cor Amarela foi a única que não se mostrou eficiente, provavelmente porque a própria ração já tenha uma cor bege alaranjada, não contrastando com o corante. O Rosa foi aparentemente a cor com melhor resultado, destacando mais fortemente a ração corada. Já o Vermelho obteve resultado semelhante ao Azul.

Foi então realizado um teste piloto de ingestão da ração corada para definição do procedimento a ser realizado nos experimentos, avaliação da percepção do corante nos excretas, bem como da quantidade necessária de ração a ser fornecida para a formação de uma quantidade adequada de excretas e o tempo necessário para tal. Para tanto foram utilizados três tucanos-de-bico-verde internados no hospital do Parque. A opção por utilizar animais internados no piloto, apesar de poderem ter suas funções digestoras alteradas, mesmo que não clinicamente, se deu pela facilidade em se modificar as condições do estudo com eles para criar uma base de como proceder para as verificações em animais clinicamente sadios e ambientados nos recintos externos.

No primeiro e terceiro dia os animais foram deixados em jejum de 13 horas durante a noite, já no segundo dia eles permaneceram com o alimento disponível à noite. O fornecimento da ração corada foi realizado da seguinte maneira:

- no primeiro dia, foi fornecida a ração corada no formato de bolinhas (3,5 a 4g cada, preparadas como relatado anteriormente) à vontade por um período de 20 minutos, trocando-se então pela dieta normal dos animais. Isto foi realizado para se identificar a quantidade de ração que os animais estariam dispostos a ingerir logo num primeiro momento, a qual foi calculada em torno de 7 a 12g por animal, se bem que com alguma dificuldade de engolir as bolinhas nesse tamanho.

- no segundo dia foram fornecidas bolinhas menores (3g cada; na concentração de 3 gotas de Azul ou Vermelho e 2 gotas de Rosa para 15g de ração), diretamente no bico, na quantidade de 5 bolinhas (15g) para cada animal, sendo que um deles comeu só 4 bolinhas. O alimento normal foi disponibilizado 1h20' após o fornecimento da ração corada.

- no terceiro dia a quantidade de ração foi reduzida para 3 bolinhas por animal (de 3g cada; na concentração de 5 gotas de Azul, 4 gotas de Rosa e 8 gotas de Vermelho para 30g de ração), uma vez que as quantidades maiores tinham sido mais do que o suficiente para gerar a quantidade desejada de excretas corados; e o alimento normal foi disponibilizado imediatamente após a ingestão da ração corada, o que aparentemente havia melhorado a condição das excretas coradas.

Anotou-se o horário do fornecimento da ração corada e o horário das excreções observadas por um período de duas horas, avaliando-se visualmente estas quanto à composição (só líquido, só ração ou misturada com frutas) e identificação da coloração modificada. As excretas foram coletadas e então pesadas para identificação do tempo necessário para a junção de quantidade adequada de excretas para as coletas (definida como 1,5 a 2 gramas, o suficiente para encher $\frac{3}{4}$ do criotubo).

Nos três animais, quando deixados em jejum, a primeira excreção observada em cada dia não aparecia corada, e possuía uma característica diferente das demais, sendo muito mais líquida e formada principalmente por urato, com resquícios de alimento do dia anterior. As excreções subsequentes, por outro lado, apareciam bem coradas (com exceção da cor Vermelha, que nunca corou bem as excretas) e bem formadas, consistentes e compostas apenas por ração tanto nos dias em que o alimento normal havia sido fornecido sem intervalo como no dia em que se deixou um intervalo de jejum entre o fornecimento da ração corada e do alimento normal.

No dia em que os animais não ficaram de jejum, as primeiras excretas eram formadas por composição entre ração e frutas, mais volumosas, e não apareceram coradas, com a excreção da ração corada inicialmente se misturando nos outros alimentos e então a partir da 4ª/5ª excretas aparecendo só com a ração corada. Em todos os casos, após algumas excreções formadas apenas pela ração corada, esta começava a se diluir em excreções contendo outros alimentos, sendo que os animais excretavam sem vestígios visuais dos corantes em até 3 horas após a ingestão.

Os resultados com o horário e o peso de cada excreção, além dos dados da alimentação corada fornecida e de quais excretas se apresentaram adequados para a coleta (corados e formados apenas por ração) podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1 – Alimentação e excreções de *Ramphastos dicolorus* nos três dias de experimento piloto

Animal 1			Animal 2			Animal 3														
Dia 1			Dia 2			Dia 3														
Alimento	cor	vermelho	azul	rosa	vermelho	azul	azul	rosa	vermelho											
	horário	7:50-8:20	7:40-7:45	7:50-8:20	7:50-7:55	07:46	7:50-8:20	7:45-7:50	07:45											
	quantidade	7-12g	15g	10-12g	15g	9g	7-12g	12g	9g											
Excreções observadas – horários e pesos (g)	Hora		Hora		Hora		Hora		Hora											
	(g)		(g)		(g)		(g)		(g)											
	1ª		08:37	-	07:57	1,5	08:17	-	07:55	1,5	08:15	-	07:57	1,0	08:02	-				
	2ª		09:21	2,5	08:19	2,0	09:24	0,5	08:30	0,5	08:25	0,5	08:35	0,5	08:07	1,0	08:14	-		
	3ª		10:10	2,0	08:26	1,5	09:45	0,5	08:43	1,0	08:42	0,5	08:43	0,5	08:19	1,0	08:28	0,2		
	4ª		10:20	5,5	09:09	1,5	-	-	08:47	1,0	08:26	0,5	08:51	1,0	08:26	0,5	08:41	0,5		
	5ª		-	-	09:40	2,0	-	-	08:55	0,5	08:34	0,5	08:59	0,5	08:34	0,2	08:47	0,5		
	6ª		-	-	-	-	-	-	09:23	0,5	08:54	0,5	-	0,5	08:44	1,0	08:59	0,5		
	7ª		-	-	-	-	-	-	09:45	-	09:27	1,0	-	0,5	08:57	0,5	09:14	1,0		
	8ª		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	09:07	1,0	09:21	-		
	9ª		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	09:11	0,5	-	-		
10ª		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	09:15	1,0	-	-			
11ª		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	09:20	0,5	-	-			
Excreções ideais p/ coleta			(2ª)		4ª - 5ª		2ª - 3ª		2ª - 6ª		(5ª - 7ª)		2ª - 4ª		2ª - 6ª		4ª - 10ª		(3ª - 6ª)	

* no dia 1 foi oferecido ração corada em quantidade à vontade (20'), para definir o quanto eles comeriam

* no dia 2 os animais ficaram em jejum apenas meia hora antes, e a comida só foi servida 1h20' após a ração corada

* no dia 3 novamente houve jejum, e a alimentação normal foi servida logo em seguida à ração corada

O animal 1 apresentou tempos diferentes dos outros, mas de forma semelhante nos três dias, mostrando uma característica individual diferente quanto à sua função digestiva, a qual não pôde ser relacionada à nenhum fator em especial. Ele era, entretanto, o animal mais estressado e agressivo de todos, passando muito tempo apresentando comportamentos bastante anômalos na gaiola. Devido a isto, apesar de poder indicar uma variação na função digestiva que seria importante para a determinação dos protocolos a serem testados nos animais em recintos, seus valores não foram considerados nessa determinação.

Com relação aos corantes, o Rosa foi o que melhor resultado apresentou, corando bem as excretas e em menor concentração do que os outros dois. O Azul também corou bem as excretas, se bem que a concentração teve de ser um pouco maior, ficando determinadas as concentrações do terceiro dia para estas duas cores. Já o Vermelho, por motivo não determinado, não corou as excretas mesmo na maior concentração, no máximo as deixando um pouco mais alaranjadas, mas sem possibilidade de detecção dentre excretas não coradas.

Das quantidades, 15g por animal se mostraram bem suficientes para a coleta adequada de excretas corados; já 9g por animal, se bem que suficientes, produziram uma quantidade de excretas adequados pequena, além de parecer ter aumentado o tempo necessário para obtenção das mesmas, sendo então considerada como limite mínimo para as coletas.

Considerando os animais 2 e 3, os tempos para início das excreções coradas variaram entre 30 e 45' depois da ingestão da ração corada, sendo ligeiramente maiores quando os animais não estavam de jejum (trato gastrointestinal cheio); e os tempos necessários para obtenção de quantidades adequadas de excretas variaram entre 50' e 1h30', com o aparecimento de excretas viáveis (corados, consistentes e formados apenas por ração) ocorrendo até entre 1h10' a 1h50' após a ingestão da ração corada.

Uma observação interessante foi que várias das excreções, que muitas vezes sincronizaram nos três animais estavam relacionadas à distúrbios no ambiente da internação, momentos de estresse, como a entrada de uma pessoa ou em que algum outro animal era contido ou manejado para algum procedimento. Isso aconteceu em até três vezes seguidas no dia 2 (8:19; 8:26; e 8:34).

No dia em que os animais receberam a ração corada e então ficaram sem o alimento normal, aparentemente foi necessário um maior tempo para a coleta da mesma quantidade de excretas viáveis, sendo que os excretas eram menores e proporcionalmente mais ricos em urato se comparados aos dos outros dias. Isto sugeriu que o fornecimento do alimento normal logo após a ingestão da ração corada facilitaria as coletas e ainda permitiria uma melhor qualidade de excretas coletados, mais bem formados e com menor proporção de urato.

Sabe-se que a variação da composição das excretas pela variação na composição dos alimentos ingeridos influencia nas concentrações de metabólitos hormonais, uma vez que há diferenças no volume de fezes formadas e no tempo decorrido para a digestão, porém acreditou-se que neste caso isso não aumentaria a variabilidade dos resultados, pois seriam coletadas apenas excretas formados unicamente por ração, sendo que o alimento normal que os animais ingeririam após a ração corada durante o período em que se esperaria para coletar as amostras apenas ajudaria na manutenção do trânsito intestinal ativo melhorando a qualidade das amostras, mas não interferindo com a sua composição ou tempo de passagem pelo trato gastrointestinal da ração corada previamente fornecida.

Num terceiro momento, a ração corada foi fornecida para animais em recintos externos do Parque, na quantidade de 6g por animal (tucano-de-bico-verde) e 12g por animal (tucano-toco), no intuito de avaliar a possibilidade de visualização dessas excretas coradas pelo coletor, nas condições dos recintos. Para tanto foi feito um escaneamento do recinto 1h após o fornecimento, quando pôde se coletar excretas corados em quantidade semelhante em relação ao tempo do que os animais nas gaiolas.

Novamente, apesar de sugestivos, estes dados são apenas a impressão que obtivemos com o teste piloto; e carecem de experimentação em número de animais e animais sadios nas condições externas para poderem ser comprovados estatisticamente. No entanto, mostraram ser possível e viável a coloração de parte da ração de tucanos para obtenção de amostras de excretas individualizadas para posteriores análises. Também indicaram variáveis a serem testadas com relação à coloração das excretas de tucanos e outras aves em geral para coleta individualizada das mesmas.