CAROLINA LORIERI VANIN

**O torneio de fibra causa estresse em machos de Trinca-ferro
(*Saltator similis*, Aves, Thraupidae)? Uma avaliação endócrino-
comportamental**

São Paulo

2021

CAROLINA LORIERI VANIN

**O torneio de fibra causa estresse em machos de Trinca-ferro
(*Saltator similis*, Aves, Thraupidae)? Uma avaliação endócrino-
comportamental**

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de
Oliveira

Coorientador:

Prof. Dr. Luís Fábio Silveira

São Paulo

2021

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. 4028
FMVZ

Vanin, Carolina Lorieri
O torneio de fibra causa estresse em machos de Trinca-ferro (*Saltator similis*, Aves, Thraupidae)? Uma avaliação endócrino-comportamental / Carolina Lorieri Vanin. – 2021.
100 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira.
Coorientador: Prof. Dr. Luís Fábio Silveira.

1. Passeriformes. 2. Criação amadora. 3. Bem-estar animal. 4. Metabólitos de glicocorticoide. 5. Competição esportiva. I. Título.

Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da condição de estresse de machos de *Saltator similis* (trinca-ferro) por meio da dosagem de metabólitos de glicocorticoides em excretas cloacais.", protocolada sob o CEUA nº 5498220318 (ID 006615), sob a responsabilidade de **Cláudio Alvarenga de Oliveira e equipe; Carolina Lorieri Vanin** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 29/05/2019.

We certify that the proposal "Evaluation of the stress condition of *Saltator similis* males (trinca-ferro) by means of dosage of glucocorticoid metabolites in cloacal excreta.", utilizing 21 Birds (21 males), protocol number CEUA 5498220318 (ID 006615), under the responsibility of **Cláudio Alvarenga de Oliveira and team; Carolina Lorieri Vanin** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/29/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **05/2019** a **02/2020**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Aves**

sexo: **Machos**

idade: **1 a 15 anos**

N: **11**

Linhagem: ***Saltator similis***

Peso: **35 a 55 g**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Aves**

sexo: **Machos**

idade: **1 a 15 anos**

N: **10**

Linhagem: ***Saltator similis***

Peso: **35 a 55 g**

Local do experimento: Coleta das amostras dos diferentes grupos serão realizadas: - Na residência dos criadores, onde são autorizados para a manutenção das aves; - Durante os torneios de fibra que participarão; - No Centro de Reabilitação de Animais Silvestres □ DEPAVE. As análises das amostras serão no Laboratório de Dosagens Hormonais -FMVZ-USP.

São Paulo, 01 de dezembro de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenador
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LORIERI, Carolina Vanin

Título: **O torneio de fibra causa estresse em machos de Trinca-ferro**
(*Saltator similis*, Aves, Thraupidae)? Uma avaliação endócrino-
comportamental

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: _____

Dedico esse trabalho a uma interação humano-fauna benéfica para os animais, para a espécie humana e para o meio ambiente.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Maria Elizabeth Lorieri Vanin** e **João Humberto Vanin** por serem meu porto seguro, por me apoiarem em toda minha vida em qualquer ocasião. Obrigada pelo maior presente de todos, obrigada pela VIDA.

Ao meu marido **Diego Rugno Arruda**, agradeço por todo amor e esforço em construir uma relação de parceria com pilares sólidos repletos de amor, cumplicidade e respeito.

Aos meus sogros **Suzete Rugno Arruda** e **Pedro Carlos Arruda**, agradeço o carinho, compreensão e cuidado constante.

Ao **Heriberto Moyano Barbosa**, meu irmão que a vida na pós graduação me proveu, obrigada por toda aprendizagem, paciência em todo o trajeto da pesquisa, você foi fundamental para conclusão de cada etapa do projeto.

Ao coorientador e amigo **Prof. Dr. Luis Fabio Silveira**, agradeço a combustão que fez com que a ideia da pesquisa se materializasse, obrigada pelos recursos fornecidos, sem você essa pesquisa não seria possível.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira**, obrigada pela confiança e oportunidade em ingressar no universo das dosagens hormonais.

Aos meus colegas do **Laboratório de Dosagens Hormonais da FMVZ-USP** por toda atenção e tempo dispendido nos ensinamentos e suporte para a concretização da pesquisa científica.

Aos colegas do **Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP** pela troca de experiências, conselhos e novas ideias.

Aos meus chefes **Dionete Gonzalez Meger, Vilma Clarice Geraldi e Sergio Luis Marçon** pelo estímulo e pela compreensão do tempo que foi preciso para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus colegas de trabalho do **Departamento de Fauna do Estado de São Paulo**, obrigada pelo suporte nos bastidores, sem vocês o caminho seria muito mais difícil.

A **Juliana Laurito Summa, Alice Soares de Oliveira e Guilherme Festa** do Centro de Manejo e Conservação de Animais Silvestres da Divisão de Fauna Silvestre– CeMaCas/DEPAVE, pela oportunidade de trabalho em conjunto e parceira institucional, vocês foram essenciais para a realização desta pesquisa.

Aos criadores amadores **Fernando Machado de Almeida Maia, Fabio Ferreira, Afonso Ferreira de Araújo Filho, Eduardo Rosseto Antônio, Magno Campos Franco, Matheus Roberto Rodrigues**, obrigada pela confiança na pesquisa científica, obrigada por fornecer as aves para o estudo, e pela disponibilidade e empenho nas coletas realizadas em horários e dias nada convenientes.

“Todas as coisas podem ser interpretadas de infinitas maneiras. Ver o mundo a partir de novas perspectivas é a meta, não mais uma cultura que se componha desde o seu princípio como uma contranatureza, mas uma cultura que tenha como alvo afirmar a vida, fortalecê-la.”
Viviane Mosé – A espécie que sabe

RESUMO

LORIERI, C. V. **O torneio de fibra causa estresse em machos de Trinca-ferro (*Saltator similis*, Aves, Thraupidae)?** Uma avaliação endócrino-comportamental. 2021. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Os torneios de fibra de passeriformes são conhecidos como competições esportivas entre machos de diferentes espécies, permitidos em todo território brasileiro. O trinca-ferro (*Saltator similis*) é uma das espécies mais visadas por criadores amadores de pássaros nativos atualmente, para participar destes torneios. No entanto, esta prática levanta questionamentos e preocupações sobre o bem-estar destes indivíduos. Análises endócrina e comportamental são amplamente utilizadas na avaliação do bem-estar em diversas espécies de aves. Altas concentrações de glicocorticoide e seus metabólitos (MGC), bem como alterações comportamentais, podem estar associadas ao estresse. O presente estudo teve como objetivo principal avaliar as variações endócrinas e comportamentais em machos de trinca-ferro que participam de torneios. Para este fim, amostras de material uro-fecal e dados comportamentais de 10 indivíduos adultos foram coletados. O grupo torneio foi composto por seis aves consideradas de alta performance pelos criadores, e outros quatro indivíduos não participantes de torneio, foram utilizados como grupo controle. O material uro-fecal, foi coletado com intervalo de 4 horas, durante 4 dias (descanso, pré-torneio, torneio e pós-torneio) de ambos os grupos. A dosagem dos MGC foi realizada por imunoensaio enzimático direto (EIA) previamente validado para a espécie. As análises das concentrações médias dos períodos previamente estabelecidos, foram realizadas tanto por indivíduo quanto por grupo, pelo modelo linear generalizado (GLM). Os indivíduos que participam dos torneios apresentaram aumento nas concentrações de MGC estatisticamente significativas nas amostras coletadas no dia do torneio, quando comparadas com o dia descanso ($68,87 \pm 8,18$; $44,99 \pm 3,22$; $p < 0,07$). A concentração média dos MGC entre os grupos (torneio *versus* controle) não apresentou diferenças significativas ($54,46 \pm 1,07$; $51,18 \pm 0,65$; $p = 0,43$). A análise comportamental avaliada a partir do etograma desenvolvido para espécie com coleta de imagens de vídeos, pela metodologia animal focal, revelou aumento significativo na frequência das três categorias comportamentais que representam a territorialidade durante os torneios. No entanto, não foi possível correlacionar os dados endócrino-comportamentais obtidos para a espécie. Devido às concentrações mais elevadas dos MGC registradas nas aves do grupo torneio no dia da competição esportiva, pode-se concluir que estes animais apresentam uma resposta ao estresse agudo nesses eventos, o que não necessariamente reflete-se num quadro patológico, posto que não houve diferenças significativas nesse aspecto entre as médias gerais do grupo torneio *versus* grupo controle, tampouco alterações comportamentais que apontassem nessa direção.

Palavras-chave: Passeriformes. Criação amadora. Bem-estar animal. Metabólitos de glicocorticoide. Competição esportiva.

ABSTRACT

LORIERI, C. V. **Do tournaments competitions cause stress in males of Green-winged (*Saltator similis*, Aves, Thraupidae)?** An endocrine-behavioral assessment. 2021. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Passerine fiber tournaments are known as sports competitions between males of different bird species, allowed throughout Brazil. The Green-winged Saltator (*Saltator similis*) is currently one of the most sought after species by native birds amateur breeders, to participate in these tournaments. However, this practice raises questions and concerns about the well-being of these individuals. Endocrine and behavioral analysis are widely used in the assessment of well-being in several bird species, where high concentrations of glucocorticoids and their metabolites (MGC), as well as behavioral changes, may be associated with stress. The present study had as main objective to evaluate the endocrine and behavioral variations in Green-winged Saltator males that participate in tournaments. For this purpose, samples of uro-fecal material and behavioral data from 10 adult individuals were collected. The tournament group was composed of six high performance birds according to the breeders, and another four individuals, not participating in tournaments, were used as a control group for three weeks, when the tournaments took place. The uro-fecal material was collected at an interval of 4 hours, during 4 days (rest, pre-tournament, tournament and post-tournament) from both groups. The MGC dosage was performed by direct enzyme immunoassay (DEI) previously validated for the species. The analyzes of the average day concentrations by individuals and groups were performed using the generalized linear model (GLM). The individuals participating in the tournament showed a statistically significant increase in the concentrations of MGC in the samples collected on the day of the tournament, when compared to the rest day ($68,87 \pm 8,18$; $44,99 \pm 3,22$; $p < 0,07$). The average concentration of MGCs between groups (tournament versus control) did not show significant differences ($54,46 \pm 1,07$; $51,18 \pm 0,65$; $p = 0,43$). However, the behavioral analysis evaluated from the ethogram developed for species with the collection of video images, by focal animal methodology, showed a significant increase in frequency of the three behavioral categories that represent territoriality during the tournaments. It was not possible to correlate the endocrine-behavioral data obtained for the species. Due to the higher concentrations of MGC recorded in the birds of the tournament group on the day of the sports competition, it can be concluded that these animals present a response to acute stress in these events, which is not necessarily reflected in a pathological picture, since there were no significant differences in this aspect between the general averages of the tournament group versus the control group, nor behavioral changes that point in that direction.

Keywords: Passerine. Amateur breeding. Animal welfare. Glucocorticoid metabolites. Sports competition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Trinca-ferro (<i>Saltator similis</i>)	22
Figura 2 - Roda de gaiolas de trinca-ferro durante Torneio de Fibra	24
Figura 3 - Contagem de canto de trinca-ferro durante Torneio de Fibra.....	24
Figura 4 - Gaiola padrão de torneio de trinca-ferro.....	24
Figura 5 - Kit de coleta.....	39
Figura 6 - Eppendorfs® identificados.....	39
Figura 7 - Disposição das gaiolas trinca-ferro CeMaCas.....	42
Figura 8 - Material uro-fecal de trinca-ferro.....	42
Figura 9 - Musculatura peitoral de trinca-ferro	42
Figura 10 - Análise de vídeo software <i>Cowlog</i>	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo histórico aves partícipes de torneio.....	36
Tabela 2 - Resumo histórico aves grupo controle	37
Tabela 3 - Descrição das categorias comportamentais que compõe o etograma utilizado na espécie trinca-ferro.....	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Paralelismo teste EIA direto	49
Gráfico 2 - Variação MGC Grupo A validação fisiológica.....	50
Gráfico 3 - Variação MGC Grupo B validação fisiológica.....	51
Gráfico 4 - Variação MGC Grupo C validação fisiológica.....	51
Gráfico 5 - Ritmo Diário MGC	52
Gráfico 6 - Variação média MGC individual Grupo Torneio	53
Gráfico 7 - Variação média MGC do Grupo Torneio	54
Gráfico 8 - Variação média MGC individual Grupo Controle.....	55
Gráfico 9 - Variação média MGC do Grupo Controle.....	55
Gráfico 10 -Frequência categoria comportamentais Grupo Torneio	57
Gráfico 11 -Frequência categoria comportamentais Grupo TorneioXControle	58

LISTA DE SIGLAS

Ac	Anticorpo
ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
Ag	Antígeno
AVT	Vasotocina arginina
CRF	Corticotrofina
DEFAU	Departamento de Fauna
EIA	Imunoensaio Enzimático direto
GC	Glicocorticóides
HHa	Hipotálamo-hipófise adrenal
HHG	Hipotálamo-hipófise gonadal
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IUCN	International Union for Conservation of Nature
MGC	Metabólito de Glicocorticóides
RIA	Radioimunoensaios
SIMA	Secretaria de Infraestrutura e do Meio Ambiente
SISPASS	Sistema de cadastro de criadores amadores de passeriformes
VIP	Polipeptídeo intestinal vasoativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 DEFINIÇÕES: BEM-ESTAR E ESTRESSE	20
2.2 O ESTADO DE CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE TRINCA-FERRO	21
2.3 A CRIAÇÃO DE TRINCA-FERRO E O TORNEIO DE FIBRA	23
2.4 MECANISMO NEUROENDÓCRINO: ESTRESSE X REPRODUÇÃO	25
2.5 MÉTODOS NÃO INVASIVOS PARA DOSAGEM HORMONAL	27
2.6 COMPORTAMENTO E IMPLICAÇÕES NA AVALIAÇÃO HORMONAL	31
3 OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 DIFERENCIAÇÃO SEXUAL ENTRE OS INDIVÍDUOS	35
4.2 CRITÉRIOS PARA ESCOLHA DOS CRIADORES.....	35
4.3 GRUPO TORNEIO DE FIBRA.....	36
4.4 GRUPO CONTROLE (NÃO PARTÍCIPE DE TORNEIO).....	37
4.5 COLETA DE MATERIAL URO-FECAL.....	38
4.6 MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE MGC	39
4.7 VALIDAÇÃO QUÍMICA DO IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO DIRETO (EIA).....	40
4.8 VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA DO IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO DIRETO (EIA)	41
4.9 DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA	42
4.10 COLETA DE DADOS COMPORTAMENTAIS	43
4.11 ANÁLISE DOS DADOS.....	47
5 RESULTADOS.....	49
5.1 PARÂMETROS DE QUALIDADE DOS ENSAIOS HORMONAIS	49
5.2 VARIAÇÃO DOS MGCs NA VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA EIA.....	50
5.3 RITMO DIÁRIO.....	52
5.4 VARIAÇÃO DOS MGCs GRUPO TORNEIO E GRUPO CONTROLE	52
5.5 VARIAÇÃO COMPORTAMENTAL	56
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS.....	68
APÊNDICES.....	81

1 INTRODUÇÃO

Questões de valores éticos, morais, culturais, econômicos e políticos são levantadas quanto se trata de animais sob cuidados humanos (ALRØE; VAARST; KRISTENSEN, 2001; BAYVEL; DIESCH; CROSS, 2012), gerando frequentemente debates emocionais (MASON; MENDL, 1993). O bem-estar de animais silvestres criados *ex situ* (fora do seu ambiente natural) deve ser abordado e utilizado de maneira científica na formulação apropriada da legislação (BROOM, 1991), de forma a garantir uma interação humano-fauna benéfica para o animal, para o ser humano e para o meio ambiente. Esta é uma área de estudo relativamente recente, e os estudos buscam acrescentar objetividade para respostas dessas questões (MASON; MENDL, 1993), com métodos que possam ser devidamente elaborados para se testar estas hipóteses com base em evidências (DAWKINS, 2003, 2017a).

A higidez física e psicológica do animal é uma exigência do meio social, da Constituição brasileira e das normas infra-legais federal e estaduais. No Brasil, a procura pela manutenção de animais silvestres como animais de companhia vem aumentando a cada ano (GIL; GAHR, 2002; TRAJANO; CARNEIRO, 2019). Para manter um animal silvestre em casa é necessário que ele tenha origem legal, ou seja, comprovar que o animal não foi retirado diretamente da natureza (VANIN; NASSARO, 2016). A regra geral é a aquisição em um empreendimento de fauna silvestre *ex situ* autorizado, que garanta o nascimento do animal silvestre em cativeiro, submetido ao manejo ambiental, alimentar e higiênico-sanitário adequados.

A criação amadorista de pássaros silvestres é uma atividade realizada no Brasil que diverge da regra geral. Esta atividade de criação está prevista na Lei Federal nº 5.197, de 1967, e foi regulamentada pela Instrução Normativa do IBAMA nº 10, de 2011, que permite que pessoas físicas reproduzam e transfiram pássaros entre criadores licenciados e cadastrados no sistema de controle e monitoramento da atividade de criação amadora de pássaros (SISPASS), sem a finalidade comercial. Esta Instrução Normativa possibilita a solicitação de anilhas para marcação de filhotes provenientes de casais previamente registrados no plantel, a emissão da atualização da relação das aves asseguradas, solicitações

de licenças para transporte, entre outras ações necessárias no sistema SISPASS de acordo com a regulamentação vigente.

Uma das atividades desenvolvidas pelos criadores de aves nesta categoria é a disputa entre machos de passeriformes em torneios, funcionando como atividade de lazer e de vitrine (TOSTES, 1995). Os torneios de pássaros canoros no Brasil são organizados e promovidos por entidades associativas como clubes, federações, associações e confederações devidamente homologados em cada estado, e no caso de São Paulo pelo Departamento de Fauna (DEFAU) da Secretaria de Infraestrutura e do Meio Ambiente (SIMA).

Esta pesquisa trabalhou com a hipótese de que machos adultos de trinca-ferro (*Saltator similis*), oriundos de criadores amadores de passeriformes são submetidos a situação de estresse durante os torneios de fibra. Para isso foram testadas e comparadas evidências a partir da dosagem de metabólitos de glicocorticoides (MGC) em material uro-fecal, pelo método não invasivo de imunoensaio enzimático direto (EIA) e avaliações comportamentais. Foi realizada também a validação da técnica EIA para detecção dos MGC na espécie durante a temporada reprodutiva.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Definições: *bem-estar e estresse*

O “bem-estar animal” é um termo desafiador para definir e medir (Czycholl et al., 2015; Marian S. Dawkins, 2017; Marian Stamp Dawkins, 2003; Fisher, 2009; Mason & Mendl, 1993; Ohl & Van der Staay, 2012; Veasey, 2006), cada autor enfatiza diferentes aspectos da existência de um animal (MASON; MENDEL, 1993). Alguns equiparam bem-estar com aptidão biológica, alegando que pode ser comprometido se a capacidade de sobrevivência e de reprodução for diminuída. Futuyma (1988) concorda que a descrição da qualidade física do animal é importante, também enfatiza a relação entre bem-estar e aptidão genética, podendo ser avaliada a partir da taxa de aumento de um genótipo em relação a outros genótipos em uma determinada população (FRASER; BROOM, 1990).

O bem-estar pode ser alcançado a partir de uma necessidade atendida, podendo ser mediada pela obtenção de um recurso específico ou pela resposta de um estímulo ambiental ou corporal (BROOM, 1988). Algumas necessidades são mais difíceis de serem supridas, desencadeando mecanismos complexos para obtenção de energia. O animal pode ter sucesso nas tentativas de lidar com as condições em que se encontra ou não, em consequência seu sistema de controle, como sistema nervoso central e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) pode ser sobrecarregado, produzindo altas taxas de adrenalina/noradrenalina e glicocorticoides, havendo uma redução real ou potencial no condicionamento físico, levando-o ao estresse (CREEL, 2001).

Cockrem (2007) especifica que qualquer estímulo estressor seja ele social, ambiental ou demográfico, pode ser avaliado a partir do aumento da secreção dos níveis de glicocorticoides (GC). Archer (1973) define que o estresse é um estado em que o eixo HPA é ativado com maior secreção de glicocorticoides em resposta ao agente estressor.

Archer (1979), Moore e Miller (1984), Moore e Zoeller (1985) e Wingfield (1988) afirmam que um animal estressado pode reduzir sua aptidão, diminuindo a longevidade e a reprodução. No entanto, a ênfase nas medidas fisiológicas e físicas do bem-estar animal foi criticada por Thorpe (1965, 1967), Cronin (1985)

e Stolba e Wood-Gush (1984), principalmente porque é comum que suínos agrícolas com aparente baixo *status* de bem-estar tenham alta aptidão, apresentando boas taxas de reprodução e crescimento corporal. Existem mecanismos de enfrentamento que não interferem na redução da aptidão física e ainda assim indicam redução do bem-estar (DAWKINS, 2003). Isso mostra o quão cuidadoso é preciso ser na interpretação de medidas fisiológicas (DUNCAN; PETHERICK, 1991).

Para outros pesquisadores, experiências como frustração, medo, tédio, apesar de subjetivas, são de suma importância pois o bem-estar de um animal só é prejudicado se estiver experimentando um estado mental desagradável (BROOM, 1988; MASON; MENDEL, 1993; SADOO; SIMONSEN, 1992; WEMELSFELDER et al., 2001). Apesar dos aspectos psicológicos serem difíceis de aferir, devem ser utilizados como um meio de identificar a possibilidade de diferentes estados mentais de um animal (BROOM, 1991; DAWKINS, 1980). Muitas tentativas foram criadas para medir o bem-estar, porém a única conclusão universal aceita é que não há uma medida única para esse fim (COCKREM, 2007; CREEL, 2001; DAWKINS, 1980). Portanto, o bem-estar de um indivíduo pode ser definido pelo seu estado no que diz respeito às suas tentativas de lidar com o meio ambiente (ELLIS; JACKSON; BOYCE, 2006; MOSTL, E., PALME, 2002), norteado por duas questões primordiais, a saúde animal, pois é a base de todo bem-estar e compreender as necessidades de cada indivíduo, no sentido de cobrir situações de privação de recursos ou quando submetidos a estímulos excessivos, desencadeando ativações de mecanismos neuroendócrinos para adaptação (HUMAYUN; AOYAMA; SUGITA, 2012; LEDOUX, 2012).

2.2 O estado de conservação da espécie trinca-ferro

O trinca-ferro (*Saltator similis*) é uma ave também conhecida popularmente como bico-de-ferro, tempera-violão ou pixarro, pertencente à Ordem dos *Passeriformes*, subordem *Passeri*, família *Thraupidae* e subfamília *Saltatorinae*. Possui aproximadamente 20 cm de comprimento total e atinge até os 46 gramas de massa. Sua plumagem é em geral verde oliva, com exceção da garganta e do supercílio brancos, não sendo possível a diferenciação sexual

por caracteres morfológicos externos (SICK, 2001). A temporada reprodutiva ocorre entre os meses de setembro a janeiro (SICK, 2001).

Habita o estrato médio e superior das matas, possui comportamento territorialista, sua vocalização forte é uma importante ferramenta para a demarcação do território (RODRIGUES; DE ALMEIDA; DA SILVA, 2019). O canto é composto por uma estrofe de cinco assobios límpidos, apresentando diferenças entre os cantos de cada sexo (MARQUES; Z-MIRANDA, 2009; SICK, 2001). O canto é uma das ferramentas utilizadas pelos passeriformes para estabelecer relações sociais e territorialidade (CATCHPOLE; SLATER, 1995; GIL; GAHR, 2002; LAIOLO et al., 2008; LAIOLO; TELLA, 2005; SLABBEKOORN; SMITH, 2002)

O *Saltator similis* ocorre na Argentina, Bolívia, Paraguai, Uruguai. No Brasil ele pode ser encontrado desde a Bahia até o Rio Grande do Sul (SICK, 2001). De acordo com a União Internacional para a Conservação da Natureza – IUCN o status de conservação é pouco preocupante, e não é considerada como ameaçada no estado de São Paulo (Decreto nº 63.853/2018), no entanto as populações naturais desta espécie encontram-se em declínio (“BirdLife International. *Saltator similis*.”, 2018).

Figura 1 – Trinca-ferro (*Saltator similis*)

Fonte: Dario Sanches – Horto Florestal, São Paulo, BRASIL

2.3 A criação de trinca-ferro e o torneio de fibra

No contexto atual em que estão presentes na sociedade brasileira a cultura na manutenção de pássaros canoros sob cuidados humanos e a realização de torneios de passeriformes organizados e difundidos em todo o país (ALMEIDA, 1991), foi publicada a Instrução Normativa IBAMA nº 10/2011, dispondo sobre o manejo de passeriformes da fauna silvestre brasileira para as etapas relativas às atividades de criação, reprodução, comercialização, manutenção, treinamento, exposição, transporte, transferências, aquisição, (SLABBEKOORN; SMITH, 2002) guarda, depósito, utilização e realização de torneios de pássaros nativos. Este sistema é atualmente gerido pelos Órgãos Ambientais Estaduais, após a publicação da Lei Complementar 140/2011.

De acordo com Gil e Gahr (2002) o canto das aves é um sinal sonoro espécie-específico, sendo evidenciado em machos principalmente em duas situações: na atração de fêmeas para acasalamento e para defesa do território contra outros machos (BRUMM; NAGUIB, 2009; KREBS; ASHCROFT; WEBBER, 1978; NELSON; KROODSMA; MILLER, 1997; SLABBEKOORN; SMITH, 2002). Quando um macho se defronta com outro macho de sua espécie o canto territorial é alterado para demonstrar sua agressividade, o chamado “canto de briga”, que tem seu equivalente semântico na voz territorial ou proclamação de dominância (BROWN, 1978; SICK, 2001; WINGFIELD; GOLDSMITH, 1990). Desta forma, o canto dos indivíduos manifestado durante os torneios de fibra pode proporcionar estímulos constantes percebidos pelo animal como aversivos (BROWN, 1978; WINGFIELD; HEGNER; LEWIS, 1991) e, uma vez que o confronto acontece em ambiente controlado, que impossibilita a fuga do animal, podendo comprometer o bem-estar dos indivíduos.

De acordo com Tostes (1995), existem dois tipos de torneios: o qualitativo, denominado torneio de canto, e o quantitativo denominado torneio de fibra. Este último consiste na aglomeração de vários machos (Figura 2), onde cada indivíduo expressa seu canto, sendo vencedora aquela ave que apresenta maior número de cantos, em duas janelas de horários, a primeira de 15 minutos e a segunda de 10 minutos (Figura 3). As gaiolas são individuais (Figura 4), posicionadas em estacas de 1,5m de altura formando um círculo, com uma

distância de aproximadamente 20 cm entre elas. As disputas se iniciam às oito horas da manhã e se encerram ao meio-dia, com 50 a 80 aves por roda, sendo que em torneios maiores são aproximadamente 100 aves e torneios menores 30 aves (informação verbal¹).

Os torneios são organizados e promovidos por entidades associativas (clubes, federações, associações e confederações), devidamente homologados no DEFAU. Os criadores amadores podem participar apenas se estiverem devidamente cadastrados, com sua situação regular e com as aves registradas no sistema de gestão SISPASS. Também é permitida a participação de criadores comerciais, devidamente registrados, desde que munidos de autorização específica expedida. Cada animal deve ser transportado com uma licença para transportes para torneio, emitida pelo SISPASS, juntamente com a Guia de Transporte Animal (GTA), emitida pela Secretaria da Agricultura e Abastecimento (SAA).

Figura 2 – Roda de gaiolas de trinca-ferro durante Torneio de Fibra

Fonte: Carolina Lorieri Vanin (2018).

Figura 3 – Contagem de canto de trinca-ferro durante Torneio de Fibra.

Fonte: Carolina Lorieri Vanin (2018).

Figura 4 – Gaiola padrão de torneio de trinca-ferro.

Fonte: Carolina Lorieri Vanin (2018).

¹ Informação fornecida por criadores amadores durante torneios de fibra realizados em, Nova Odessa, São José dos Campos, Valinhos, 2018.

2.4 Mecanismo neuroendócrino: estresse x reprodução

Os seres vivos são frequentemente confrontados a estímulos que podem ser externos ou internos, traduzidos como situações desafiadoras ou como agentes estressores. Quando um animal experimenta uma situação estressante, diferentes respostas neuroendócrinas, fisiológicas e comportamentais são expressadas (GRAHAM; BROWN, 1996; MOBERG; MENCH, 2000). A intensidade destas respostas varia em relação à quantidade de estressores às quais o organismo está exposto (frequência, duração e gravidade), adaptabilidade da resposta ao estresse (magnitude de sua ativação e recuperação) e as fontes de enfrentamento disponíveis (SAPOLSKY, 2004).

As respostas neuroendócrinas integradas envolvem a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (MOSTL, E., PALME, 2002; WASSER; HUNT, 2005), com a produção do fator de liberação de corticotropina (CRF) e pela vasotocina arginina (AVT) no hipotálamo (CARSIA; HARVEY, 2000), que estimula a produção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) na hipófise, que por sua vez age no córtex da glândula adrenal produzindo glicocorticóides (corticoesterona) e mineralocorticóides (aldosterona) e na medula adrenal que produz catecolaminas como a noradrenalina e epinefrina (LABAR; LEDOUX, 2001; WASSER et al., 2000). A glândula adrenal de uma espécie de galiforme (*Gallus domesticus*) é dividida em outras camadas, denominadas de subcapsular, zona periférica e zona central, porém o significado funcional dessas diferenças não é completamente compreendido (HUMAYUN; AOYAMA; SUGITA, 2012). Uma possível explicação é que a maior proporção cortical na zona periférica pode ser necessária para maior produção de corticosteroide para a mobilização de energia (BUSCH; HAYWARD, 2009; FINSTERWALD et al., 2015).

A metabolização hormonal é realizada pelo fígado e excretada através das vias biliares, urinária e intestinal (BUSCH; HAYWARD, 2009; FINSTERWALD et al., 2015). Porém, nas excreções dos vertebrados, há uma grande quantidade de outros metabólitos oriundos dos hormônios esteroidais como andrógenos, estrógenos e progestágenos e glicocorticóides, dentre eles a dehidroepiandrosterona e corticoesterona (mais presente nas aves, anfíbios, répteis) e mineralocorticóides (BEERDA et al., 1996; COOK, 2002).

A elevação destes hormônios está associada à resposta ao estresse (GOYMANN; MÖSTL; GWINNER, 2002; KOTRSCHAL et al., 2000; MONFORT, 2003), que pode ser aguda quando as respostas fisiológicas adaptativas estão ligadas a um estímulo nocivo (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000). Constituída de duas vias principais, a primeira é a resposta de luta ou fuga mediada pela liberação de catecolaminas pelo sistema nervoso simpático (AXELROD; REISINE, 1984). A segunda é a resposta hormonal mais lenta mediada pelos glicocorticoides (BEERDA et al., 1996; COOK, 2002; WINGFIELD; O'REILLY; ASTHEIMER, 1995). O feedback negativo garante a diminuição rápida da corticosterona quando há a cessação de um agente estressor (DALLMAN; BHATNAGAR, 2011; SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000). Ou a resposta pode ser crônica, geralmente apresenta concentrações basais de corticosterona cronicamente elevadas (RICH; ROMERO, 2005) causando efeitos deletérios, incluindo supressão da função reprodutiva, supressão do sistema imunológico, perda de massa muscular, supressão do crescimento e morte celular neuronal (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000; WINDFIELD et al., 1997).

Os glicocorticoides são comumente conhecidos como “hormônio do estresse”, porém desempenham diversas funções nos processos fisiológicos, principalmente na aquisição, deposição e mobilização de energia com o aumento dos níveis de glicose no sangue, afetando diretamente o comportamento e outras ações que auxiliam o organismo a responder aos agentes estressores (BEERDA et al., 1996; COOK, 2002). Importante destacar que a dosagem dos níveis de GC não equivale à aferição do “estresse”, e sim como um importante marcador deste, para a regulação das respostas fisiológicas (DEHNHARD et al., 2003; GROOTHUIS; VON ENGELHARDT, 2005; RETTENBACHER et al., 2004).

Em termos de exigências energéticas, a reprodução é considerada uma das etapas mais custosa do ciclo anual (SOCKMAN; SHARP; SCHWABL, 2006). Eventos que levam a distúrbios durante a estação de reprodução podem influenciar se um indivíduo inicia a procriação ou continua com esforço contínuo em busca de alimento, abrigo ou parceiro para reprodução (ANGELIER et al., 2007). O modelo de esforço reprodutivo geral tenta entender os custos de reprodução e os *trade-offs* adaptativos que influenciam a decisão de um

indivíduo de procriar (WILLIAMS, 1966), uma vez que podem estar intrinsicamente ligados à manutenção do equilíbrio energético (DEHNHARD et al., 2003; GROOTHUIS; VON ENGELHARDT, 2005; MCEWEN; WINGFIELD, 2003; RETTENBACHER et al., 2004; ROMERO; DICKENS; CYR, 2009).

A produção de glicocorticóides também está associada a atividade adrenocortical diária, apresentando um ritmo próprio de cada espécie de acordo com as atividades diurnas ou noturnas dos indivíduos (DUSSEAU; MEIER, 1971). O ritmo circadiano representa manifestações de adaptação, sendo características marcantes encontradas nos seres vivos. Este ritmo confere vantagens significativas no organismo, permitindo a sincronização de eventos internos como os ciclos físicos (BREUNER; WINGFIELD, 2000). Entre as aves passeriformes, foram estabelecidos ritmos diários para cinco espécies, tico-ticos-norte-americanos (*Zonotrichia leucophrys gambelli*) (ROMERO; REMAGE-HEALEY, 2000) o pardal-de-garganta-branca (*Zonotrichia albicollis*) (RICH; ROMERO, 2005), o pardal-de-coroa-branca (*Zonotrichia leucophrys*) (PALME, 2019), o estorninho (*Sturnus vulgaris*) (COCKREM, 2007; GOYMANN, 2005; MORMÈDE et al., 2007; PALME et al., 2005; SMALL; SCHOECH, 2015), e o pardal (*Passer domesticus*) (COCKREM, 2007), onde foi encontrado um ritmo unimodal distinto, com mais corticosterona liberada no final da fase escura ou antes de amanhecer. Outros fatores de variação na produção hormonal devem ser considerados durante todo o processo de análise de MGC como: dieta, estágio reprodutivo e diferença de sexo. Porém o fator mais importante dentre todos, é que o “indivíduo” desempenha um papel crucial nos aspectos da análise do estresse (KOOLHAAS et al., 1999), podendo estar relacionados ao metabolismo e excreção de GC (KOOLHAAS et al., 1999).

2.5 Métodos não invasivos para dosagem hormonal

A dosagem dos glicocorticoides e seus metabólitos pode ser realizada a partir de amostras de plasma, soro sanguíneo, saliva, fezes ou urina. No caso das aves a excreção de urina e fezes é feita de forma conjunta através da cloaca, sendo possível a estimativa dos MGC a partir de excrementos cloacais (CARERE et al., 2001; COCKREM; SILVERIN, 2002; GROOTHUIS; VON ENGELHARDT, 2005; HIRSCHENHAUSER; KOTRSCHAL; MÖSTL, 2005;

MÖSTL; RETTENBACHER; PALME, 2005; SCHWABL, 1993; VON ENGELHARDT; GROOTHUIS, 2005). Excrementos normais de aves apresentam três componentes: urina líquida, urato semissólido, branco ou creme e fezes (MACWHIRTER, 2010). Procedimentos que aparentemente parecem simples, como exame físico e coleta de sangue nos animais, acionam o sistema de luta e fuga, estressando os indivíduos manuseados (ROSSI DARE et al., 2019). Desta forma, métodos invasivos tornam-se inadequados para avaliação de hormônios ligados ao estresse, pois podem aumentar os níveis hormonais sanguíneos, gerando um viés nos resultados (GOYMANN; MÖSTL; GWINNER, 2002; KOTRSCHAL et al., 2000). Já a análise de MGC na urina e/ou fezes ou material uro-fecal, permite a realização de estudos de padrões endócrinos em indivíduos ou populações sem causar perturbações ao animal (MONFORT, 2003).

Entre as técnicas para a avaliação hormonal podem-se mencionar os imunoensaios por métodos enzimáticos como os EIA e por métodos de rádio marcação como os RIA. Para escolha da melhor ferramenta deve-se levar em conta os equipamentos disponíveis e a capacidade técnica dos operadores (BROWN; WALKER; STEINMAN, 2004; PALME et al., 2013). O radioimunoensaio mostrou-se válido para avaliar os metabólitos de glicocorticóides fecais (WATSON et al., 2013). Embora amplamente utilizados, os RIAs apresentam desafios para algumas instituições devido aos custos e regulamentações associados ao uso de agentes radioativos. Os EIAs, por outro lado, não são isotópicos e, portanto mais convenientes (WASSER et al., 2000). Uma vantagem que se destaca nos métodos não invasivos de forma geral é permitir estudos longitudinais de dosagens de MGC, em que um animal pode servir como seu próprio controle (WATSON et al., 2013), aumentando o poder das estatísticas aplicadas (GOSSELIN, 2019), contribuindo para reduzir o número de animais necessários para experimentação (RUSSEL; BURCH, 1992).

Um sistema padrão de EIA competitivo direto foi desenvolvido (KURSTAK, 1985; MUNRO; STABENFELDT, 1984), utilizando anti-soro policlonal (CJM006) produzido em coelhos usando protocolo estabelecido para a espécie (MUNRO; STABENFELDT, 1984). Em um estudo realizado por Watson e colaboradores (2013), foi demonstrado que o CJM006 reage de maneira cruzada com os metabólitos glicocorticóides presentes em excrementos

de 38 espécies testadas, incluindo algumas espécies de aves, como *Ara glaucogularis* e *Cyanopsitta spixii*, tornando-o um anticorpo altamente versátil para avaliar os metabólitos glicocorticóides em uma ampla gama de táxons.

Ao se tratar de amostras como material uro-fecal, o método precisa ser validado quimicamente, dada a variedade de metabólitos hormonais neste tipo de amostra, podendo haver mensuração errônea dos níveis hormonais (PALME et al., 1996; TOUMA; PALME, 2005). Para a mensuração acurada são necessários testes de especificidade, sensibilidade e precisão do ensaio, além de serem consideradas variáveis como o controle de exatidão da pipetagem, temperatura, tempo de incubação e análise dos dados, luminosidade, entre outros fatores (BROWN; WALKER; STEINMAN, 2004; PALME et al., 2005).

Para a acurácia da mensuração hormonal pelo método EIA é preciso realizar o teste da validação fisiológica, que reflete os eventos fisiológicos de interesse (BROWN; WALKER; STEINMAN, 2004). Como o anticorpo policlonal, o CJM006 parece detectar vários metabólitos glicocorticóides, bem como a corticosterona para a qual foi produzido (MILLSPAUGH; WASHBURN, 2004; PALME et al., 2005; WASSER et al., 2000). Esta validação é crucial, pois a maioria das espécies carece de hormônios puros em seus excrementos, exibindo uma variedade de metabólitos (PALME et al., 2005; WINGFIELD; O'REILLY; ASTHEIMER, 1995). Este teste envolve a comparação entre dois grupos com diferentes níveis de produção de hormônios glicocorticóides, podendo ser obtida através da estimulação hormonal a partir da administração exógena e a consequente excreção do hormônio (MORGAN WILSON; HOLBERTON, 2001; NAKAGAWA; MÖSTL; WAAS, 2003). Há diferentes métodos farmacológicos para realizar a estimulação ou a inibição da glândula adrenal. A supressão adrenal pode ser obtida com a administração de dexametazona. Para a estimulação da glândula pode ser feita a administração de hormônio adrenocorticotrópico sintético (ACTH) (GOYMANN; MÖSTL; GWINNER, 2002).

Touma e Palme (2005) observaram que apenas a contenção física de tico-ticos-do-ártico (*Zonotrichia leucophrys*) para administração de ACTH foi capaz de promover o estresse. Todavia, Queiroz e colaboradores (2016) não evidenciaram diferenças significativas nas concentrações de MGC de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) após a contenção física. Foi

observado que o aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona após 30 minutos da aplicação intramuscular de ACTH, mostrou-se capaz de elevar os níveis plasmáticos de glicocorticóides e consequentemente os níveis de metabólitos excretados em passeriformes e em pinguins (ASCHOFF, 1960; PITTENDRIGH, 1960). Em passeriformes, C. J. Migeon e colaboradores (1995) realizaram o estímulo de ACTH em machos de cartaxo-comum (*Saxicola torquata rubicola*), observando um aumento significativo de metabólitos excretados entre três e seis horas após a aplicação intraperitoneal de ACTH sintéticos nas aves. Já no desafio de ACTH realizado por Barbosa e colaboradores (2019) em machos de curió (*Sporophila angolensis*), resultou no pico de excreção de MGC 12 horas após aplicação.

Não há trabalhos publicados sobre a validação e dosagens hormonais no trinca-ferro. Entretanto a abordagem de técnicas não invasivas para a realização dessas dosagens vêm sendo amplamente validadas e aplicadas em várias espécies de aves domésticas como, galinhas (*Gallus gallus*) (BERCOVITZ et al., 1982), ganso (*Anser domesticus*) (DEHNHARD et al., 2003), ganso-bravo (*Anser anser*) (DEHNHARD et al., 2003), e em aves silvestres como, águia-de-cabeça-branca (*Haliaeetus leucocephalus*) (THIEL; JENNI-EIERMANN; PALME, 2005), chapim-real (*Parus major*) (WASSER; HUNT, 2005), cartaxo-comum (*Saxicola torquata rubicola*) (SMALL; SCHOECH, 2015), biguá-de-face-branca (*Phalacrocorax carbo*) (DUCKWORTH; JAWOR, 2018), açor (*Accipiter gentilis*) (WASSER et al., 2000), urogalo (*Tetrao urogallus*) (HODGES; BROWN; HEISTERMANN, 2010), coruja-pintada-do-norte (*Strix occidentalis caurina*) (MÖSTL; RETTENBACHER; PALME, 2005), papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) (FERREIRA et al., 2015; FRUHVALD; FERREIRA, 2012; QUEIROZ et al., 2016) gaio-dos-arbustos (*Aphelocoma coerulescens*) (WASSER et al., 2000), cardeal-vermelho (*Cardinalis cardinalis*) (WASSER et al., 2000), curió (*Sporophila angolensis*) (BARBOSA et al., 2019) ararajuba (*Guaruba guarouba*) (SINHORINI; PIZZUTTO; PALME, 2020).

2.6 Comportamento e implicações na avaliação hormonal

Descrições detalhadas e classificações são importantes para padronizar a avaliação comportamental, para que seja possível a realização de estudos quantitativos evitando variações de análise (GROOTHUIS; CARERE, 2005). Os etogramas podem ser usados para desenvolver hipóteses e fornecer orientação para pesquisas futuras e são essenciais para estudos comportamentais mais avançados (HALLE, 2018).

O etograma é um repertório ou inventário de unidades comportamentais de uma determinada espécie (YAMAMOTO; VOLPATO, 2011), ferramenta básica para a melhor compreensão da biologia animal em condições de cativeiro ou em vida livre (ALCOCK, 1997). Seu objetivo é identificar uma série contínua de posturas e de movimentos do corpo ou de partes dele, e por meio disso identificar os comportamentos e correlacioná-los com diversos fatores ambientais (SOUTO, 2005). Algumas atividades são chamadas de eventos de curta duração e outras atividades mais prolongadas indicam estados comportamentais (FREITAS; NISHIDA, 2011; YAMAMOTO; VOLPATO, 2011).

Com a padronização do etograma e com a definição dos meios de registros comportamentais, é necessário definir a unidade comportamental utilizada, que pode ocorrer várias vezes ao longo de um dia ou ao longo de vários dias (FREITAS; NISHIDA, 2011). Um dos métodos utilizados e descritos por Altmann (1974) é o animal focal, método que consiste em observar um único indivíduo de um grupo, o qual será o foco das observações por uma determinada janela de tempo, com registro de seu comportamento e interações sociais. Esse método traz desvantagens para os estudo de campo, porém é considerado adequado para animais mantidos em cativeiro (FREITAS; NISHIDA, 2011).

Padrões característicos comportamentais individuais representam estratégias na vida dos animais com as demandas do meio (GROOTHUIS; CARERE, 2005). Greenberg e Mettke-hofmann, (2001) e Réale e colaboradores (2007) denominam como estratégias de enfrentamento, o conjunto de respostas comportamentais coerentes e fisiológicas ao estresse e aos desafios comuns enfrentados pelo animal, independentemente do estado de sua história de vida, sexo ou estado motivacional (GROOTHUIS; CARERE, 2005). Ao longo do tempo essas estratégias foram rotuladas de diferentes maneiras como síndromes

comportamentais (COCKREM, 2007; SLOAN WILSON et al., 1994), temperamentos (KOOLHAAS et al., 1999; RÉALE et al., 2007), e que também podem ser chamados de personalidades (COCKREM, 2007; VERBEEK; BOON; DRENT, 1996; VERBEEK; DRENT; WIEPKEMA, 1994), estilos de enfrentamento (KOOLHAAS et al., 1999) ou ousadia e neofobia (COCKREM, 2007).

Apesar do contexto funcional da terminologia “estilos de enfrentamento” ser utilizada no contexto da fisiologia do estresse, referente à capacidade e estratégia dos animais ao lidar com situações desafiadoras, foi utilizada a terminologia temperamento para sugerir dois tipos de temperamentos avaliados em diferentes espécies de passeriformes, proativo (rápidos) e reativo (lentos) (COCKREM, 2007; VERBEEK; BOON; DRENT, 1996; VERBEEK; DRENT; WIEPKEMA, 1994). As aves de temperamentos proativas são guiadas por mecanismos internos capazes de estabelecer rotinas, já as aves reativas apresentam maior flexibilidade e tendem a reagir mais a estímulos externos (ambientais) (CARERE et al., 2001). Uma das principais diferenças entre as estratégias de enfrentamento proativo e reativo está no grau de plasticidade comportamental (CARERE et al., 2001; COCKREM, 2007; KOOLHAAS et al., 1999), provavelmente aves proativas terão mais sucesso em um ambiente que permanece constante do que aqueles com personalidades reativas (COCKREM, 2005). Por outro lado, o estilo mais cauteloso das aves reativas pode ser mais bem-sucedido em ambientes em constante alteração, portanto não há personalidade ideal para todas as situações (COCKREM, 2007; GOKULA, 2012; HANLON; SMALE; SAUER, 1994; MACNULTY; MECH; SMITH, 2007).

Porém a análise apresentada de forma bimodal é questionado por alguns autores (GROOTHUIS; CARERE, 2005; KOOLHAAS et al., 1999; RÉALE et al., 2007). Além disso, métodos de escala sustentam aspectos mais intangíveis do comportamento animal (FEAVER; MENDL; BATESON, 1986; WEMELSFELDER et al., 2001) do que simplesmente medidas de comportamentos proativo e reativo. Desta forma o conceito de temperamento é mais adequado para abordar as diferenças comportamentais individuais frequentes ao longo do tempo de forma consistente entre situações (BUDAEV, 1997; GOSLING, 2001; KOOLHAAS et al., 1999; LOWE; BRADSHAW, 2001; RÉALE et al., 2007). A palavra consistente empregada neste contexto não significa que os valores das

características não possam mudar com a idade ou com as condições ambientais, mas que as diferenças entre os indivíduos são amplamente mantidas (RÉALE et al., 2007). O temperamento parece afetar as diferentes maneiras pelas quais o indivíduo interage com seu meio, seja na luta com predadores, na procura por fontes de alimentos e habitat, ou em suas interações sociais ou sexuais com indivíduos específicos (CARERE et al., 2003; RÉALE et al., 2007). Os fenótipos de temperamento serão favorecidos ou desfavorecidos pela seleção, dependendo das condições imposta (RÉALE et al., 2007).

Carere e colaboradores (2003) evidenciam a resposta adrenocortical a um estímulo de conflito social em pássaros canoros (*Parus major*) e ao mesmo tempo, fornecem evidências de uma base fisiológica de diferentes estratégias de enfrentamento em aves. A relação da produção de glicocorticoides difere nos dois tipos de temperamento, aves proativas tendem a responder ao estresse com baixas produção de glicocorticoides, enquanto aves com temperamento reativas produzem altas taxas hormonais (GROOTHUIS; CARERE, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a relação entre a variação dos metabólitos de glicocorticóides e aspectos comportamentais em machos adultos de trinca-ferro (*Saltator similis*) durante torneios de fibra como possível indicador de estresse.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar a validação química do método de imunoenensaio enzimático direto (EIA) para mensurar metabólitos de glicocorticóides em material uro-fecal de machos adultos de *Saltator similis*.
- Realizar a validação fisiológica do método EIA em machos adultos de *Saltator similis*, por meio da ativação da glândula adrenal com hormônio análogo ao ACTH;
- Mensurar e comparar os níveis de metabólitos de glicocorticoides em machos adultos de *Saltator similis*, antes, durante e posteriormente ao torneio pelo método EIA;
- Mensurar o perfil dos metabólitos de glicocorticóides em machos adultos de *Saltator similis* não participantes de torneio oriundos de um único criador amador pelo método EIA, durante o período reprodutivo;
- Descrever, quantificar e comparar as categorias comportamentais dos mesmos indivíduos durante os torneios e durante a manutenção no criadouro pelo método animal focal;
- Avaliar a relação entre a reposta endócrina-adrenal e comportamental nos indivíduos participantes de torneio.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo, processo nº 5498220318 (ID 006615) e pela Comissão Técnica de Avaliação Científica da Divisão da Fauna Silvestre da Prefeitura Municipal de São Paulo sob nº processo 6027.2019-0001450-9. Foi conduzido de acordo com os regulamentos do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA - Instrução Normativa 10/2011), diretrizes de coleta pelo Instituto Chico Mendes de Pesquisa (ICMBIO) e as diretrizes éticas publicadas pela Sociedade Internacional de Etologia Aplicada (ISAE, 2002).

O desenvolvimento da técnica para a dosagem de MGC na espécie *Saltator similis*, bem como as dosagens subsequentes nos grupos estudados foram realizados no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP).

4.1 Diferenciação sexual entre os indivíduos

O trinca-ferro não apresenta dimorfismo sexual de plumagem. Assim, foi realizada a análise genética para a seleção dos machos pelo método molecular PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a partir de amostras de sangue. A obtenção da amostra foi feita em um tempo inferior a 1 minuto, a partir da punção da veia jugular, com auxílio de uma agulha de insulina e seringa de 1ml, sem EDTA. Após a obtenção de 0,02ml de sangue foi colocado em papel filtro, armazenado em freezer a -20°C até seu processamento para isolamento do DNA.

4.2 Critérios para escolha dos criadores

Todas as aves mantidas por criadores amadores, partícipes e não partícipes de torneio de fibra, obtiveram comprovação documental de origem, com anilha registrada em sistema eletrônico federal e/ou nota fiscal da compra, oriundos de criadores amadores de passeriformes devidamente autorizados para manutenção, reprodução e participação em torneio, sendo possível confirmar pelo sistema SISPASS o histórico de vida, data de nascimento,

número de transferências entre criadores e o número de licenças emitidas para participação em torneio.

Para a escolha dos criadores foi realizada uma classificação prévia em três níveis: Razoável (1), Bom (2), Excelente (3), sendo que os criadores selecionados para esta pesquisa foram apenas aqueles enquadrados na categoria 3, esperando-se desta forma diminuir a variação de manejo/ambiente entre os criadores. Foram estabelecidos os seguintes critérios para a classificação destes criadores: higienização (frequência da troca de substrato, nível de limpeza dos poleiros e cochos de comida e água); contato com aves de diferentes espécies; densidade populacional (alta – mais de 10 aves no mesmo local, média com até 10 animais no local e baixa, com menos de 5 animais no local); contato visual ou sonoro com animais de espécies diferentes; acesso a luz solar direto; presença ou ausência de proteção contra intempéries ambientais; qual o tipo de alimentação fornecida (ração extrusada e/ou mistura de semente e/ou frutas); frequência da visita de médico veterinário habilitado; realização de cuidados profiláticos; realização de treinamento com som ambiente e/ou caixa acústica; participação de rodas de treinamento.

4.3 Grupo Torneio de Fibra

Neste projeto foram estudados seis machos de trinca-ferro (*Saltator similis*) (T1), (T2), (T3), (T4), (T5), (T6), adultos, nascidos entre 2008 a 2014, oriundos de diferentes criadores amadores de pássaros nativos, todos com experiência prévia em torneios, conforme Tabela 01.

Tabela 1: Resumo histórico aves partícipes de torneio

	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Anilha	IBAMA OA 3,5 318712	SISPASS 3,5 PR/A 006946	MZ 219442 3,5 06/07 - 004	IBAMA OA 3,5 587738	PRA 594 3,5 0809	IBAMA OA 3,5 226870
Declaração de nascimento	22/08/2008	27/01/2014	05/10/2007	23/06/2010	08/11/2009	25/08/2011
Origem	Amador	Amador	Comercial	Amador	Comercial	Amador
Ano do 1º torneio	2009	2015	2014	2014	2014	2014
Idade 1º torneio	1 ano	1 ano e 8 meses	7 anos	4 anos	8 anos	2 anos

Legenda: dados obtidos através de relatório gerenciais do histórico das anilhas no sistema de gestão de criadores amadores de pássaros nativos – SISPASS. Não foi possível obter dados do ano do primeiro torneio, as informações foram averbadas pelos criadores amadores.

Cada criador realiza diferentes métodos de treinamento para a performance da ave durante os torneios, seja pelo manejo entre gaiolas, pela alimentação e pelo treino realizado, variando dependendo da época do ano e a condição física de cada indivíduo.

As aves são mantidas em gaiolas de distintos tamanhos como voadeiras variando entre 1,20m x 30cm x 43cm a 2,00m x 37,5cm x 50,5cm, gaiolas de manutenção de aproximadamente 28 cm x 80 cm x 40 cm ou gaiolas de torneio de aproximadamente 22 cm x 42 cm x 40 cm, sendo mantidas preferencialmente em salas individuais, sem contato com outras aves. O manejo alimentar difere em porções, frequência e marcas de mistura de semente, ração extrusada e farinhada, com complemento ou não de frutas e/ou legumes e/ou hortaliças, e a água fornecida *ad libitum*. O treinamento consiste pela estimulação visual e/ou sonora da fêmea selecionada como preferida pelo criador para o respectivo macho competidor. Esta estimulação geralmente ocorre em dias que antecede o evento, sendo que em alguns casos a fêmea acompanha o macho durante o trajeto do dia do torneio. As fêmeas não entrarão em contato físico até que este competidor não participe mais de torneios, ou até que este seja selecionado para reprodução.

4.4 Grupo Controle (não participe de torneio)

Foram estudados quatro machos de trinca-ferro (*Saltator similis*) (C1), (C2), (C3), (C4), adultos, nascidos entre 2011 a 2015, oriundos do mesmo criador amador de pássaros nativos, conforme Tabela 2.

Tabela 2: Resumo histórico aves grupo controle

	C1	C2	C3	C4
Anilha	SISPASS 3.5 SP/A 041448	IBAMA OA 3,5 395755	SISPASS 3.5 SP/A 001460	SISPASS SP/A 3,5 056918
Declaração de nascimento	06/02/2015	05/04/2011	16/04/2014	22/04/2015
Origem	Amador	Amador	Amador	Amador

Legenda: dados obtidos através de relatório gerenciais do histórico das anilhas no sistema de gestão de criadores amadores de pássaros nativos – SISPASS.

As aves são oriundas do mesmo criador amador, mantidas em gaiolas individuais de aproximadamente 28 cm x 80 cm x 40 cm, dispostas na mesma sala com outros machos da mesma espécie, sem contato visual. O manejo

alimentar é padronizado para todos, composto de mistura de semente, ração extrusada, com complemento de frutas e/ou legumes sendo a água fornecida *ad libitum*.

4.5 Coleta de material uro-fecal

O material uro-fecal dos animais dos grupos torneio e controle foram coletados após a eliminação natural. Devido as aves apresentarem a eliminação de fezes e urinas de forma conjunta através da cloaca não foi possível realizar a separação das porções, sendo todo o material eliminado pelo animal coletado. As coletas foram realizadas durante três semanas (participação de três torneios por animal), com intervalo de coleta de quatro horas (08h00min, 12h00min, 16h00min, 20h00min). No intervalo de cada coleta, o papel do fundo da gaiola foi trocado e as pinças foram higienizadas com álcool 70%. Cada amostra foi condicionada em tubos Eppendorf® de 1,5 ml, devidamente identificados com nome da ave, dia da semana e horário da coleta (Figura 5 e 6), armazenadas a - 4°C, até processamento laboratorial.

Levando em consideração que os torneios acontecem aos domingos, e que geralmente a rotina da ave é alterada dias antes do torneio, como por exemplo a mudança de gaiola e apresentação da fêmea ao macho competidor portanto, a quinta-feira foi escolhida como dia controle (dia -3). Seguindo com a coleta de amostras um dia antes do torneio, aos sábados (dia-1), no dia do torneio aos domingos (dia 0) e um dia após o torneio às segundas-feiras (dia 1), totalizando 4 dias da semana.

A primeira coleta foi realizada pela equipe do projeto, sendo as coletas subsequentes realizadas pelos criadores devidamente treinados, com o fornecimento de vídeo tutorial, tabela para controle de coleta, manual de orientação impresso para cada um deles e foi realizado o acompanhamento remoto. Os equipamentos para armazenamento e coleta foram fornecidos de forma suficiente para três semanas, sendo que aos domingos de cada sequência de coleta semanal, foi realizada uma visita técnica para verificar como estavam sendo realizadas as coletas, reposição de material e encaminhamento das amostras coletadas ao laboratório.

Figura 5: Kit de coleta

Fonte: Carolina Lorieri Vanin

Figura 6: Eppendorfs® identificados

Fonte: Carolina Lorieri Vanin

4.6 Método de extração de MGC

Todas as amostras foram liofilizadas com o auxílio do aparelho Liofilizador *L108*. Esse processo realiza a retirada de toda a água, garantindo a ausência de ações bacterianas e padronizando também o peso de cada amostra.

As extrações dos metabólitos foram realizadas segundo a técnica preconizada por Schwarzenberger, F., Francke, R., Goeltenboth, R., Klos (1991) e Graham e colaboradores (2001) com modificações. Foi estabelecido como protocolo a pesagem de no mínimo de 0,2 gramas de amostra liofilizadas, porém quantidade de amostra não foi suficiente em todas as coletas, desta forma a diferença foi considerada individualmente no cálculo final de cada dosagem hormonal. As amostras foram diluídas em 5 ml de Metanol 80%, levadas ao *multivortex* com 3500 rpm por 15 minutos, e depois centrifugada em 1500g por mais 15 min, transferindo o sobrenadante resultante para tubos de Eppendorf® de 1,5 ml. Posteriormente 500 µl de cada amostra foram secas, ressuspendida em 250 µl de Metanol 100% e conservados a -20°C até a realização dos ensaios hormonais.

4.7 Validação química do Imunoensaio Enzimático Direto (EIA)

Antes de realizar a dosagem dos metabólitos de glicocorticoides para cada extrato de amostra os parâmetros de qualidade foram realizados utilizando o teste de titulação. O imunoensaio foi testado quanto a especificidade (paralelismo), exatidão e precisão do EIA direto para a espécie em questão. Para quantificar os MGCs utilizamos o anticorpo (Ac) anti-soro policlonal de corticosterona (CJM006 - UC Davis Endocrinology Laboratory), sendo a reação cruzada desse anticorpo previamente descrita por Graham et al. (2001), a corticosterona conjugada 3-O-carboxymetiloxime (HRP) e o padrão de corticosterona (Corticosterone Crystalline, C2505, 500mg – Sigma-Aldrich).

O teste de titulação foi realizado EIA direto, confrontando distintas diluições de Ac (1/4000, 1/8000 e 1/10000) e HRP (1/80000 e 1/160000) com volume de 50µl e 100µl, tendo sido selecionado aquelas que obtivessem uma densidade ótica entre 0,8 e 1,0 em uma leitura a 450nm. O objetivo deste teste foi determinar a melhor relação entre Anticorpo (Ac) e Conjugado (HRP) (FURTADO; OLIVEIRA, 2007).

A especificidade do ensaio foi avaliada pelo teste de paralelismo. Para este fim, um *pool* de extratos foi diluído (1:2 a 1:128 em tampão EIA) e comparando-o com uma diluição em série do padrão de corticosterona (3,9 a 1000 pg / poço, CMJ006). Este teste é realizado para demonstrar se as amostras se comportam de forma semelhante à curva padrão, ou seja, se os metabólitos dos extratos coletados, estão interagindo com os anticorpos de forma similar aos hormônios usados de maneira padrão, e se as amostras estão localizadas dentro de valores confiáveis dentro da dose utilizada, sem subestimar ou superestimar os valores (BROWN; WALKER; STEINMAN, 2004; RETTENBACHER et al., 2005).

Para testar a exatidão ou a interferência da matriz, adicionamos extratos esteróides diluídos 1:6 ou 1:8 a uma diluição em série do padrão de corticosterona (7,8 a 250 pg / poço). O teste de precisão foi estimado através do cálculo dos coeficientes de variação intra e interensaios (CV). O CV médio intraensaio foi calculado para duplicatas de amostra, padrão e controle dentro de cada placa, e o CV interensaio foi calculado para controles de alta (30%) e baixa (70%) ligação, necessário para verificar se houve alteração nas

concentrações de uma mesma amostra (controles) e entre os ensaios (MÖSTL; RETTENBACHER; PALME, 2005). Importante que as concentrações de hormônio tenham valores resposta próximos, com um coeficiente máximo de 20% (BROWN; WALKER; STEINMAN, 2004).

4.8 Validação fisiológica do Imunoensaio Enzimático Direto (EIA)

Foi utilizado ACTH sintético para realizar a validação fisiológica do EIA em machos da espécie do estudo. No protocolo experimental desenvolvido foram utilizados 11 machos adultos, oriundos do Centro de Manejo e Conservação de Animais Silvestres da Divisão de Fauna Silvestre (CeMaCAs/DEPAVE). As aves foram mantidas em gaiolas individuais em uma sala comum, de acordo com os padrões estabelecidos de higienização e alimentação deste projeto, sendo a limpeza e o trato diário realizado pelo mesmo tratador (Figura 7).

As coletas foram realizadas a partir dos excrementos eliminados de forma natural pela ave, no fundo da gaiola (Figura 8), um dia antes da estimulação, no dia da estimulação e um dia após a estimulação, com intervalos de quatro horas entre elas (08h00min, 12h00min, 16h00min, 20h00min, 24h00min e 04h00min), com troca de papel e higienização com álcool após cada coleta, conforme estudos realizados em diferentes espécies de passeriformes e psitacíformes (BARBOSA et al., 2019; FERREIRA et al., 2015; FUJIHARA; FERREIRA, 2008; GOYMANN; JENNI-EIERMANN, 2005; SINHORINI; PIZZUTTO; PALME, 2020).

No dia do desafio hormonal, os onze indivíduos foram divididos aleatoriamente em três grupos: Grupo A, compostos por três indivíduos (V1, V2, V3), foi administrada a dose de 0,5 mg/kg de ACTH sintético (Synacthen®, Sigma Chemical N° A-6303), no Grupo B, composto por quatro indivíduos (V4, V5, V6, V7) foi administrada a dose de 0,25 mg/kg de ACTH e no Grupo C composto por quatro indivíduos (V8, V9, V10, V11), foi aplicado 0,2 ml de solução salina (0,9% NaCl), mesmo procedimento descrito por Barbosa *et al.* (2019) e a dose utilizada por Sinhorini *et al.* (2020). Todas as administrações foram realizadas via intramuscular (I.M.), com agulha de 0,13 mm (Figura 9), entre as 9h00min e 10h00min da manhã, em um único dia.

Foram coletadas 174 amostras em tubos Eppendorf® de 1,5 mL e armazenadas a -30°C. Dados de temperatura, índices pluviométricos e umidade relativa do ar dos dias, também foram conferidas e registradas.

Figura 7: Disposição das gaiolas trinca-ferro CeMaCas

Fonte: Carolina Lorieri Vanin

Figura 8: Material uro-fecal de trinca-ferro

Fonte: Carolina Lorieri Vanin

Figura 9: Musculatura peitoral de trinca-ferro

Fonte: Carolina Lorieri Vanin

4.9 Desenvolvimento da técnica

Para as dosagens de MGC dos trinca-ferros, foi utilizada a técnica descrita por Brown e colaboradores (2004) de imunoensaio enzimático direto (EIA) com pequenas modificações. Foram utilizadas placas de poliestireno contendo 96 poços de alta absorção (Maxisorp), e cada placa foi marcada com 50 µl de anticorpo policlonal (cortisol CJM006 - C. Munro, Universidade da Califórnia, Davis, CA), menos nos dois primeiros poços que foram deixados como brancos. As placas foram cobertas com selador plástico (Axygen) e incubadas a 4°C por 12 horas. A diluição do Ac utilizada foi de 30 µl de Ac acrescidos de 12 ml de

Coating Buffer (Na_2CO_3 1,59 g + NaHCO_3 2,93 g), definida a partir do teste de titulação realizado. Após o período de incubação as placas passaram por quatro processos de lavagem manual adicionando-se 300 μl de Solução de Wash (NaCl 1,5M + Tween-20 0,5%) em cada poço.

A curva padrão (STD) foi mantida dissolvida na proporção de 20ng/ml a - 20°C. Cada ponto da curva padrão foi reconstituído com fator de diluição de 1:2 do HRP corticosterona conjugada em EIA Buffer BSA (Na_2HPO_4 0.1M; NaH_2PO_4 0.1M; NaCl 0.15M cm 0,1% BSA, pH7,0), com nove pontos da curva como concentrações finais de: 9900, 4950, 2475, 1237, 618, 309, 154,6, 77,34, 38,67 pg/ml.

Para o procedimento foram utilizados 50 μl de cada ponto da curva padrão na diluição correspondente, assim como 50 μl das amostras do extrato uro-fecal em cada poço, sempre em duplicata, adicionando posteriormente 50 μl de HRP diluído. As placas foram mantidas em incubação com agitação por duas horas em temperatura ambiente. A luminosidade e a temperatura do laboratório foram controladas a fim de evitar variabilidade associada entre as dosagens realizadas em diferentes dias, conforme descrito por (WATSON et al., 2013), pois esses fatores afetam a confiabilidade do EIA.

Após a incubação as placas foram novamente lavadas e adicionadas 100 μl de Substrato TMB (Neogen Enhanced K Blue), durante três minutos, até que a amostra contendo o padrão “zero” atingisse valores de leitura de densidade ótica entre 0,9 a 1,0 adicionando então 100 μl de Solução Stop (H_2SO_4 + H_2O). A leitura foi realizada pelo aparelho de contagem Revelation Dynex® com absorbância de 405nm e 450nm.

4.10 Coleta de dados comportamentais

Para esta etapa da pesquisa foi utilizado o delineamento experimental de Heffner (2004) com pequenas modificações, que prevê o modelo *ABA*, onde as letras *A*'s representam a situação controle e o *B* o tratamento. O controle (*A*'s) corresponde à rotina habitual dos animais, visando à previsibilidade ambiental (WATTERS, 2009), sem qualquer alteração física ou alimentar. Assim, cada criador fornecia o manejo e trato ao indivíduo conforme de costume. Nesta fase não houve nenhum tipo de interferência ou padronização do estilo da sala em que as gaiolas eram mantidas ou ambientação. A fase *B* corresponde ao

enriquecimento ambiental, neste estudo foi representado pelos eventos dos torneios de fibra, contendo imprevisibilidades, tanto espaciais como temporais (WATTERS, 2009). É relevante destacar que cada ave participou de eventos diferentes, entre os meses de novembro a janeiro do mesmo ano.

A fase A foi realizada uma única vez, com registro em vídeo de dez minutos de cada ave, respeitando os mesmos meses em que os torneios aconteceram. A fase B foi realizada em três torneios distintos, com duração de quatro horas cada, realizada aos domingos, das 8h00 às 12h00. Para o registro de vídeo foram escolhidos três momentos diferentes em cada torneio, sendo o primeiro registro de vídeo no início do evento às 8h00, o segundo às 10h00 e o terceiro às 12h00, e cada um possui duração de 10 minutos. A câmera de vídeo digital (JVC GZ-HD500; Tóquio, Japão) foi posicionada a 2 metros de distância da gaiola em que a ave era mantida, sem interferir na dinâmica da criação (fase A) e da roda do torneio (fase B). O enquadramento do vídeo buscou registrar todos os ângulos da gaiola, com poucas variações de angulação.

As imagens foram armazenadas em uma memória SD, totalizando 560 minutos de coleta de dados comportamentais. Entretanto não foi possível coletar vídeos no ambiente criação de três aves participantes de torneio, e uma ave não participou de torneio, devido ao óbito de duas delas (T1 e T5), inviabilidade de um dos criadores fornecer as imagens solicitadas da ave T6 e transferência para outro criador da ave C3 meses antes desta última etapa.

Foi utilizado o método de observação animal focal de registro contínuo (ALTMANN, 1974), as imagens foram analisadas com auxílio do software CowLog (PASTELL, 2016), contabilizando a duração e frequência dos comportamentos em segundos (s) durante os dez minutos de cada gravação (Figura 10). O etograma aplicado foi instituído por Barbosa et al. (2019), com pequenas modificações, sendo os comportamentos classificados nas seguintes categorias: “vigilância/alerta”, “manutenção”, “exploração”, “deslocamento”, “forrageamento”, “dormir” e “outros” (Tabela 3). Posteriormente foi determinada a proporção de tempo de cada categoria por indivíduo e a frequência do comportamento.

Devido ao comportamento combativo observado em passeriformes expresso pelo canto, (CATCHPOLE; SLATER, 1995; GIL; GAHR, 2002; LAIOLO et al., 2008; LAIOLO; TELLA, 2005; SLABBEKOORN; SMITH, 2002), pelas

diferentes estratégias adotadas para expressar a territorialidade, como diminuição de descanso e aumento da atividade de vigilância (RANSOM, 1981; SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000), as categorias “vigilância/alerta”, “deslocamento” e “exploração” descritas no etograma, foram associadas a expressão de territorialidade em trinca-ferro.

Tabela 3: Descrição das categorias comportamentais que compõem o etograma utilizado na espécie trinca-ferro

CATEGORIA	COMPORTAMENTO	CONTEXTO
VIGILÂNCIA/ALERTA	Em pé no solo	Ave de pé com a cauda mantida levemente elevada e/ou voltada para a esquerda ou direita. Uma das asas, a que corresponde ao lado para o qual a cauda está voltada, é mantida sobre o uropígio e a outra levemente caída. O bico pode estar fechado ou aberto, emitindo ou não sons/canto. Apresenta movimentos com o pescoço para direita ou para a esquerda, para cima ou para baixo
	Em pé poleiro	Ave de pé com as pernas levemente flexionadas do que quando está em repouso, penas não eriçadas, asas não estão elevadas ou caídas e o pescoço nem distendido ou encolhido, apresenta movimentos com o pescoço para direita ou para a esquerda, para cima ou para baixo. Ave pode estar emitindo ou não sons/canto, o bico pode estar aberto ou fechado.
	Segurar os fios da gaiola	A ave fica suspenso nos fios da gaiola, no teto ou nas laterais da gaiola. As asas ficam junto ao corpo. Ave pode estar emitindo ou não sons/canto, o bico pode estar aberto ou fechado e apresentar movimentos com o pescoço para direita ou para a esquerda, para cima ou para baixo
MANUTENÇÃO	Espreguiçar	Parada de pé no poleiro, a ave ergue o corpo mantendo a cabeça junto ao corpo e o bico apontando um pouco para baixo, à medida em que estica a pata (incluindo os dedos) e a asa correspondente completamente aberta para baixo (um pouco para o lado), o corpo é levemente inclinado para o lado oposto a fim de manter o equilíbrio. A cauda pode manter-se fechada ou em leque.
	Arrepiar as penas	As penas do corpo, principalmente as do alto dorso, peito e pescoço, são lentamente eriçadas e acomodadas novamente.
	Sacudir as penas e asas	São movimentos rápidos e em semicírculos, onde o pássaro sacode todas as penas do corpo junto as asas, baixando as penas depois de forma um pouco mais lenta do que no caso anterior. Esse movimento pode ocorrer somente com as penas da coroa, occipício, nuca e garganta, ou somente na cauda com as retrizes entreabertas e lançadas lateralmente.
	Arrumar e limpar as penas	As aves arrumam as penas das asas, cauda, dorso e ventre com o bico. Este comportamento não apresenta padrões ou ordem de limpeza e inclui a abertura e levantamento de uma asa por vez, para acessar as penas abaixo desta. A ação arrumar, inclui a remoção de penas soltas, alisar e a organização das penas que tivessem deslocadas.
EXPLORAÇÃO	Movimentar no solo	O deslocamento no solo é realizado através de saltos desajeitados, onde a ave mantém as duas patas juntas. A cauda fica um pouco elevada e voltada para um dos lados, enquanto a asa deste mesmo lado fica sobre a outra. O

		deslocamento pode ser de frente ou para traz, para direita ou para esquerda, ou apresentar uma rotação de 180° posicionando-se para lado oposto do que se encontrava inicialmente.
	Movimentar no poleiro	A ave de pé, em cima do poleiro se desloca lateralmente dando pequenos saltos no mesmo poleiro. O salto consiste em um impulso dado simultaneamente pelas duas pernas, a ave pode apresentar uma rotação de 180° com o corpo. Algumas vezes, além do impulso das pernas, a ave dá uma ou mais “batidas” de asa, pousando com as asas estendidas e segurando firme com os dedos, fechando as asas rapidamente.
DESLOCAMENTO	Saltar	No poleiro, a ave se mantém em pé, salta para cima com um impulso de suas duas patas, pousando novamente em pé em outro poleiro com as asas entreabertas ou fechadas. Apresenta-se dois tipos de saltos. O primeiro é um salto interrompido, já que pousa em um poleiro intermediário por uns segundos, e passa para o próximo, alternando ou não a orientação inicial. O segundo é um salto entre poleiros com distância maior de 15cm, assim como para deslocamentos entre as paredes laterais da gaiola (incluindo o teto). O deslocamento pode ser em diferentes alturas (teto/solo ou poleiro mais alto para poleiro mais baixo), ou entre as laterais da gaiola, não alterando a altura.
	Voar	A ave voa de um lado a outro da gaiola partindo das laterais da gaiola ou dos poleiros. Às vezes, o pássaro retorna ao poleiro de onde partiu ou pousa nas laterais da gaiola (teto e paredes) ou outro poleiro, mas não pousa no chão. O pássaro pode manter o voo no centro da gaiola por poucos segundos.
FORRAGEAMENTO	Beber água	A ave de pé sobre o poleiro (bebedouros colocados ao lado dos poleiros) inclina o corpo para frente e estica o pescoço de forma que a metade de seu bico alcança a lamina d’água, posteriormente levanta o pescoço esticando para cima e engolindo a água.
	Comer	As aves primeiramente seguram com o bico a fruta ou semente, ingerindo a parte interna após quebrá-la. O movimento completo, consiste desde o início da interação com alimento, movimentos mastigatórios, até deglutição completa. A ave pode manter-se de pé perto do comedouro ou segurando-se nos fios da gaiola.
DORMIR	Dormir	A ave dorme no poleiro com o ventre sobre este ou em pé com as pernas semiflexionadas. A cabeça voltada sobre o dorso e a ave pode esconder o bico na plumagem eriçada do dorso. As asas ficam um pouco “caídas” junto ao corpo.
OUTROS	Bicar fruta ou objetos	Com auxílio da porção mais externa do bico, agride ou pressiona a superfície da fruta ou objetos (bebedouros ou poleiros) sem a ingestão da mesma, finalizando com balaços rápido da cabeça.
	Auto bicagem	Ave em pé sobre o poleiro ou substrato do chão, bica os membros posteriores e cauda, com movimentos mais rápidos e sem padrão de ordem ao se comparar com os de manutenção.
	Colocar bico entre os fios da gaiola	Com a ave empoleirada na grade da gaiola realiza movimentos de cabeça para frente e para trás, a ave insere o bico, até a base, entre duas grades da gaiola, rapidamente e repetidamente.

Figura 10: Análise de vídeo software CowLog

Fonte: Carolina Lorieri Vanin

4.11 Análise dos dados

Na validação do imunoensaio enzimático, a especificidade foi avaliada pelo teste de paralelismo entre as curvas referentes à diluição do padrão de corticosterona *versus* a diluição do *pool* das amostras de trinca-ferro, foi realizado um teste *t* para avaliar as diferenças entre os coeficientes linear e angular das curvas, depois de ajustar os dados no Log10. A porcentagem de exatidão foi determinada pela divisão da concentração observada pela concentração esperada, multiplicando-se este valor por 100.

Foram apresentados em forma de gráfico os resultados da validação fisiológica do EIA direto, com as dosagens de MGC em unidade de ng/g de cada indivíduo nos dias pré-desafio, desafio e pós-desafio. Foram considerados picos valores que ultrapassaram a média da concentração hormonal obtida de todas as amostras por indivíduo, acrescidas de dois e meio do desvio padrão (BROWN et al., 1988).

Foi utilizado o modelo linear generalizado (GLM) para análise do ritmo diário depois da transformação dos dados em log10. As concentrações do MGC da variação hormonal nos indivíduos do grupo torneio e grupo controle foram expressos em valores médios, juntamente com seu erro padrão,

respectivamente, como medidas de tendência central e de variabilidade dos dados. Foi realizada transformação em raiz quadrada para análise pelo modelo GLM seguido de teste *post hoc* de *Duncan*, sendo consideradas como variáveis independentes os horários das coletas.

Foi utilizado o mesmo modelo estatístico para análise das categorias comportamentais observadas nos diferentes momentos do torneio (começo, meio e fim), depois da transformação em raiz quadrada. Para expressar a frequência das categorias comportamentais foi utilizada como medida de tendência central a mediana e como medida de variabilidade dos dados foi utilizado erro padrão. Para a análise da frequência média do comportamento observado no grupo torneio em diferentes momentos e no grupo controle, foi utilizado o *Test t Student*, seguido de teste *post hoc* de *Duncan*.

Para teste de correlação entre as dosagens hormonais e a frequência de comportamento observado foi utilizado teste de correlação de *Person*. Todos os dados foram analisados utilizando o software Statistical Analysis System (versão 9.3 - SAS, Windows, EUA). Para todas as análises estatísticas foi considerado o nível de significância de 95% ($\alpha \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros de qualidade dos ensaios hormonais

O controle de qualidade para o ensaio de corticosterona, pelo método EIA direto, foi realizado através do teste de titulação, onde a melhor curva obtida foi com a diluição Anticorpo 1/4000 e o HRP 1/80000 ($r=0,99$, $p<0,0001$). Para análise precisão dose-resposta foi realizado a análise do coeficiente de variação (CV) intra-ensaio de 5,08% e inter-ensaio 8,24% detectada em cada ensaio realizado, com exatidão de $96,07(\pm 3,16)\%$.

O coeficiente angular (*slope*) da curva para a concentração de log por porcentagem de ligação (%Binding) (*slope*= $-38,13\pm 2,33$) foi essencialmente igual à da curva padrão de corticosterona (*slope*= $-32,98\pm 4,03$, $p=0,75$). Assim, a similaridade imunogênica entre o antígeno padrão e os antígenos das amostras dos trinca-ferros (*pool*) mostrou paralelismo, validando a análise (Gráfico 1).

Gráfico 1. Paralelismo dos níveis de metabólitos de glicocorticóides em material uro-fecal detectados em trinca-ferro usando imunoensaio enzimático direto de corticosterona. Curva padrão (círculo) ($Y=-38,13 \cdot X+185$, $r^2=0.98$); extrato de material uro-fecal (triângulo) ($Y=-32,98 \cdot X+151$, $r^2=0.94$).

5.2 Variação dos MGCs na validação fisiológica EIA

Os valores absolutos das concentrações de metabólitos de glicocorticoides de trinca-ferro obtidas durante 24 horas antes e 40 horas após o tratamento, nos 11 indivíduos distribuídos aleatoriamente entre os Grupos A, B e C estão representados nos Gráficos 3, 4 e 5.

Foram identificados os valores de pico de MGC nas dosagens 8 horas e 12 horas após a estimulação farmacológica no Grupo A atingindo valores de até 173,75ng/g, valor 2,9 vezes maior do que a dosagem de MGC mais elevada do Grupo C (59,57 ng/g). Também foi identificado pico após a aplicação de ACTH em duas aves (V4 e V6) do Grupo B, 16 horas e 20 horas após aplicação de ACTH, mais tardiamente quando comparadas com o Grupo A. Não foi observado efeito do tratamento realizado na dose de 0,25mg/kg de ACTH em duas aves (V5 e V7) do Grupo B e com as aves que receberam solução salina do Grupo C.

Após o pico de excreção de MGC, houve uma gradual redução na concentração hormonal, sendo 12 horas no Grupo A e 24 horas após a aplicação do tratamento no Grupo B, posteriormente as concentrações de MGC voltaram aos níveis inicialmente detectados.

Gráfico 2. Grupo A - variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides (ng/g) em material uro-fecal de três machos de trinca-ferros (*Saltator similis*), submetidos ao desafio de ACTH (tempo 0), apresentando pico (*).

Gráfico 3. Grupo B – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides (ng/g) em material uro-fecal de quatro machos trinca-ferros (*Saltator similis*), submetidos ao desafio de ACTH (tempo 0), apresentando pico (*).

Gráfico 4. Grupo C – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides (ng/g) em material uro-fecal de quatro machos trinca-ferros (*Saltator similis*), submetidos ao tratamento com solução salina (tempo 0), sem apresentação de pico hormonal.

5.3 Ritmo diário

Ao avaliar a variação das concentrações de MGC ao longo de um dia, em onze indivíduos do grupo validação fisiológica, foi observado efeito estatisticamente significativo entre as horas do dia ($p = 0,003$) (Gráfico 2). Os testes *post hoc* indicaram concentrações de MGC mais baixas às 08 horas ($28,55 \pm 3,35$ ng/g) e maiores concentrações às 24 horas ($37,63 \pm 6,67$ ng/g). As dosagens de MGC da linha de base mostraram variação entre 14,72 ng/g a 89,39 ng/g.

Gráfico 5. Variação diurna das concentrações de metabólitos de glicocorticoides (transformados $\log_{10}$) em 11 machos de trinca-ferro (*Saltator similis*), mantidos em cativeiro sob variação de luz natural (nascer do sol: 6h38 – pôr do sol: 17h47) em função das horas de coleta. Os valores medianos são mostrados como uma linha nas caixas. Asteriscos indicam diferenças significativas ($F=4,53$; $p=0,003$ teste GLM *pos Duncan*).

5.4 Variação dos MGCs Grupo Torneio e Grupo Controle

Os valores médios e erro padrão da dosagem de metabólitos de glicocorticoides de trinca-ferro (*Saltator similis*) obtidas durante as três semanas, dos seis indivíduos do Grupo Torneio estão representados no Gráfico 6.

Foi observada uma variação hormonal marcante nos indivíduos T1, T3 e T5 com aumento gradativo nas concentrações de MGC no dia pré-torneio, atingindo maiores concentrações no dia do torneio e diminuição no dia pós torneio, entretanto apenas o indivíduo T1 obteve diferença significativa ($F_{t1}(2,95)$ $p=0,04$; $F_{t3}(0,83)$ $p=0,48$; $F_{t5}(1,11)$ $p=0,35$) entre o dia controle e dia torneio do

mesmo indivíduo. Foi notada elevação na concentração hormonal no indivíduo T2 no dia pré-torneio e dia do torneio, quando comparamos com o dia descanso, e com queda marcante no dia pós-torneio, atingindo concentrações menores do que no dia descanso, porém sem diferença significativa ($F_{t2}(0,13) p=0,94$) no modelo estatístico empregado. O indivíduo T4 apresentou maiores concentrações hormonais no dia pós-torneio, com diferença significativa ($F_{t4}(5,76)p<0,02$). Não houve diferença nas médias das concentrações hormonais nos diferentes dias da semana no indivíduo T6 ($F_{t6}(0,13)p=0,94$).

Gráfico 6. Variação média das concentrações de metabólitos de glicocorticoides (ng/g) em material uro-fecal de seis tringa-ferros (*Saltator similis*) participantes de torneio de fibra, em função dos diferentes dias de coleta. Médias com letras diferentes na barra de erro padrão diferem entre si (teste pos *Duncan*).

A média de todas as amostras coletadas do grupo torneio foi $54,46 \pm 1,07$, o modelo estatístico mostrou uma tendência de maiores concentrações de MGC ($F_{G.T.}(2,37) p<0,07$) no dia do torneio, e uma diferença significativa entre as concentrações hormonais do dia considerado descanso (dia -3= $44,99 \pm 3,22$) e dia do torneio (dia 0= $54,21 \pm 5,61$), sendo o dia pré-evento (dia -1= $68,87 \pm 8,18$) e dia pós-evento (dia 1= $54,45 \pm 4,25$) iguais entre si, e semelhantes com o dia descanso e dia do torneio (Gráfico7).

Gráfico 7. Valores médios da concentração de metabólitos de glicocorticóides (ng/g) em material uro-fecal de seis machos de trinca-ferros (*Saltator similis*) participantes de torneio de fibra, em função dos diferentes dias de coleta. Médias com letras diferentes na barra de erro padrão diferem entre si ($F_{G.T.}(2,37) p < 0,07$ teste pos *Duncan*).

Os valores médios e erro padrão para a dosagem de metabólitos de glicocorticóides de quatro trinca-ferros (*Saltator similis*) obtidas durante três semanas do Grupo Controle, em quatro dias da semana (dia 1=53,92±2,58, dia 2=49,42±2,41, dia 3=52,65± 2,62 e dia 4=48,77± 2,94) correspondente aos mesmos dias da semana do Grupo Torneio, estão representados no Gráfico 8.

As concentrações médias dos MGC de três dos quatro indivíduos do grupo controle C1 ($F_{c1}(1,20) p=0,32$) C2 ($F_{c2}(0,13) p=0,94$) e C4 ($F_{c4}(0,65) p=0,58$) não apresentaram diferença significativa, apenas no indivíduo C3 ($F_{c3}(2,23) p=0,09$) apresentou diferença no dia 1 com queda gradual nas concentrações hormonais nos dias subsequentes. Não foi observada variação hormonal individual nos diferentes dias da semana como alguns indivíduos do Grupo Torneio.

Gráfico 8. Variação da média das concentrações de metabólitos de glicocorticoides (ng/g) em material uro-fecal de quatro trinca-ferros (*Saltator similis*) não participantes de torneio de fibra (Grupo Controle), em função dos diferentes dias de coleta. Médias com letras iguais na barra de erro padrão não diferem entre si (teste pós *Duncan*).

A média de todas as amostras coletadas do grupo controle foi $51,18 \pm 0,65$, o modelo estatístico mostrou que não há diferença significativa nas concentrações de MGC nos diferentes dias de coleta ($F_{G.C.}(1,56) p < 0,2$) (Gráfico 9).

Gráfico. 9 Valores médios da concentração de metabólitos de glicocorticóides (ng/g) em material uro-fecal de quatro trinca-ferros (*Saltator similis*) não participantes de torneio de fibra (Grupo Controle) em função dos diferentes dias de coleta. Médias com a mesma letra na barra de erro padrão não diferem entre si ($F_{G.C.}(1,56) p > 0,2$ pelo teste pós *Duncan*).

5.5 Variação comportamental

Durante os torneios não foi observada nenhuma diferença significativa da frequência das categorias comportamentais observadas entre os momentos de cada torneio (início, meio e fim) e dias avaliados dos seis indivíduos do grupo, exceto pela categoria forrageamento, a qual apresentou diferença significativa ($F(2,45)p>0,06$) no modelo estatístico empregado no fim do torneio, momento o qual a fruta é retirada da gaiola da ave. Desta forma foi utilizada a média das categorias comportamentais observadas durante o evento torneio para as análises subsequentes.

A mediana das categorias comportamentais dos indivíduos do grupo torneio, registradas durante o evento e as observadas no ambiente criação estão compiladas no Gráfico 10. Os comportamentos “vigilância” ($t(-4,82) p<0,001$) e “exploração” ($t(-2,65) p=0,01$) foram significativamente mais observados no ambiente do torneio, representando respectivamente 31% e 20% do total de registros computados do que no ambiente criação 5% e 6%. Foi notada uma tendência de maior frequência na categoria “deslocamento” ($t(-1,70)p=0,09$) no ambiente torneio (21%) do que no ambiente criação (9%). Quanto à mediana da “manutenção” foi registrada apenas no ambiente criação ($t(1,17) p=0,36$), porém sem diferença significativa no modelo estatístico aplicado. Na categoria “forrageamento” em ambos ambientes obtiveram a porcentagem de 2% do total de registros comportamentais ($t(0,44) p=0,66$), e em nenhum dos ambientes foi registrada a categoria “dormir”.

É importante ressaltar que apesar da falta de diferença significativa ($t(-1,38) p=0,17$) da categoria comportamental denominada como “outros”, alguns comportamentos como bicar fruta, auto-bicagem e colocar o bico entre os fios da gaiola foram registrados exclusivamente no ambiente torneio.

Gráfico 10. Frequência das categorias comportamentais observadas em seis machos de trinca-ferro (*Saltator similis*), durante os torneios e três destes indivíduos no ambiente criação. Dados de 500 minutos no ambiente torneio e 30 min no ambiente criação, representado pela mediana e barra de erro padrão.

Ao verificar a relação entre a variação das medidas das categorias comportamentais “vigilância”, “exploração”, “deslocamento”, que foram associadas com a expressão do comportamento de territorialidade, com a média das dosagens de metabólitos de glicocorticoide no dia do torneio, não foi possível verificar correlação significativa ($p > 0,4$).

Quando comparamos a mediana das categorias comportamentais de três indivíduos do grupo torneio, com quatro indivíduos do grupo controle no ambiente criação (Gráfico 11) foi possível observar maior frequência da categoria “vigilância” no grupo controle, representando 18% do total de registros computados *versus* 11% no Grupo Torneio, enquanto os indivíduos do grupo torneio apresentam maior frequência de “exploração” 14% do total de registros, enquanto o grupo controle apresentou 5%, entretanto em nenhuma dessas e demais categorias foi obtido diferença significativa ($p > 0,3$).

Gráfico 11. Frequência das categorias comportamentais observadas em seis trincas-ferros (*Saltator similis*) machos durante o ambiente criação sendo três indivíduos do Grupo Torneio (30 min) e três indivíduos do Grupo Controle (30 min), representado pela mediana e barra de erro padrão não diferem entre si ($p > 0,3$).

6 DISCUSSÃO

Foi identificada resposta de estresse agudo nas aves partícipes de torneio durante as competições de fibra. Na validação química analítica do EIA direto CJM006 para quantificação de MGC em machos de trinca-ferro, o teste de paralelismo revelou comportamento similar às diluições seriadas no *pool* de machos da espécie avaliada e as diluições seriadas do hormônio padrão utilizado (corticosterona), confirmando que o imunoensaio é indicado para avaliar as concentrações do hormônio estudado, neste caso os metabólitos de glicocorticóides. Os parâmetros de qualidade apresentam ótima taxa de precisão e porcentagem de exatidão, sendo os coeficientes intra e inter-ensaio menores que 10%, similar aos encontrados em literatura (BARBOSA et al., 2019; BROWN; WALKER; STEINMAN, 2004; LÈCHE et al., 2009; POPP et al., 2008; RETTENBACHER et al., 2005; SINHORINI; PIZZUTTO; PALME, 2020). Os resultados obtidos a partir do teste de titulação para dosagem de corticosterona pela técnica de EIA, resultaram em uma curva dentro dos padrões esperados, apresentando valores de r^2 próximos a um (FURTADO; OLIVEIRA, 2007). Estes parâmetros de qualidade são necessários para assegurar a adequabilidade do método de dosagem para a identificação do metabólito esperado (BROWN; WALKER; STEINMAN, 2004), pois não foram observadas sub ou super estimação dos resultados.

A administração do hormônio ACTH sintético para estimular a produção de corticoide mostrou-se eficiente para indicar a relação de causa e efeito entre a indução e a excreção dos metabólitos de glicocorticoides (MGC), validando a técnica fisiologicamente do teste de EIA direto proposto. As diferenças interindividuais em relação às concentrações basais de MGC observadas neste experimento para o cálculo do pico, também foram encontradas em outros estudos realizados até agora (FERREIRA et al., 2015; MOSTL et al., 1999; ROMERO; REED, 2005). As diferentes origens, experiências prévias, histórico de vida e temperamento dos indivíduos deste estudo podem influenciar a variação hormonal entre eles (RÉALE et al., 2007), como encontrado em aves da espécie *Parus major* (CARERE et al., 2003; GROOTHUIS; CARERE, 2005).

Os picos de MGC encontrados em indivíduos do Grupo A e B da validação fisiológica confirmam que a atividade adrenal da espécie trinca-ferro pode ser

monitorada por meio da determinação desses metabólitos. Se a diferença do horário de pico foi causada devido à dose utilizada é um fato que ainda precisa ser investigado. A resposta à estimulação hormonal também foi evidenciada em outros estudos com passeriformes como em *Zonotrichia leucophrys* (ROMERO; WINGFIELD, 1999), *Junco hyemalis* (WILSON; HOLBERTON, 2001), com aumento das concentrações de corticosterona e *Saxicola torquata rubicola* (GOYMANN; MÖSTL; GWINNER, 2002) e *Sporophila angolensis* (BARBOSA et al., 2019), com o aumento das concentrações dos MGC, seguidos da normalização dos níveis. A dose do fármaco não está bem estabelecida para a espécie, sendo o fármaco de uso humano, utilizado em diferentes espécies como relatado na revisão realizada por Palme (2019) e em espécies aves como *Anas platyrhynchos* (S. HARVEY, 1980), *Ara ararauna* (DE ALMEIDA; PALME; MOREIRA, 2018), *Corvus corax* (STOCKER et al., 2016), *Pygoscelis adeliae* (NAKAGAWA; MÖSTL; WAAS, 2003), sendo a dose utilizada neste estudo a mesma administrada em *Guaruba guarouba* (SINHORINI; PIZZUTTO; PALME, 2020).

A aplicação de solução salina não mostrou ser eficaz para o aumento na produção de MGC em trinca-ferro, como relatado em estudos realizados em passeriformes e em outras espécies de aves, *Gallus domesticus*, *Phalacrocorax carbo*, *Accipiter gentilis* (DEHNHARD et al., 2003), *Zenaida macroura* (WASHBURN et al., 2003), *Melopsittacus undulatus* (YOUNG; HALLFORD, 2013) *Sporophila angolensis* (BARBOSA et al., 2019), diferentemente dos achados em *Amazona aestiva* (FERREIRA et al., 2015; FUJIHARA; FERREIRA, 2008) e *Guarouba guarouba* (SINHORINI; PIZZUTTO; PALME, 2020). Romero e Wingfield (1999) observaram que apenas a contenção física durante 30 minutos foi capaz de promover o aumento da corticosterona plasmática em tico-ticos-do-ártico (*Zonotrichia leucophrys*). Esta resposta ao estímulo estressor físico, seja pela contenção física, e/ou dor física, por meio da aplicação de medicamento pela via intramuscular, ora eficiente ora ineficiente na estimulação hormonal de corticosterona e seus metabólitos, não devem ser utilizadas como método único para encontrar picos de metabólitos de glicocorticoides em testes de validação fisiológica de ensaios hormonais.

Quando se estuda a excreção de MGC deve-se levar em consideração a forma de obtenção das amostras. Neste estudo o material uro-fecal continha a

porção de fezes e urato, a urina líquida não foi colhida, devido à dificuldade da coleta de substâncias líquidas pelo método utilizado. Wasser e Hunt (2005) afirmam que há mais hormônio excretado nas fezes do que na urina, quando expresso por grama de fezes ou por mililitro de urina, sendo mais confiável para a realização da dosagem hormonal as fezes ou volume total de excrementos da ave e ainda ressaltam a necessidade da separação do urato, por não conter hormônios. Porém, não foi possível realizar a separação da porção do conteúdo intestinal do conteúdo uretral de trinca-ferro devido à configuração da excreta eliminada pela ave. Wasser e Hunt (2005) utilizaram água para separar a urina das fezes, ocasionando uma possível hidrólise das esferas de urato aviário. A adição de água às esferas de urato é relatada como causadora de recristalização espontânea com a liberação subsequente de solutos incorporados (DREES; MANU, 1996). Consequentemente os metabólitos esteróides radiomarcados nas esferas de urato podem ter sido liberados na fase líquida da urina analisada separadamente, onde foram detectados em quantidades significativas (WASSER; HUNT, 2005). A presença de corticosterona nas esferas de urato aviário foi detectada em uma espécie de passeriforme *Parus major* (CLAPP, 2010) diferentemente do relatado por Wasser Hunt (2005) .

A variação diurna na concentração de MGC observada em material urofecal em trinca-ferro no dia pré-desafio pode estar relacionada às mudanças circadianas na liberação de glicocorticóides (BREUNER; WINGFIELD, 2000; CARERE et al., 2003; COCKREM, 2007; PALME, 2019; RICH; ROMERO, 2005) e variações ambientais, como fotoperíodo (ASSENMACHER; BOISSIN, 1972; POPP et al., 2008; ROMERO; REMAGE-HEALEY, 2000). Assenmacher e Boissin (1972) relataram que apesar do fotoperíodo ser o fator predominante na regulação endócrina, o padrão circadiano de circulação de corticosterona em aves pode permanecer inalterado em diferentes fotoperíodos.

Foi encontrada variação no ritmo diário na espécies de passeriforme *Sturnus vulgaris* com aumento da corticosterona no final do período escuro (RICH; ROMERO, 2005; ROMERO; REMAGE-HEALEY, 2000), em outras espécies como *Sporophila angolensis* (BARBOSA et al., 2019) e *Amazona aestiva* (FERREIRA et al., 2015) apresentam aumento das concentrações de seus metabólitos no primeiro horário da manhã e na espécie *Guaruba guarouba* no período da tarde (SINHORINI; PIZZUTTO; PALME, 2020), diferentemente do

encontrado no trinca-ferro, onde o aumento dos MGC foi identificado na fase escura. As amostras coletadas para o cálculo do ritmo diário foram realizadas no dia em que os indivíduos não sofreram qualquer tipo de alteração em suas rotinas ou manejo, executado no mês de agosto. Para avaliar se há influência sazonal na variação de MGC na espécie trinca-ferro, como relatado em *Zonotrichia leucophrys* (ASTHEIMER; BUTTEMER; WINGFIELD, 1994), investigações hormonais em diferentes épocas do ano serão necessárias.

Levando em consideração a variação hormonal observada no grupo torneio, com o incremento da excreção de MGC no dia do evento, é evidente que o dia do torneio desencadeia uma resposta de estresse agudo (CREEL, 2001; SAPOLSKY, 1992, 2004; SCHOECH; MUMME; MOORE, 1991) nas aves da espécie trinca-ferro que compõem o grupo estudado. A magnitude da resposta foi claramente comprovada na ave T1, e considerando a resposta tardia ao estímulo estressor, como constatado no indivíduo V6 da validação fisiológica, pode-se considerar que também foi identificada essa resposta no indivíduo T4. O tipo da dieta fornecida a este indivíduo pode também ter corroborado para resposta mais tardia na elevação nos metabólitos. Sabe-se que dietas elaboradas com maiores concentrações de fibra podem aumentar o tempo da passagem de alimento pelo intestino e o volume fecal (GOYMANN, 2005; KLASING, 2007).

A elevação hormonal observada em decorrência do evento do torneio pode estar relacionada ao conflito social em que as aves são submetidas, induzindo-as ao estresse, essa alteração hormonal foi evidenciada em outras espécies de aves submetidas ao confronto social, como *Parus major* (CARERE et al., 2003), *Anser anser* e *Anser domesticus* (HIRSCHENHAUSER; KOTRSCHAL; MÖSTL, 2005). O comportamento combativo nos passeriformes é expresso pelo canto, importante para estabelecer e manter as relações sociais entre os machos, incluindo a territorialidade (CATCHPOLE; SLATER, 1995; GIL; GAHR, 2002; LAIOLO et al., 2008; LAIOLO; TELLA, 2005; SLABBEKOORN; SMITH, 2002). Na gaiola o canto também é manifestado quando dois indivíduos são colocados próximos um do outro (MARQUES; RUIZ-MIRANDA, 2009), sendo os eventos de torneio ambientes propícios ao estímulo de tais comportamentos.

Presume-se que o deslocamento do criador até o local do torneio não está relacionado ao aumento de MGC, pois as aves são transportadas individualmente, as gaiolas cobertas com capa de tecido para diminuição do estímulo visual e a temperatura interna do veículo controlada. A elevação das concentrações hormonais no dia prévio ao torneio pode ser justificada pela preparação da ave para o dia do evento, com a mudança da gaiola, e pela apresentação da fêmea com maior frequência ao macho competidor. O estímulo estressor social também pode ser avaliado pelo aumento da secreção de glicocorticoides (GC) (COCKREM, 2007).

Avaliando a concentração de MGC do grupo controle nota-se que não há variação entre os dias das coletas, indicando que de fato os torneios têm influência marcante na produção de MGC. Exceto em uma das aves que apresentou diferença no dia 1, suspeita-se que este aumento seja advindo de alguma imprevisibilidade pontual não significativa. Comparando a dosagem hormonal em valores absolutos (ng/g) com o grupo torneio observa-se proximidade do valor entre as médias do grupo controle. Suspeitava-se que a concentração da média hormonal poderia ser maior no grupo controle do que o grupo torneio, pela baixa resposta a corticosterona das aves participantes de torneio, visto que em média as aves deste estudo participam de dois a três eventos por mês, durante pelo menos 5 meses ao ano, entre seis a dez anos. Sabe-se que a exposição crônica a eventos estressantes diminui as respostas a corticosterona ao estresse agudos em experimento já realizado com passeriforme (*Sturnus vulgaris*) em cativeiro (RICH; ROMERO, 2005), fato esse não evidenciado nestas aves.

Dallman e Bhatnagar (2011) e Sapolsky, Romero e Munck (2000) afirmam que a resposta ao estresse agudo garante a sobrevivência do indivíduo a curto prazo. No cérebro com a secreção de adrenalina e cortisol em resposta a um evento agudamente ameaçador, promove e melhora a memória, de forma que o indivíduo se afaste de situações de risco no futuro, no entanto, quando o estresse se repete por várias semanas, alguns neurônios atrofiam e a memória é prejudicada (MCEWEN, 2005; ROOZENDAAL, 2000). No sistema imunológico, o estresse agudo promove o aumento das células de defesa e movimentação para lugares do organismo onde são necessárias (DHABHAR; MCEWEN, 1999). Esta resposta é considerada adaptativa por alguns autores, porque o

deslocamento de energia e recursos dos processos fisiológicos podem ser reduzidos brevemente sem danos (CREEL, 2001; SAPOLSKY, 1992), evitando assim os efeitos deletérios de níveis cronicamente altos de glicocorticoides (WINGFIELD; O'REILLY; ASTHEIMER, 1995). Porém outros autores defendem que quando essas respostas agudas são super utilizadas ocorre sobrecarga alostática (MCEWEN, 2005), com potencial em alterar as respostas fisiológicas e/ou comportamentais cruciais para aliviar e amenizar o agente estressor, podendo levar o indivíduo a condições patológicas (MCEWEN, 2005; ROMERO; WINGFIELD, 1999). O aumento considerável da corticosterona devido ao estresse agudo é também correlacionado negativamente com a condição corporal dos indivíduos (KITAYSKY et al., 1999; KITAYSKY; WINGFIELD; PIATT, 1999; MOORE et al., 2000; SMITH; WINGFIELD; VEIT, 1994; WINGFIELD; VLECK; MOORE, 1992).. Acredita-se que quando os níveis basais de corticosterona estão elevados, o uso do músculo como substrato para a mobilização de energia é reduzido em respostas adrenocorticais agudas (HOLBERTON; PARRISH; WINGFIELD, 1996). Da mesma forma, uma resposta adrenocortical aguda, reduzida durante a estação reprodutiva, minimiza os efeitos comportamentais da corticosterona elevada (por exemplo, redirecionando o comportamento para longe da reprodução), especialmente em espécies que têm tempo limitado para se reproduzir (WINGFIELD; O'REILLY; ASTHEIMER, 1995). Como os torneios são realizados durante a época reprodutiva, a entrada no estado de emergência nesta época do ano pode ter consequência prejudicial para a reprodução (WINGFIELD; O'REILLY; ASTHEIMER, 1995).

Destaca-se que as aves do grupo torneio são consideradas de alta performance pelos criadores, desta forma sugere-se que sejam desenvolvidos estudos para compreender qual real custo de vida, em valores fisiológicos são necessários como padrão imunológico (GLASER; KIECOLT-GLASER, 2005), massa e temperatura comportamental (CARERE et al., 2001), variáveis comportamentais (MCEWEN; HAROLD, 2004), dentre outros parâmetros (DEHNHARD et al., 2003; GROOTHUIS; VON ENGELHARDT, 2005; RETTENBACHER et al., 2004), em aves de diferentes níveis de performance de competição para o enfrentamento das situações impostas durante os torneios de fibra.

Na análise comportamental dos indivíduos do grupo torneio foi evidenciado o aumento da frequência das categorias “vigilância” e “exploração”, e a tendência de maior frequência no “deslocamento” quando comparamos as mesmas categorias comportamentais no ambiente criação. Associa-se o repertório observado mais os comportamentos de colocar o bico entre os fios da gaiola e bicar fruta, presentes apenas no ambiente do torneio, com demonstração de territorialidade durante as disputas de canto entre os competidores. Diferentes estratégias podem estar associadas a esse repertório podendo ser observadas hierarquias de dominância e territorialidade (HUNTINGFORD; TURNER, 1987; YAMAMOTO; VOLPATO, 2011), que por consequência exigem diminuição de descanso e aumento da atividade e de vigilância (RANSOM, 1981; SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000). Esse resultado era esperado pelo fato de que a presença do oponente tem uma importante influência para apresentação do comportamento agonístico em passeriformes (VERBEEK; BOON; DRENT, 1996).

Suspeitava-se que haveria diferença significativa entre as categorias comportamentais dos indivíduos do grupo torneio e do grupo controle, no ambiente de criação, pelo fato das aves do grupo controle serem mantidas em uma única sala, com outros indivíduos da mesma espécie e sexo, sem contato visual, porém com contato auditivo. Levando em consideração que a espécie trinca-ferro possui comportamento territorialista (SICK, 1997), sendo o canto utilizado pelos passeriformes para estabelecer relações sociais e de territorialidade (CATCHPOLE; SLATER, 1995; GIL; GAHR, 2002; LAIOLO et al., 2008; LAIOLO; TELLA, 2005; SLABBEKOORN; SMITH, 2002), o que elevaria a frequência de algumas categorias comportamentais, fato esse não observado neste estudo.

A correlação entre os resultados comportamentais e das concentrações de MGC durante o torneio não foi significativa neste estudo. Para elucidar o impacto dos torneios na qualidade de vida dos competidores, estudos devem ser destinados para análise comportamental individual com maior frequência de coleta de dados, levando em conta as diferenças de estratégias na vida dos animais com o ambiente. Segundo Carere et al. (2003) e Réale et al. (2007), o temperamento parece afetar essas estratégias do indivíduo interagir com seu meio, alguns fenótipos de temperamento poderão ser favorecidos ou

desfavorecidos pela seleção, dependendo das condições impostas a ele (RÉALE et al., 2007). Há evidências da resposta adrenocortical a estímulos de conflito social em pássaros canoros (CARERE et al., 2003; HIRSCHENHAUSER; KOTRSCHAL; MÖSTL, 2005), diferindo em tipos de temperamento (COCKREM, 2007), por exemplo aves categorizadas como proativas tendem a responder ao estresse com baixa produção de glicocorticoides, enquanto aves com temperamento reativas produzem altas taxas hormonais (GROOTHUIS; CARERE, 2005).

O aumento nas concentrações de GC circulantes pode estar associado também a interações entre animais dominantes e subordinados (CREEL, 2001; VAARST; ALRØE, 2012; VERBEEK; BOON; DRENT, 1996; YOUNG; HALLFORD, 2013). A alteração hormonal depende de diversos fatores, desde a espécie, ao contexto social, a quantidade de recurso disponível, a área de vida, se grupo está inserido no meio *in situ* ou *ex situ* e a época do ano (CREEL, 2001; VERBEEK; BOON; DRENT, 1996). Cabe observar que diferentemente de aves de vida livre, que podem evitar embates com indivíduos dominantes, afastando-se do meio comum para encerrar a disputa, caso o apaziguamento comportamental não funcionar (BROWN, 1978; WINGFIELD; HEGNER; LEWIS, 1991), as aves em cativeiro e principalmente aquelas submetidas a rodas de torneio, não possuem essa opção de escolha.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou ser possível monitorar a resposta ao estresse em machos da espécie trinca-ferro (*Saltator similis*) pelo método não invasivo, dosando metabólitos de glicocorticoides. Verificou o efeito do torneio nos competidores, com o aumento dos MGC e com o aumento da frequência do comportamento de territorialidade, evidenciando que os torneios desencadeiam uma resposta de estresse agudo, o que não necessariamente reflete um quadro patológico, posto que não houve diferenças significativas nesse aspecto entre as médias gerais do grupo torneio versus grupo controle, tampouco alterações comportamentais que apontassem nessa direção. Porém considerar a variação em valores médios do grupo sem a correlação desses resultados, como indicadores de bem-estar nas rodas de torneio não foram suficientes.

Notou-se que as aves do grupo torneio apresentam diferenças endócrinas individuais relacionadas com a produção basal de hormônios adrenocorticais, com diferentes respostas a estímulos ambientais e sociais, desta forma sugere-se que a avaliação entre traços de temperamentos seja considerada em estudos futuros.

Esses dados podem ser utilizados para nortear e embasar pesquisas sobre a avaliação do custo de vida (valores fisiológicos), do impacto na reprodução, correlacionando a dosagem da corticosterona com outros hormônios como prolactina, em aves competidoras durante os torneios de fibra. Sugerimos por fim que as análises sejam realizadas em períodos de longos prazo, em diferentes épocas do ano, para conclusões mais contundentes sobre a qualidade de vida das aves submetidas a torneios de fibra.

REFERÊNCIAS

- ALCOCK, J. **Animal behavior: an evolutionary approach**. 3a ed. ed. Sunderland, Inglaterra: [s.n.].
- ALMEIDA, S. O. **desafio das novas cores: Atualidades ornitológicas**. São Paulo: [s.n.].
- ALRØE, H. F.; VAARST, M.; KRISTENSEN, E. S. DOES ORGANIC FARMING FACE DISTINCTIVE LIVESTOCK WELFARE ISSUES? – A CONCEPTUAL ANALYSIS. **Agriculture**, v. 299, n. March, p. 275–299, 2001.
- ALTMANN, J. Observational Study of Behavior: Sampling Methods. **Behaviour**, v. 49, n. 3, p. 227–267, 1974.
- ANGELIER, F. et al. Age-specific reproductive success in a long-lived bird: Do older parents resist stress better? **Journal of Animal Ecology**, v. 76, n. 6, p. 1181–1191, 2007.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205–235, 1973.
- ARCHER, J. Animals Under Stress. In: ARNOLD, E. (Ed.). **Studies in Biology** 108. London, UK: [s.n.].
- ASCHOFF, J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 25, p. 11–28, 1960.
- ASSENMACHER, I.; BOISSIN, J. Circadian Endocrine and Related Rhythms in Birds. **GENERAL AND COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY SUPPLEMENT**, p. 489–498, 1972.
- ASTHEIMER, L. B. .; BUTTEMER, W. A. .; WINGFIELD, J. C. **Gender and seasonal differences in the adrenocortical response to ACTH challenge in an arctic passerine challenge in an arctic passerine Zonotrichia leucophrys gambelii**. *General and Comparative Endocrinology*, , 1994.
- AXELROD, J.; REISINE, T. D. Stress hormones: Their interaction and regulation. **Science**, v. 224, n. 4648, p. 452–459, 1984.
- BARBOSA, H. M. et al. Non-invasive stress monitoring and temperament of chestnut-bellied seed-finch (Passeriformes, Thraupidae). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 220, n. August, p. 104859, 2019.
- BAYVEL, A. C. D.; DIESCH, T. J.; CROSS, N. Animal welfare: A complex international public policy issue: Economic, policy, societal, cultural and other drivers and constraints. A 20-year international perspective. **Animal Welfare**, v. 21, n. SUPPL. 1, p. 11–18, 2012.
- BEERDA, B. et al. The Use of Saliva Cortisol, Urinary Cortisol, and Catecholamine Measurements for a Noninvasive Assessment of Stress Responses in Dogs. **Hormones and Behavior**, v. 279, n. 0033, p. 1–8, 1996.
- BERCOVITZ, A. B. et al. Noninvasive assessment of seasonal hormone profile in captive bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*). **Zoo Biology**, v. 1, n. 2, p. 111–117, 1982.

BirdLife International. *Saltator similis*. Disponível em:
<<https://www.iucnredlist.org/species/22723882/132169900>>. Acesso em: 6 dez. 2020.

BREUNER, C. W.; WINGFIELD, J. C. Rapid behavioral response to corticosterone varies with photoperiod and dose. **Hormones and Behavior**, v. 37, n. 1, p. 23–30, 2000.

BROOM, D. M. The scientific assessment of animal welfare. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 20, n. 1–2, p. 5–19, 1988.

BROOM, D. M. Animal welfare : concepts and measurement. **Journal of Animal Science**, p. 4167–4175, 1991.

BROWN, J. L. AVIAN COMMUNAL BREEDING SYSTEMS. **Ecology**, v. 9, p. 123–155, 1978.

BROWN, J. L. et al. Evaluation of the pituitary-gonadal response to GnRH, and adrenal status, in the leopard (*Panthera pardus japonensis*) and tiger (*Panthera tigris*). **Journals of Reproduction & Fertility Ltd**, v. 82, p. 2267–236, 1988.

BROWN, J.; WALKER, S.; STEINMAN, K. **ENDOCRINE MANUAL FOR REPRODUCTIVE ASSESSMENT OF DOMESTIC AND NON-DOMESTIC SPECIES** Conservation & Research Center Smithsonian's National Zoological Park 1500 Remount Road Front Royal, Virginia, 22630. [s.l.: s.n.]. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/profile/Danielle_Dillon3/post/Should_I_use_values_near_the_largest_standard_value_of_the_curve_in_ELISA/attachment/59d656a679197b80779ad55f/AS%3A530971804041216%401503604951308/download/endo_manual_smithsonian_NZP.pdf>.

BRUMM, H.; NAGUIB, M. **Chapter 1 Environmental Acoustics and the Evolution of Bird Song**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. v. 40

BUDAEV, S. V. "Personality" in the Guppy (*Poecilia reticulata*): A Correlational Study of Exploratory Behavior and Social Tendency. **Journal of Comparative Psychology**, v. 111, n. 4, p. 399–411, 1997.

BUSCH, D. S.; HAYWARD, L. S. Stress in a conservation context: A discussion of glucocorticoid actions and how levels change with conservation-relevant variables. **Biological Conservation**, v. 142, n. 12, p. 2844–2853, 2009.

C. J. MIGEON et al. Plasma 17-Hydroxycorticosteroid Levels and Leucocyte Values in the Rhesus Monkey, Including Normal Variation and the Effect of ACTH. **Bull Med Ethics**, v. No. 90, n. v, p. 3–4, 1995.

CARERE, C. et al. Effect of social defeat in a territorial bird (*Parus major*) selected for different coping styles. **Physiology and Behavior**, v. 73, n. 3, p. 427–433, 2001.

CARERE, C. et al. Fecal corticosteroids in a territorial bird selected for different personalities: Daily rhythm and the response to social stress. **Hormones and Behavior**, v. 43, n. 5, p. 540–548, 2003.

CARSIA, R. V.; HARVEY, S. Adrenals. In: Whittow GC. In: **Sturkie's avian physiology**. 5th edn. A ed. San Diego, CA: [s.n.]. p. 489– 537.

CATCHPOLE, C. K.; SLATER, P. J. B. **Bird Song** Cambridge University

Press, 1995. Disponível em:

<https://assets.cambridge.org/97805218/72423/frontmatter/9780521872423_frontmatter.pdf>

CHRISTOPHER HEFFNER. **Research methods for education, psychology and the social sciences**. Disponível em: <<http://allpsych.com/research-methods/singlesubjectdesign/ababdesign/>>. Acesso em: 8 mar. 2020.

CLAPP, J. B. **Avian urate spheres: A non-invasive method to biomonitor environmental pollution and stress in birds**. [s.l.] Newcastle University, 2010.

COCKREM, J. F. Conservation and behavioral neuroendocrinology. **Hormones and Behavior**, v. 48, n. 4, p. 492–501, 2005.

COCKREM, J. F. Stress, corticosterone responses and avian personalities. **Journal of Ornithology**, v. 148, n. SUPPL. 2, p. 169–178, 2007.

COCKREM, J. F.; SILVERIN, B. Sight of a predator can stimulate a corticosterone response in the great tit (*Parus major*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 125, n. 2, p. 248–255, 2002.

COOK, C. J. Rapid noninvasive measurement of hormones in transdermal exudate and saliva. **Physiology and Behavior**, v. 75, n. 1–2, p. 169–181, 2002.

CREEL, S. Social dominance and stress hormones. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 16, n. 9, p. 491–497, 2001.

CRONIN, G. M. The development and significance of abnormal stereotyped behaviours in tethered sows. p. 146, 1985.

CZYCHOLL, I. et al. Review of the assessment of animal welfare with special emphasis on the “Welfare Quality® animal welfare assessment protocol for growing pigs”. **Archiv Tierzucht**, v. 58, n. 2, p. 237–249, 2015.

DALLMAN, M. F.; BHATNAGAR, S. Chronic Stress and Energy Balance: Role of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. **Comprehensive Physiology**, n. 245, 2011.

DAWKINS, M. Animal suffering: The science of animal welfare. **London: Chapman & Hall.**, 1980.

DAWKINS, M. S. Behaviour as a tool in the assessment of animal welfare. **Zoology**, v. 106, n. 4, p. 383–387, 2003.

DAWKINS, M. S. Animal welfare with and without consciousness. **Journal of Zoology**, v. 301, n. 1, p. 1–10, 2017a.

DAWKINS, M. S. **Stocking density: Can we judge how much space poultry need?** [s.l.] Elsevier Ltd, 2017b.

DE ALMEIDA, A. C.; PALME, R.; MOREIRA, N. How environmental enrichment affects behavioral and glucocorticoid responses in captive blue-and-yellow macaws (*Ara ararauna*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 201, n. December 2017, p. 125–135, 2018.

DEHNHARD, M. et al. Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great

cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 131, n. 3, p. 345–352, 2003.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Temperature effects, friedman-hawkins' order-measure, and wehr entropy. **Entropy**, v. 96, p. 1059–1064, 1999.

DREES, L. R.; MANU, A. Bird urate contamination of atmospheric dust traps. **Catena**, v. 27, n. 3–4, p. 287–294, 1996.

DUCKWORTH, B. M.; JAWOR, J. M. Corticosterone profiles in northern cardinals (*Cardinalis cardinalis*): Do levels vary through life history stages? **General and Comparative Endocrinology**, v. 263, p. 1–6, 2018.

DUNCAN, I. J.; PETHERICK, J. C. The implications of cognitive processes for animal welfare. **Journal of animal science**, v. 69, n. 12, p. 5017–5022, 1991.

DUSSEAU, J. W.; MEIER, A. H. Diurnal and seasonal variations of plasma adrenal steroid hormone in the white-throated sparrow, *Zonotrichia albicollis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 16, n. 3, p. 399–408, 1971.

ELLIS, B. J.; JACKSON, J. J.; BOYCE, W. T. The stress response systems: Universality and adaptive individual differences. **Developmental Review**, v. 26, n. 2, p. 175–212, 2006.

FEAVER, J.; MENDEL, M.; BATESON, P. A method for rating the individual distinctiveness of domestic cats. **Animal Behaviour**, v. 34, n. 4, p. 1016–1025, 1986.

FERREIRA, J. C. P. et al. Non-invasive measurement of adrenocortical activity in Blue-fronted parrots (*Amazona aestiva*, Linnaeus, 1758). **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–14, 2015.

FINSTERWALD, C. et al. From memory impairment to posttraumatic stress disorder-like phenotypes: The critical role of an unpredictable second traumatic experience. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 48, p. 15903–15915, 2015.

FISHER, M. W. Defining animal welfare — does consistency matter? **New Zealand Veterinary Journal**, v. 57, n. 2, p. 71–73, 2009.

FRASER, A. F.; BROOM, D. M. **Farm animal behaviour and welfare**. Baillière Tindall, London: [s.n.].

FREITAS, E. G. DE; NISHIDA, S. M. MÉTODOS DE ESTUDO DO COMPORTAMENTO ANIMAL. In: **Comportamento Animal**. 2a. Edição ed. São Paulo: [s.n.]. p. 48–85.

FRUHVALD, E.; FERREIRA, J. C. P. **Variação diária da excreção urofecal de metabólitos de glicocorticoides em papagaio verdadeiro (Amazona aestiva)**. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, 2012.

FUJIHARA, C. J.; FERREIRA, J. C. P. **VALIDAÇÃO DE MÉTODO NÃO-INVASIVO PARA ANÁLISE DE HORMÔNIOS LIGADOS AO ESTRESSE EM PAPAGAIO VERDADEIRO (AMAZONA AESTIVA) CAROLINE**. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA VALIDAÇÃO, 2008.

FURTADO, P. V.; CLÁUDIO ALVARENGA DE OLIVEIRA. **PERFIL ANALÍTICO DE ESTRÓGENOS E PROGESTINAS EM DIFERENTES MATRIZES**

BIOLÓGICAS NA ESPÉCIE Perfil analítico de estrógenos e progestinas em diferentes matrizes biológicas na espécie ovina (Ovis aires). [s.l.]

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2007.

FUTUYMA, D. J. *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates: Sunderland, USA. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 1, n. 1, p. 86–88, 1988.

GIL, D.; GAHR, M. The honesty of bird song: Multiple constraints for multiple traits. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 17, n. 3, p. 133–141, 2002.

GLASER, R.; KIECOLT-GLASER, J. K. Stress-induced immune dysfunction: Implications for health. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 3, p. 243–251, 2005.

GOKULA, V. An ethogram of Spot-billed Pelican (*Pelecanus philippensis*). **Chinese Birds**, v. 2, n. 4, p. 183–192, 2012.

GOSLING, S. D. From mice to men: What can we learn about personality from animal research? **Psychological Bulletin**, v. 127, n. 1, p. 45–86, 2001.

GOSSELIN, R. D. Guidelines on statistics for researchers using laboratory animals: the essentials. **Laboratory Animals**, v. 53, n. 1, p. 28–42, 2019.

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 the New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 35–53, 2005.

GOYMANN, W.; JENNI-EIERMANN, S. Introduction to the European Science Foundation technical meeting: Analysis of hormones in droppings and egg yolk of birds. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 1–4, 2005.

GOYMANN, W.; MÖSTL, E.; GWINNER, E. Corticosterone Metabolites Can be Measured Noninvasively in Excreta of European Stonechats (*Saxicola torquata rubicola*). **The Auk**, v. 119, n. 4, p. 1167–1173, 2002.

GRAHAM, L. et al. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. **Zoo Biology**, v. 20, n. 3, p. 227–236, 2001.

GRAHAM, L. H.; BROWN, J. L. Cortisol metabolism in the domestic cat and implications for non-invasive monitoring of adrenocortical function in endangered felids. **Zoo Biology**, v. 15, n. 1, p. 71–82, 1996.

GREENBERG, R.; METTKE-HOFMANN, C. Ecological Aspects of Neophobia and neophilia in birds. **Current Ornithology, Volume 16**, v. 16, p. 119–178, 2001.

GROOTHUIS, T. G. G.; CARERE, C. Avian personalities: Characterization and epigenesis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 1 SPEC. ISS., p. 137–150, 2005.

GROOTHUIS, T. G. G.; VON ENGELHARDT, N. Investigating maternal hormones in avian eggs: Measurement, manipulation, and interpretation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 168–180, 2005.

HALLE, B. O. **Bird's-eye view: Lessons from 50 years of bird trade regulation & conservation in Amazon countries**. [s.l: s.n.].

- HANLON, R. T.; SMALE, M. J.; SAUER, W. H. H. An Ethogram of Body Patterning Behavior in the Squid *Loligo vulgaris reynaudii* on Spawning Grounds in South Africa. **Biological Discovery in Woods Hole**, v. 187, n. 3, p. 363–372, 1994.
- HIRSCHENHAUSER, K.; KOTRSCHAL, K.; MÖSTL, E. Synthesis of measuring steroid metabolites in goose feces. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 138–153, 2005.
- HODGES, J. K.; BROWN, J. L.; HEISTERMANN, M. Assessing Physiological Status. In: THOMPSON, K.V., KIRK BAER, C. (EDS). (Ed.). . **Wild Mammals in Captivity**. Chicago: The University of Chicago. All rights reserved, 2010. p. 447–467.
- HOLBERTON, R. L.; PARRISH, J. D.; WINGFIELD, J. C. Modulation of the adrenocortical stress response in neotropical migrants during autumn migration. **Auk**, v. 113, n. 3, p. 558–564, 1996.
- HUMAYUN, K. A. K. M.; AOYAMA, M.; SUGITA, S. Morphological and histological studies on the adrenal gland of the chicken (*Gallus domesticus*). **Journal of Poultry Science**, v. 49, n. 1, p. 39–45, 2012.
- HUNTINGFORD, F. A.; TURNER, A. K. **Animal Conflict**. London: Chapman and Hall., 1987.
- KITAYSKY, A. S. et al. The adrenocortical stress-response of Black-legged Kittiwake chicks in relation to dietary restrictions. **J Comp Physiol**, n. 169, p. 303–310, 1999.
- KITAYSKY, A. S.; WINGFIELD, J. C.; PIATT, J. F. Dynamics of food availability, body condition and physiological stress response in breeding Black-legged Kittiwakes. **Functional Ecology**, v. 13, n. 5, p. 577–584, 1999.
- KLASING, K. C. Nutrition and the immune system. **British Poultry Science**, n. July 2013, p. 37–41, 2007.
- KOOLHAAS, J. M. et al. Coping styles in animals: Current status in behavior and stress- physiology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 7, p. 925–935, 1999.
- KOTRSCHAL, K. et al. Effects of physiological and social challenges in different seasons on fecal testosterone and corticosterone in male domestic geese (*Anser domesticus*). **Acta Ethologica**, v. 2, n. 2, p. 115–122, 2000.
- KREBS, J.; ASHCROFT, R.; WEBBER, M. Song repertoires and territory defence in the great tit. **Nature**, v. 271, n. 5645, p. 539–542, 1978.
- KURSTAK, E. Progress in enzyme immunoassays: production of reagents, experimental design, and interpretation. **World Health Organization**, v. 63, n. 4, p. 793–811, 1985.
- LABAR, K. S.; LEDOUX, J. E. Coping with danger: the neural basis of defensive behavior and fearful feelings. In: **Handbook of physiology**. McEwen BS ed. [s.l.] Oxford University Press, Oxford, Sect 7, 2001. p. 139–154.
- LAIOLO, P. et al. Song Diversity Predicts the Viability of Fragmented Bird Populations. **PloS one**, v. 3, n. 3, p. 1–10, 2008.
- LAIOLO, P.; TELLA, J. L. Habitat fragmentation affects culture transmission:

Patterns of song matching in Dupont's lark. **Journal of Applied Ecology**, v. 42, n. 6, p. 1183–1193, 2005.

LÈCHE, A. et al. Physiological stress in captive Greater rheas (*Rhea americana*): Highly sensitive plasma corticosterone response to an ACTH challenge. **General and Comparative Endocrinology**, v. 162, n. 2, p. 188–191, 2009.

LEDOUX, J. Rethinking the Emotional Brain. **Neuron**, v. 73, n. 4, p. 653–676, 2012.

LOWE, S. E.; BRADSHAW, J. W. S. Ontogeny of individuality in the domestic cat in the home environment. **Animal Behaviour**, v. 61, n. 1, p. 231–237, 2001.

MACNULTY, D. R.; MECH, L. D.; SMITH, D. W. A Proposed Ethogram of Large-Carnivore Predatory Behavior, Exemplified by the Wolf. **Journal of Mammalogy**, v. 88, n. 3, p. 595–605, 2007.

MACWHIRTER, P. Anatomia, fisiologia e nutrição básicas. In: TULLY, T.; DORRESTEIN, G. M.; JONES, A. (Eds.). **Clínica de Aves**. 2ª Edição ed. [s.l.] Elsevier Health Sciences Brazil, 2010.

MARQUES, A. B.; RUIZ-MIRANDA, C. R. **AVALIAÇÃO DO CANTO DO TRINCA-FERRO (*Saltator similis* LAFRESNAYE E D'ORBIGNY 1837) EM RELAÇÃO AO PROCESSO DE DOMESTICAÇÃO E SUAS IMPLICAÇÕES NA CONSERVAÇÃO DAS AVES CANORAS**. [s.l.] Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, 2009.

MARQUES, A. B.; Z-MIRANDA, C. R. R. **AVALIAÇÃO DO CANTO DO TRINCA-FERRO (*Saltator similis* LAFRESNAYE E D'ORBIGNY 1837) EM RELAÇÃO AO PROCESSO DE DOMESTICAÇÃO E SUAS IMPLICAÇÕES NA CONSERVAÇÃO DAS AVES CANORAS**. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF CAMPOS, 2009.

MASON, G.; MENDEL, M. Why is there no simple way of Measuring Animal Welfare? **Animal Welfare**, v. 2, n. 4, p. 301–319, 1993.

MCEWEN, B. S. Stressed or stressed out: What is the difference? **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 30, n. 5, p. 315–318, 2005.

MCEWEN, B. S.; HAROLD. Protection and damage from acute and chronic stress: Allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1032, p. 1–7, 2004.

MCEWEN, B. S.; WINGFIELD, J. C. The concept of allostasis in biology and biomedicine. **Hormones and Behavior**, v. 43, n. 1, p. 2–15, 2003.

MILLSPAUGH, J. J.; WASHBURN, B. E. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: Considerations for application and interpretation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 189–199, 2004.

MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. **The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare**. Wallingford, New York: [s.n.].

MONFORT, S. L. Non-invasive endocrine measures of reproduction and stress in wild populations. In: HOLT, W. V.; PICKARD, A. R.; RODGER, J. C.; WILDT, D. E. (Ed.). **Reproductive science and integrated conservation**. University ed. Cambridge: [s.n.].

MOORE, F. L.; MILLER, L. J. Stress-induced inhibition of sexual behavior: Corticosterone inhibits courtship behaviors of a male amphibian (*Taricha granulosa*). **Hormones and Behavior**, v. 18, n. 4, p. 400–410, 1984.

MOORE, F. L.; ZOELLER, R. T. Stress-induced inhibition of reproduction: Evidence of suppressed secretion of LH-RH in an amphibian. **General and Comparative Endocrinology**, v. 60, n. 2, p. 252–258, 1985.

MOORE, I. T. et al. Relationships between annual cycles of testosterone, corticosterone, and body condition in male red-spotted garter snakes, *Thamnophis sirtalis concinnus*. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 73, n. 3, p. 307–312, 2000.

MORGAN WILSON, C.; HOLBERTON, R. L. An alternative method for delivering adrenocorticotropin hormone in birds. **General and Comparative Endocrinology**, v. 122, n. 3, p. 349–353, 2001.

MORMÈDE, P. et al. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Physiology and Behavior**, v. 92, n. 3, p. 317–339, 2007.

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

MOSTL, E. et al. Measurement of Glucocorticoid Metabolite Concentrations in. **J. Vet. Med.**, v. 631, n. 0931–184X, p. 621–631, 1999.

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

MUNRO, C.; STABENFELDT, G. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. **Journal of Endocrinology**, v. 101, n. 1, p. 41–49, 1984.

NAKAGAWA, S.; MÖSTL, E.; WAAS, J. R. Validation of an enzyme immunoassay to measure faecal glucocorticoid metabolites from Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*): A non-invasive tool for estimating stress? **Polar Biology**, v. 26, n. 7, p. 491–493, 2003.

NELSON, D. A.; KROODSMA, D. E.; MILLER, E. H. Ecology and Evolution of Acoustic Communication in Birds. **Ecology**, v. 78, n. 5, p. 1611, 1997.

OHL, F.; VAN DER STAAY, F. J. Animal welfare: At the interface between science and society. **Veterinary Journal**, v. 192, n. 1, p. 13–19, 2012.

PALME, R. et al. Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. **Animal Reproduction Science**, v. 43, p. 43–63, 1996.

PALME, R. et al. Stress hormones in mammals and birds: Comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1040, p. 162–

171, 2005.

PALME, R. et al. Steroid extraction: Get the best out of faecal samples R. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift – Veterinary Medicine Austria**, v. 100, 2013.

PALME, R. Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. **Physiology and Behavior**, v. 199, n. July 2018, p. 229–243, 2019.

PASTELL, M. CowLog – Cross-Platform Application for Coding Behaviours from Video. **Journal of Open Research Software**, v. 4, p. 4–7, 2016.

PITTENDRIGH, C. S. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 25, p. 159–184, 1960.

POPP, L. G. et al. Annual pattern of fecal corticoid excretion in captive Red-tailed parrots (*Amazona brasiliensis*). **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 178, n. 4, p. 487–493, 2008.

QUEIROZ, C. M. et al. Endocrine response to physical restraint and isolation in blue-fronted parrots. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 36, p. 41–45, 2016.

RANSOM, T. **Teach Troop of the Gombe**. Lewisburg, PA: Bucknell Press, 1981.

RÉALE, D. et al. Integrating animal temperament within ecology and evolution. **Biological Reviews**, v. 82, n. 2, p. 291–318, 2007.

RETTENBACHER, S. et al. Measurement of corticosterone metabolites in chicken droppings. **British Poultry Science**, v. 45, n. 5, p. 704–711, 2004.

RETTENBACHER, S. et al. Corticosterone in chicken eggs. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 193–203, 2005.

RICH, E. L.; ROMERO, L. M. Exposure to chronic stress downregulates corticosterone responses to acute stressors. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 6 57-6, p. 1628–1636, 2005.

RODRIGUES, B. D. C.; DE ALMEIDA, D. M.; DA SILVA, L. C. S. Avaliação corpórea, caracterização biométrica externa e do sistema digestório de trincas-ferros (*Saltator similis*, d'Orbigny & Lafresnaye, 1837) provenientes do tráfico animal. **Biotemas**, v. 32, n. 1, p. 77–84, 2019.

ROMERO, L. M.; DICKENS, M. J.; CYR, N. E. The reactive scope model - A new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. **Hormones and Behavior**, v. 55, n. 3, p. 375–389, 2009.

ROMERO, L. M.; REED, J. M. Collecting baseline corticosterone samples in the field: Is under 3 min good enough? **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 140, n. 1, p. 73–79, 2005.

ROMERO, L. M.; REMAGE-HEALEY, L. Daily and seasonal variation in response to stress in captive starlings (*Sturnus vulgaris*): Corticosterone. **General and Comparative Endocrinology**, v. 119, n. 1, p. 52–59, 2000.

- ROMERO, L. M.; WINGFIELD, J. C. Alterations in hypothalamic-pituitary-adrenal function associated with captivity in Gambel's white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 122, n. 1, p. 13–20, 1999.
- ROOZENDAAL, B. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 25, n. 3, p. 213–238, 2000.
- ROSSI DARE, L. et al. Physical and cognitive training are able to prevent recognition memory deficits related to amyloid beta neurotoxicity. **Behavioural Brain Research**, v. 365, n. November 2018, p. 190–197, 2019.
- RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. The Principles of Humane Experimental Technique Special. **Universities Federation for Animal Welfare**, 1992.
- S. HARVEY, B. J. M. A. J. G. P. INFLUENCE OF STRESS ON THE SECRETION OF CORTICOSTERONE IN THE DUCK (ANAS PLATYRHYNCHOS). **JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY LTD**, v. 87, p. 161–171, 1980.
- SADOO, P.; SIMONSEN, H. P. Assessing animal welfare: where does science end and philosophy begin? **Animal Welfare**, v. 1, p. 257–267, 1992.
- SAPOLSKY, R. M. Neuroendocrinology of the stress response. **Behavioral Endocrinology (Becker, J.B. et al., eds)**, p. 287–324, 1992.
- SAPOLSKY, R. M. Social status and health in humans and other animals. **Annual Review of Anthropology**, v. 33, p. 393–418, 2004.
- SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55–89, 2000.
- SCHOECH, S. J.; MUMME, R. L.; MOORE, M. C. Reproductive Endocrinology and Mechanisms of Breeding Inhibition in Cooperatively Breeding Florida Scrub Jays (*Aphelocoma c. coerulescens*). **The Condor**, v. 93, n. 2, p. 354–364, 1991.
- SCHWABL, H. Yolk is a source of maternal testosterone for developing birds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 24, p. 11446–11450, 1993.
- SCHWARZENBERGER, F., FRANCKE, R., GOELTENBOTH, R., KLOS, H. G. Diagnosis of reproductive cycle and pregnancy by progesterone detecting in the feces of black rhinoceroses *Diceros bicornis* at the Zoological Garden of Berlin. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 26, p. 190–191, 1991.
- SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Nova Front ed. São Paulo – Rio de Janeiro: [s.n.].
- SINHORINI, J. A.; PIZZUTTO, C. S.; PALME, R. ACTH stimulation induced self-mutilation behavior in the golden conure (*Guaruba guarouba*). **Animals**, v. 10, n. 3, p. 1–7, 2020.
- SLABBEKOORN, H.; SMITH, T. B. Bird song, ecology and speciation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 357, n. 1420, p. 493–503, 2002.

SLOAN WILSON, D. et al. Shyness and boldness in humans and other animals. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 9, n. 11, p. 442–446, 1994.

SMALL, T. W.; SCHOECH, S. J. Sex differences in the long-term repeatability of the acute stress response in long-lived, free-living Florida scrub-jays (*Aphelocoma coerulescens*). **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 185, n. 1, p. 119–133, 2015.

SMITH, G. T.; WINGFIELD, J. C.; VEIT, R. R. Adrenocortical response to stress in the common diving petrel, *Pelecanoides urinatrix*. **Physiological Zoology**, v. 67, n. 2, p. 526–537, 1994.

SOCKMAN, K. W.; SHARP, P. J.; SCHWABL, H. Orchestration of avian reproductive effort: An integration of the ultimate and proximate bases for flexibility in clutch size, incubation behaviour, and yolk androgen deposition. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 81, n. 4, p. 629–666, 2006.

SOUTO, A. **Etologia: princípios e reflexões**. 3a ed. ed. Recife, PE: UFPE.: [s.n.].

STOCKER, M. et al. Loner or socializer? Ravens' adrenocortical response to individual separation depends on social integration. **Hormones and Behavior**, v. 78, p. 194–199, 2016.

STOLBA, A.; WOOD-GUSH, D. G. The identification of behavioural key features and their incorporation into a housing design for pigs. **Annales de Recherches Veterinaires**, v. 15, n. 2, p. 287–299, 1984.

THIEL, D.; JENNI-EIERMANN, S.; PALME, R. Measuring corticosterone metabolites in droppings of capercaillies (*Tetrao urogallus*). **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 96–108, 2005.

THORPE, W. H. The assessment of pain and distress in animals. In: BRAMBELL, F. W. R. (Ed.). **Report of the Technical Committee to Enquire Into the Welfare of Animals Kept Under Intensive Livestock Husbandry Systems**. HMSO ed. London: [s.n.]. p. 71–77.

THORPE, W. H. Discussion to Part II. In: CARTER, T. C. (Ed.). **Environmental Control in Poultry Production**. Edinburgh: [s.n.]. p. 125–134.

TOSTES, A. P. Torneios de fibra e de canto de canário da terra, coleirinha e trinca ferro. **Atualidades ornitológicas**, p. 65:5p, 1995.

TOUMA, C.; PALME, R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: The importance of validation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 0, p. 54–74, 2005.

TRAJANO, M. DE C.; CARNEIRO, L. P. **Diagnóstico da criação comercial de animais silvestres no Brasil**. [s.l.: s.n.].

VAARST, M.; ALRØE, H. F. Concepts of animal health and welfare in organic livestock systems. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, v. 25, n. 3, p. 333–347, 2012.

VANIN, C. L.; NASSARO, M. R. F. **Comentários Sobre a Criação Amadorista De Passeriformes E O Seu Sistema De Controle – Sispass**.

[s.l.] Universidade Paulista - UNIP, 2016.

VEASEY, J. Concepts in the care and welfare of captive elephants.

International Zoo Yearbook, v. 40, n. 1, p. 63–79, 2006.

VEASEY, J. S.; WARAN, N. K.; YOUNG, R. J. On comparing the behaviour of zoo housed animals with wild conspecifics as a welfare indicator, using the giraffe (*Giraffa camelopardalis*) as a model. **Animal Welfare**, v. 5, n. 2, p. 139–153, 1996.

VERBEEK, M. E.; BOON, A.; DRENT, P. J. Exploration, aggressive behaviour and dominance in pair-wise confrontations of juvenile male great tits.

Behaviour, v. 133, n. 11–12, p. 945–963, 1996.

VERBEEK, M. E. M.; DRENT, P. J.; WIEPKEMA, P. R. **Consistent individual differences in early exploratory behaviour of male great tits** **Animal Behaviour**, 1994.

VON ENGELHARDT, N.; GROOTHUIS, T. G. G. Measuring steroid hormones in avian eggs. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 181–192, 2005.

WASHBURN, B. E. et al. Using fecal glucocorticoids for stress assessment in Mourning Doves. **Condor**, v. 105, n. 4, p. 696–706, 2003.

WASSER, S. K. et al. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 120, n. 3, p. 260–275, 2000.

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 the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 2005, p. 109–137, 2005.

WATSON, R. et al. Development of a versatile enzyme immunoassay for non-invasive assessment of glucocorticoid metabolites in a diversity of taxonomic species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 186, p. 16–24, 2013.

WATTERS, J. V. Toward a predictive theory for environmental enrichment. **Zoo Biology**, v. 28, n. 6, p. 609–622, 2009.

WEMELSFELDER, F. et al. Assessing the “whole animal”: A free choice profiling approach. **Animal Behaviour**, v. 62, n. 2, p. 209–220, 2001.

WILLIAMS, G. C. NATURAL SELECTION, THE COSTS OF REPRODUCTION, AND A REFINEMENT OF LACK'S PRINCIPLE. p. 687–690, 1966.

WINDFIELD, J. C. et al. Environmental stress, field endocrinology, and conservation biology. In: CLEMMONS, J. R.; BUCHHOLZ, R. (Eds.). . **Behavioral Approaches to Conservation in the Wild**. Cambridge, UK: [s.n.]. p. 95–131.

WINGFIELD, J. C. Changes in reproductive function of free-living birds in direct response to environmental perturbations. In: STETSON, M. H. (Ed.). .

Processing of environmental information in vertebrates. Springer-Verlag, Berlin: [s.n.]. p. 121–148.

WINGFIELD, J. C.; GOLDSMITH, A. R. Plasma levels of prolactin and gonadal steroids in relation to multiple-brooding and reneating in free-living populations

of the song sparrow, *Melospiza melodia*. **Hormones and Behavior**, v. 24, n. 1, p. 89–103, 1990.

WINGFIELD, J. C.; HEGNER, R. E.; LEWIS, D. M. Circulating levels of luteinizing hormone and steroid hormones in relation to social status in the cooperatively breeding white-browed sparrow weaver, *Plocepasser mahali*. **Journal of Zoology**, v. 225, n. 1, p. 43–58, 1991.

WINGFIELD, J. C.; O'REILLY, K. M.; ASTHEIMER, L. B. Modulation of the adrenocortical responses to acute stress in arctic birds: A possible ecological basis. **Integrative and Comparative Biology**, v. 35, n. 3, p. 285–294, 1995.

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, n. 4, p. 419–428, 1992.

YAMAMOTO, M. E.; VOLPATO, G. L. COMPORTAMENTO ANIMAL. **Comportamento Animal**, p. 520, 2011.

YOUNG, A. M.; HALLFORD, D. M. Validation of a Fecal Glucocorticoid Metabolite Assay to Assess Stress in the Budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). **Zoo Biology**, v. 32, n. 1, p. 112–116, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TESTE ESTATÍSTICO RITMO DIÁRIO

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.46782133	0.11695533	4.53	0.0038
Error	43	1.11030580	0.02582107		
Corrected Total	47	1.57812713			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
hora	4	0.46782133	0.11695533	4.53	0.0038

Duncan's Multiple Range Test for DOSAGENT

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	43
Error Mean Square	0.025821
Harmonic Mean of Cell Sizes	9.332076

**Means with the same letter are
not significantly different.**

Duncan Grouping	Mean	N	hora
A	1.62802	7	24h00
B	1.56555	11	16h00
B	1.46049	10	12h00
B	1.45734	11	20h00
C	1.32197	9	08h00

APÊNDICE B – TESTE ESTATISTICO GRUPO TORNEIO EFEITO DIA
GLM (T1)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	16.25018490	5.41672830	2.95	0.0428
Error	44	80.73491860	1.83488451		
Corrected Total	47	96.98510350			

Duncan's Multiple Range Test for DOSAGEMT

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	44
Error Mean Square	1.834885

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	DIA
A	6.0032	12	evento
B	5.6321	12	posevent
B	4.8886	12	preevent
B	4.5351	12	controle

GLM (T2)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	10.8838114	3.6279371	0.54	0.6562
Error	42	281.1581242	6.6942411		
Corrected Total	45	292.0419357			

Duncan's Multiple Range Test for DOSAGEMT

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	42
Error Mean Square	6.694241
Harmonic Mean of Cell Sizes	11.47826

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	DIA
A	8.155	12	evento
A	7.922	12	preevent

A	7.235	11	controle
A	6.962	11	posevent

GLM (T3)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	14.8956513	4.9652171	0.83	0.4863
Error	43	258.1574824	6.0036624		
Corrected Total	46	273.0531337			

Duncan's Multiple Range Test for DOSAGENT

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	43
Error Mean Square	6.003662
Harmonic Mean of Cell Sizes	11.73333
Means with the same letter are not significantly different.	
Duncan Grouping	Mean N DIA
A	9.007 11 evento
A	
A	8.246 12 preevent
A	
A	7.908 12 controle
A	
A	7.442 12 posevent

GLM (T4)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	39.3965216	13.1321739	5.76	0.0021
Error	43	98.1153139	2.2817515		
Corrected Total	46	137.5118354			

Duncan's Multiple Range Test for DOSAGENT

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	43
Error Mean Square	2.281751
Harmonic Mean of Cell Sizes	11.73333

Means with the same letter are not significantly different.			
Duncan Grouping	Mean	N	DIA
A	8.8510	11	posevent
B	7.0704	12	evento
B	6.7882	12	controle
B	6.4206	12	preevent

GLM (T5)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	39.5488118	13.1829373	1.11	0.3558
Error	38	450.0375926	11.8430945		
Corrected Total	41	489.5864045			

Duncan's Multiple Range Test for DOSAGENT

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	38
Error Mean Square	11.84309
Harmonic Mean of Cell Sizes	10.38008
Means with the same letter are not significantly different.	
Duncan Grouping	Mean N DIA
A	8.128 12 evento
A	7.146 10 preevent
A	6.243 9 posevent
A	5.653 11 controle

APÊNDICE C – TESTE ESTATÍSTICO GRUPO TORNEIO MEIDA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	0.60267342	0.20089114	2.37	0.0706
Error	269	22.77225281	0.08465521		
Corrected Total	272	23.37492623			

Duncan's Multiple Range Test for DOSAGEMT

Alpha				0.05
Error Degrees of Freedom				269
Error Mean Square				0.084655
Harmonic Mean of Cell Sizes				68.21763
Means with the same letter are not significantly different.				
Duncan Grouping		Mean	N	DIA
	A	1.70241	70	evento
B	A	1.67113	66	pos
B	A	1.63088	69	pre
B		1.57713	68	descanso

APÊNDICE D – TESTE ESTATÍSTICO GRUPO CONTROLE EFEITO DIA

GLM (C1)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	7.18717357	2.39572452	1.20	0.3230
Error	42	84.14001297	2.00333364		
Corrected Total	45	91.32718654			

Duncan's Multiple Range Test for DOSAGENT

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	42
Error Mean Square	2.003334
Harmonic Mean of Cell Sizes	11.47826
Means with the same letter are not significantly different.	
Duncan Grouping	Mean N DIA
A	12.1532 11 preevent
A	11.9723 12 evento
A	11.4409 11 controle
A	11.1741 12 posevent

GLM (C2)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	2.2749091	0.7583030	0.13	0.9414
Error	41	238.0931065	5.8071489		
Corrected Total	44	240.3680156			

Duncan's Multiple Range Test for DOSAGENT

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	41
Error Mean Square	5.807149
Harmonic Mean of Cell Sizes	11.18644
Means with the same letter are not significantly different.	
Duncan Grouping	Mean N DIA
A	13.123 12 evento

A	12.913	11	controle
A	12.842	10	posevent
A	12.516	12	preevent

GLM (C3)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	23.5205394	7.8401798	2.23	0.0992
Error	42	147.9354286	3.5222721		
Corrected Total	45	171.4559679			

Duncan's Multiple Range Test for DOSAGENT

Alpha	0.05		
Error Degrees of Freedom	42		
Error Mean Square	3.522272		
Harmonic Mean of Cell Sizes	11.47826		
Means with the same letter are not significantly different.			
Duncan Grouping	Mean	N	DIA
A	12.3143	12	controle
B	11.4622	11	evento
B	10.7754	12	preevent
B	10.4670	11	posevent

GLM (C4)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	11.5448961	3.8482987	0.65	0.5894
Error	41	243.9156719	5.9491627		
Corrected Total	44	255.4605680			

Duncan's Multiple Range Test for DOSAGENT

Alpha	0.05		
Error Degrees of Freedom	41		
Error Mean Square	5.949163		
Harmonic Mean of Cell Sizes	11.23404		

Means with the same letter are not significantly different.			
Duncan Grouping	Mean	N	DIA
A	13.579	11	controle
A			
A	13.103	12	evento
A			
A	12.582	11	posevent
A			
A	12.234	11	preevent

APÊNDICE E – TESTE ESTATÍSTICO GRUPO CONTROLE MEDIA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	21.7583626	7.2527875	1.56	0.2013
Error	178	828.6692770	4.6554454		
Corrected Total	181	850.4276396			

Duncan's Multiple Range Test for DOSAGENT

Alpha	0.05		
Error Degrees of Freedom	178		
Error Mean Square	4.655445		
Harmonic Mean of Cell Sizes	45.47252		
Means with the same letter are not significantly different.			
Duncan Grouping	Mean	N	DIA
A	12.5564	45	controle
A	12.4354	47	evento
A	11.9078	46	preevent
A	11.7284	44	posevent

APÊNDICE F – TESTE ESTATISTICO MÉDIA GRUPO CONTROLE X
TORNEIO

GRUPO	Method	Mean	95% CL	Mean	Std Dev	95% CL	Std Dev
controle		51.1875	47.1322	55.2428	7.6104	5.6218	11.7785
torneio		54.4654	46.9114	62.0194	17.8893	13.9038	25.0943
Diff (1-2)	Pooled	-3.2779	-12.8929	6.3371	14.7160	12.0266	18.9657
Diff (1-2)	Satterthwaite	-3.2779	-11.6513	5.0954			

Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
Pooled	Equal	38	-0.69	0.4943
Satterthwaite	Unequal	33.408	-0.80	0.4316

Equality of Variances				
Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Folded F	23	15	5.53	0.0013

APÊNDICE G – TESTE ESTATÍSTICO COMPORTAMENTO GRUPO
TORNEIO: AMBIENTE CRIAÇÃO X TORNEIO

TEST t Frequência Vigilância

ambiente	N	Mean	Std Dev	Std Err	Minimum	Maximum
criacao	3	74.6667	96.7747	55.8729	0	184.0
torneio	40	274.7	67.5858	10.6863	182.0	470.0
Diff (1-2)		-200.1	69.2955	41.4810		

Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
Pooled	Equal	41	-4.82	<.0001
Satterthwaite	Unequal	2.1489	-3.52	0.0650

Equality of Variances				
Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Folded F	2	39	2.05	0.2847

TEST t Frequência Manutenção

ambiente	N	Mean	Std Dev	Std Err	Minimum	Maximum
criacao	3	49.0000	71.3583	41.1987	1.0000	131.0
torneio	40	0.6000	1.2568	0.1987	0	6.0000
Diff (1-2)		48.4000	15.8080	9.4628		

Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
Pooled	Equal	41	5.11	<.0001
Satterthwaite	Unequal	2.0001	1.17	0.3610

Equality of Variances				
Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Folded F	2	39	3223.83	<.0001

TEST t Frequência Exploração

ambiente	N	Mean	Std Dev	Std Err	Minimum	Maximum
criacao	3	67.6667	57.4224	33.1528	19.0000	131.0
torneio	40	273.8	132.8	20.9915	60.0000	527.0
Diff (1-2)		-206.2	130.1	77.8810		

Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
Pooled	Equal	41	-2.65	0.0115
Satterthwaite	Unequal	3.893	-5.25	0.0068

Equality of Variances				
Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Folded F	39	2	5.35	0.3398

TEST t Frequência Deslocamento

ambiente	N	Mean	Std Dev	Std Err	Minimum	Maximum
criacao	3	75.6667	53.5195	30.8995	23.0000	130.0
torneio	40	185.0	109.4	17.2944	37.0000	629.0
Diff (1-2)		-109.3	107.3	64.2494		

Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
Pooled	Equal	41	-1.70	0.0965
Satterthwaite	Unequal	3.432	-3.09	0.0450

Equality of Variances				
Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Folded F	39	2	4.18	0.4235

TEST t Frequência Forrageamento

ambiente	N	Mean	Std Dev	Std Err	Minimum	Maximum
criacao	3	23.3333	29.8719	17.2466	0	57.0000
torneio	40	18.6000	17.0592	2.6973	0	59.0000
Diff (1-2)		4.7333	17.8983	10.7141		

Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
Pooled	Equal	41	0.44	0.6610
Satterthwaite	Unequal	2.099	0.27	0.8106

Equality of Variances				
Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Folded F	2	39	3.07	0.1159

TEST t Frequência Dormir

ambiente	N	Mean	Std Dev	Std Err	Minimum	Maximum
criacao	3	4.0000	6.9282	4.0000	0	12.0000
torneio	40	0	0	0	0	0
Diff (1-2)		4.0000	1.5302	0.9160		

Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
Pooled	Equal	41	4.37	<.0001
Satterthwaite	Unequal	2	1.00	0.4226

Equality of Variances				
Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Folded F	2	39	Infty	<.0001

TEST t Frequência Outros

ambiente	N	Mean	Std Dev	Std Err	Minimum	Maximum
criacao	3	7.0000	7.0000	4.0415	0	14.0000
torneio	40	26.7250	24.4718	3.8693	0	102.0
Diff (1-2)		-19.7250	23.9175	14.3173		

Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
Pooled	Equal	41	-1.38	0.1758
Satterthwaite	Unequal	7.0435	-3.53	0.0096

Equality of Variances					
Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F	
Folded F	39	2	12.22	0.1568	

APÊNDICE H – TESTE ESTATÍSTICO COMPORTAMENTO GRUPO
TORNEIO X GRUPO CONTROLE: AMBIENTE CRIAÇÃO

TEST t Frequência Vigilância

grupo	N	Mean	Std Dev	Std Err	Minimum	Maximum
controle	3	71.3333	24.1316	13.9324	51.0000	98.0000
torneio	3	74.6667	96.7747	55.8729	0	184.0
Diff (1-2)		-3.3333	70.5254	57.5838		

Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
Pooled	Equal	4	-0.06	0.9566
Satterthwaite	Unequal	2.2478	-0.06	0.9586

Equality of Variances				
Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Folded F	2	2	16.08	0.1171

TEST t Frequência Manutenção

grupo	N	Mean	Std Dev	Std Err	Minimum	Maximum
controle	3	0.6667	1.1547	0.6667	0	2.0000
torneio	3	49.0000	71.3583	41.1987	1.0000	131.0
Diff (1-2)		-48.3333	50.4645	41.2041		

Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
Pooled	Equal	4	-1.17	0.3059
Satterthwaite	Unequal	2.001	-1.17	0.3615

Equality of Variances				
Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Folded F	2	2	3819.00	0.0005

TEST t Frequência Exploração

grupo	N	Mean	Std Dev	Std Err	Minimum	Maximum
controle	3	25.3333	16.4418	9.4927	13.0000	44.0000
torneio	3	67.6667	57.4224	33.1528	19.0000	131.0
Diff (1-2)		-42.3333	42.2355	34.4851		

Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
Pooled	Equal	4	-1.23	0.2869
Satterthwaite	Unequal	2.3258	-1.23	0.3293

Equality of Variances				
Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Folded F	2	2	12.20	0.1515

TEST t Frequência Deslocamento

grupo	N	Mean	Std Dev	Std Err	Minimum	Maximum
controle	3	76.0000	18.7350	10.8167	55.0000	91.0000
torneio	3	75.6667	53.5195	30.8995	23.0000	130.0
Diff (1-2)		0.3333	40.0957	32.7380		

Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
Pooled	Equal	4	0.01	0.9924
Satterthwaite	Unequal	2.4829	0.01	0.9926

Equality of Variances				
Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Folded F	2	2	8.16	0.2183

TEST t Frequência Forrageamento

grupo	N	Mean	Std Dev	Std Err	Minimum	Maximum
controle	3	23.0000	39.8372	23.0000	0	69.0000
torneio	3	23.3333	29.8719	17.2466	0	57.0000
Diff (1-2)		-0.3333	35.2089	28.7479		

Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
Pooled	Equal	4	-0.01	0.9913
Satterthwaite	Unequal	3.7088	-0.01	0.9913

Equality of Variances					
Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F	
Folded F	2	2	1.78	0.7198	

TEST t Frequência Dormir

grupo	N	Mean	Std Dev	Std Err	Minimum	Maximum
controle	3	0	0	0	0	0
torneio	3	4.0000	6.9282	4.0000	0	12.0000
Diff (1-2)		-4.0000	4.8990	4.0000		

Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
Pooled	Equal	4	-1.00	0.3739
Satterthwaite	Unequal	2	-1.00	0.4226

Equality of Variances					
Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F	
Folded F	2	2	Infty	<.0001	

TEST t Frequência Outros

grupo	N	Mean	Std Dev	Std Err	Minimum	Maximum
controle	3	183.2	317.3	183.2	0	549.5
torneio	3	7.0000	7.0000	4.0415	0	14.0000
Diff (1-2)		176.2	224.4	183.2		

Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
Pooled	Equal	4	0.96	0.3907
Satterthwaite	Unequal	2.0019	0.96	0.4377

Equality of Variances					
Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F	
Folded F	2	2	2054.32	0.0010	

APÊNDICE I – TESTE CORRELAÇÃO DE PERSON

Pearson Correlation Coefficients Prob > r under H0: Rho=0 Number of Observations					
	vigilância	exploração	deslocamento	dosagem média	
vigilância	1.00000	0.47227	0.40664	0.17284	
		0.0556	0.1053	0.5071	
	17	17	17	17	
exploração	0.47227	1.00000	-0.36874	-0.10374	
	0.0556		0.1453	0.6919	
	17	17	17	17	
deslocamento	0.40664	-0.36874	1.00000	0.20273	
	0.1053	0.1453		0.4352	
	17	17	17	17	
dosage média	0.17284	-0.10374	0.20273	1.00000	
	0.5071	0.6919	0.4352		
	17	17	17	18	