GISELA BARBOSA SOBRAL DE OLIVEIRA

História Natural e comportamento social de bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*, Primates: Atelidae) em um dos maiores fragmentos de Mata Atlântica do mundo

SÃO PAULO

2020

GISELA BARBOSA SOBRAL DE OLIVEIRA

História Natural e comportamento social de bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*, Primates: Atelidae) em um dos maiores fragmentos de Mata Atlântica do mundo

Tese apresentada ao Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:
Reprodução Animal

Área de Concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira

VERSÃO CORRIGIDA

SÃO PAULO

2020

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP.

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3986
FMVZ

Oliveira, Gisela Barbosa Sobral de
História Natural e comportamento social de bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*, Primates: Atelidae) em um dos maiores fragmentos de Mata Atlântica do mundo / Gisela Barbosa Sobral de Oliveira. – 2020.
200 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira.

1. Análise de redes sociais. 2. Animais selvagens. 3. Uso espaço-temporal. 4. Interação mãe-filhote. 5. Reprodução. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Comportamento Reprodutivo ao Longo do Ciclo Ovariano, com Inferências de Seleção Sexual, em Bugios-ruivos (Alouatta clamitans, Primates:Atelidae) no Parque Estadual Carlos Botelho, São Paulo", protocolada sob o CEUA nº 4864040618 (ID 005648), sob a responsabilidade de **Cláudio Alvarenga de Oliveira** *e equipe; Gisela Barbosa Sobral de Oliveira* - 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 17/10/2018.

We certify that the proposal "Reproductive behavior throughout the ovarian cycle, with sexual selection inferences, in brown howlers (Alouatta clamitans, Primates: Atelidae) at Parque Estadual Carlos Botelho, São Paulo", utilizing 25 Non-human primates (males and females), protocol number CEUA 4864040618 (ID 005648), under the responsibility of **Cláudio Alvarenga de Oliveira** *and team; Gisela Barbosa Sobral de Oliveira* - 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 10/17/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 09/2016 a 06/2020 Área: Reprodução Animal

Origem:	Não aplicável biotério						
Espécie:	Primatas não-humanos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	0 a 20 anos	N:	25
Linhagem:	Selvagem			Peso:	1 a 15 kg		

Local do experimento: O estudo será realizado no Parque Estadual Carlos Botelho (PECB) (24° 01 a 24° 13 S e 47° 47 a 48° 06 W), núcleo São Miguel Arcanjo, São Paulo. A área está inserida no domínio morfoclimático das regiões serranas, na Serra de Paranapiacaba (700-1.000m anm). O índice pluviométrico é de 1700mm a 2400mm distribuídos em períodos de chuva bem definidos no verão (dezembro a março), alternando-se com períodos de menor pluviosidade no inverno, e temperatura variando entre 22 e 27°C (dados do Instituto Nacional de Meteorologia, INMET).

São Paulo, 11 de janeiro de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SOBRAL, Gisela

Título: História Natural e comportamento social de bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*, Primates: Atelidae) em um dos maiores fragmentos de Mata Atlântica do mundo

Tese apresentada ao Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: _____ / _____/ _____

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico essa tese à população brasileira:

Quem realmente financia o ensino superior público e permite que a pesquisa continue sendo de qualidade por meio dos impostos. Infelizmente, apenas uma pequena parcela do povo brasileiro tem acesso ao ensino superior.

AGRADECIMENTOS

É possível que minha formação atual como bióloga de campo, estudando comportamento de animais selvagens, tenha sido moldada por três pessoas: minha mãe, por ter me ensinado a sempre recorrer aos livros para sanar dúvidas, para descobrir curiosidades e até por lazer, tornando comum o hábito de estudar os mais variados assuntos. Minha irmã, também bióloga e incentivadora para eu seguir a carreira de cientista. Finalmente meu pai, naturalista inato, amante do mato e da observação da Natureza *in situ*.

Agradeço...

À minha família, Márcia, Gabriela, Wilson, Luciana e Filipe, que, de diferentes maneiras, ajudou ao longo desse percurso, antes, durante e depois. Fosse me incentivando a sair do ninho, doando uma mochila para ir para campo, financiando a gasolina para o percurso até o campo, disponibilizando seus ouvidos nos momentos difíceis e também dando o que se tem de mais precioso hoje em dia: o tempo.

Em especial, agradeço as discussões científicas e a parceria consistente do Filipe Gudinho, sem as quais essa trajetória teria sido, no mínimo, menos divertida e comemorada. Sua visão holística da vida e da Biologia foram cruciais em virtualmente todas as etapas ao longo desses anos.

À toda a equipe do Kalahari Meerkat Project por terem me dado a oportunidade de aprender e aplicar as técnicas de comportamento animal. Um aprendizado importante para a minha construção como profissional, pois toda a logística de campo e de coleta de dados do meu doutorado teve como base o período que passei nesse projeto. Particularmente, agradeço à Constance Dubuc por ter incentivado a minha ideia de conciliar hormônios e comportamento e, posteriormente, me trazido ao ramo do estudo com primatas.

Aos amigos do Museu Nacional/UFRJ (MN/UFRJ), Brunna Almeida, Dayana Mota, Alessandra Pavan, Caryne Braga, Aldo Caccavo, Filipe Gudinho, Marcos Cruz, Carolina Pires, Prof João Alves de Oliveira, Profª Leila Maria Pessoa e Prof Marcelo Weksler, por sempre terem deixado as portas abertas da minha segunda casa, independente do momento que eu fosse e de que perguntas eu levasse! Agradeço, especialmente, ao Prof João por ter me ensinado a ser a pesquisadora que sou hoje, e sempre disposto a me ensinar mais e mais sobre estatística. Um agradecimento especial para Aldo Caccavo por ter confeccionado o mapa dos territórios dos bugios e me auxiliado na produção da última figura da minha tese, o gráfico do estilo materno.

Ao Prof Mauricio Talebi que me apresentou aos bugios do Parque Estadual Carlos Botelho e compartilhou comigo seu conhecimento da realidade de campo em um momento crucial, que era justamente no estabelecimento desse projeto.

Às colegas do Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH), Carolina Vanin, Gabriela Martins, Heriberto Moyano, Marcela Sene, Maria Amélia, Mariana Abreu, Marina Telles, Natasha Orteney, Nelson Dias, Patrícia Tachinardi e Priscila Viau, pela convivência, pelos pitacos e pelas discussões valiosas ao longo dos seminários de discussão. Essa turma, cada um com seu *background* e sua expertise, fez com que os debates sempre tivessem vários lados e eu expandi muito minha cabeça.

Em especial, agradeço à Priscila, a resolvedora de problemas e mentora nas dosagens. Seu apoio foi essencial e com certeza a qualidade da minha tese seria infinitamente inferior sem os ensinamentos dela. Sua paixão pelas dosagens hormonais me contagiou. Outra gratidão eterna à Gabriela, por ter sido minha "side kick" do início ao fim do doutorado. Juntas fizemos uma dupla científica imbatível. E nós três juntas, a tríade Hormonais. Também merece destaque a Marina, aluna dedicada e quem mergulhou na análise de redes sociais inicialmente, me ensinando mais do que eu ensinei a ela. Sou grata também pela relação orientada-orientadora ter evoluído para uma amizade.

Ao meu orientador, Prof Claudio Alvarenga de Oliveira, que nunca deixou faltar nada para a coleta de dados a campo em um período político-financeiro do país muito crítico. Sempre estimulou minhas ideias malucas e me treinou para diversas tarefas que, de outra forma, eu não teria oportunidade.

Aos demais professores e funcionários do VRA, particularmente Harumi Hirashi, por sua competência em coordenar o andamento de cada aluno (sem deixar faltar um!) e saber de cor cada burocracia necessária para que o doutorado chegasse ao fim.

Aos envolvidos na extração dos colonócitos, Renata Novaes (Eppendorf); Prof. Ricardo Pereira, Marcel Blank e Bruno Rui (GEMA-USP); Diogo Palermo (Laboratório de Anatomia Microscópica e Imunohistoquímica-USP) e Andressa Costa (Laboratory of Membrane Biophysics-USP). Apesar do insucesso ao extrair, a ciência colaborativa falou mais alto.

Aos docentes e participantes das disciplinas que fiz na USP, especialmente Drª Michele Verderane, Profª Patrícia Izar, Dr. Marcelo Bolaños e Prof Nicolás Châline, e todos os alunos e alunas das disciplinas de Interação Mãe-Filhote e Análise de Redes Sociais, pelo aprendizado imensurável e pelas discussões riquíssimas que deram novo rumo ao meu doutorado (e possivelmente minha carreira).

Aos gestores do PECB, Sr Maia, Sr Pietro e Srª Stéfanie, que se mostraram dispostos a colaborar com o projeto, especialmente Srª Stéfanie, pois, sem sua ajuda, o campo não teria sido possível. Agradeço também à equipe do PECB, Édipo, Douglas, Anderson, William, Lene e especialmente a

Dona Glacy, que me fez companhia em vários momentos no parque e me deu muito suporte desde o início, quando nem me conhecia direito.

Em especial, agradeço à família Soares, particularmente ao Michel e à mamãe Maria Rosa, por terem sido tão bons acolhedores (e cozinharem tão bem), fazendo com que as longas horas no mato fossem cheias de quitutes e amor. Ao Michel, por ter sido mais que mateiro e assistente, mas que lutou contra dragões e fez com que as 14h/dia de convívio no mato nunca fossem entediantes. Metade desse trabalho também é dele.

Aos diversos pesquisadores e pesquisadoras que conheci no alojamento do PECB. Foram muitos contatos profissionais, companhia, refeições, dicas de como melhorar meu desempenho no mato, colaborações e uma infinidade de benefícios que tive na minha vida por conta dessa vivência. A mais marcante, sem dúvida, foi ter conhecido Lisieux Fuzessy e, juntas, criarmos a Pró-Ruivo, um projeto de divulgação científica sobre os bugios do PECB.

Ao Prof Marcelo Weksler (MN/UFRJ) por ter abraçado a porção genética desse projeto. Além dele, também agradeço ao Átila Duque Rossi (Laboratório de Virologia Molecular-UFRJ), colega de turma e atual colaborador; Mirela D'Arc (INCA-RJ) e Bruno Saranholi (UFSCar). Esse trio me ensinou sobre todos os processos envolvidos no estudo de microssatélites. Sem eles, não teria sido possível iniciar essa vertente do meu doutorado.

Aos colegas e organizadores dos congressos que participei ao longo desses anos tanto pelo meu enriquecimento pessoal quanto científico. Os momentos de congressos são, para mim, o suprassumo da Academia. Além de poder rever colegas, é um momento de discutir ciência em um ambiente relativamente informal, onde as melhores ideias e colaborações surgem.

A todos que contribuíram para a vaquinha das análises hormonais: Alessandra Pavan, Alexandre Pedro Selvatti, Ana Carolina Bezerra, Andre Zanforlin, Bruno Gudinho, Camila Vannucchi, Carolina Martins, Davi Vargas, Douglas Gallão, Eugênio Mattioli, Fábio Hirata, Felipe Carrasco, Filipe Gudinho, Gabby Guilhon, Gabriela Sobral, Gabriela Martins, Julia Castro, Lana Resende, Luana Sávia, Márcia Sobral, Marco Aurélio Roncatti, Maria Daniele Costa, Marlos Ápyus Lopes de Araújo, Murilo Farezin, Natália Gonzaga, Núbia Estaele, Ronailde Souza, Patrícia Guedes da Silva, Paula Corsini, Paulo Roberto da Costa, Rosanne Souza, Thales Moreira de Lima e Vera Ruffato, além das incontáveis pessoas que compartilharam a vaquinha e fizeram com que ela ganhasse visibilidade! Meu eterno obrigada. Vocês contribuíram para a pesquisa brasileira e para a conservação dos bugios.

Durante meu período de doutorado sanduíche, agradeço a diversas pessoas do Wisconsin National Primate Research Center (WNPRC) por toda a empatia, carinho e paciência que tiveram comigo

desde o momento que botei os pés no laboratório. Sou imensamente grata ao Cody Corbett que me ajudou nos dias críticos iniciais com a burocracia e o treinamento de boas práticas laboratoriais. Também sou grata à Gabriela de Faria Oliveira que, com sua personalidade acolhedora, fez meu período sanduíche numa cultura diferente ser como se eu ainda estivesse no Brasil. Também agradeço ao Hemanta Shrestha por ter me treinado nas extrações urinárias e nos ensaios ELISA, me corrigindo sempre que necessário, valorizando meus acertos e discutindo os resultados obtidos. Robin Goy, pelo treinamento nas extrações fecais, ensaios LC-MS e paixão que demonstrava pelo desenvolvimento do meu projeto. Keenan Gerred, que se envolveu na resolução dos problemas de ELISA. Agradeço também à Erin Wiedholz pela companhia nas semanas finais da minha estadia, pela lapidação na rotina laboratorial e pela mentoria no ensaio de creatinina.

Ainda sobre o WNPRC, agradeço à Drª Toni Ziegler por ter aceitado me orientar no exterior mesmo com a aproximação da sua aposentadoria. Além disso, seu cuidado e carinho para com os alunos e alunas é algo que usarei como referência para o futuro. Sua sucessora, Drª Amita Kapoor, também foi extremamente fundamental no meu dia a dia no laboratório e se dedicou à resolução dos problemas dos ensaios (que foram muitos). Ambas as pesquisadoras abraçaram a causa das abordagens inovadoras, quando ninguém sabia se ia dar certo, mas confiaram em mim para tentar.

Também agradeço ao Ian Campbell da plataforma *Stackoverflow* por ter escrito um script simples para o R que permitiu somar as distâncias percorridas pelos bugios.

Imensamente grata à Alexandra Elbakyan pela acessibilidade ao conhecimento.

Agradeço aos queridos e queridas Filipe Gudinho, Gabriela Martins, Gabriela Sobral, Lisieux Fuzessy, Lucas Wellington e Márcia Sobral, pela leitura e comentários da tese em sua versão final. Também sou grata aos meus parceiros de Pomodoro Marco Antonio Menezes, Manuella Folly e, especialmente, Eugênio Mattioli, pela companhia e apoio virtual diários durante a etapa final de redação e conclusão do documento.

Finalmente, agradeço à banca pelos comentários valiosos durante a arguição, melhorando a qualidade desse trabalho.

Do início ao fim do meu doutorado, fui rodeada de mulheres incríveis, dos mais diversos conhecimentos e personalidades. O mundo com certeza é um lugar melhor com elas, e eu sou um mosaico de todas. Sorte a minha.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

"A pesquisa em biologia tem sido tradicionalmente realizada mais por homens do que por mulheres e é possível que, como aconteceu nas ciências sociais, a pesquisa seja, por vezes, inadvertidamente influenciada por perspectivas masculinas”

(William Eberhard)

RESUMO

SOBRAL G. História Natural e comportamento social de bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*, Primates: Atelidae) em um dos maiores fragmentos de Mata Atlântica do mundo. [Natural History and social behaviour of brown howler monkeys (*Alouatta clamitans*, Primates: Atelidae) in one of the largest Atlantic Forest fragment in the world]. 2020. 200 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

A ecologia e o comportamento de diversos animais arborícolas, principalmente considerando-se parâmetros ecológicos, de organização social e de estresse, são fortemente influenciados pela fragmentação. Essa constatação se baseia principalmente em estudos realizados com primatas, porém a maior parte destes foi, e continua sendo, conduzido em ambientes pequenos, isolados e altamente alterados, haja vista que há poucos fragmentos grandes ou contínuos no planeta. *Devido a essa escassez, o objetivo geral da presente tese é investigar os desdobramentos para o comportamento social de um primata que vive em um fragmento grande e contínuo.* Para responder a tal questão, grupos de bugios-ruivo selvagens foram acompanhados entre novembro de 2017 e dezembro de 2018 no Parque Estadual Carlos Botelho, SP, um fragmento de 38.000 ha e incluído em um contínuo que pode atingir 200.000 ou 350.000 a depender da autoridade. Durante esse período, foram coletados dados comportamentais, o posicionamento por GPS e amostras não-invasivas (urina e fezes). Para o desdobramento no nível mais alto, o dos parâmetros ecológicos, foi descrita quantitativamente a variação intergrupos para os parâmetros de taxas de competição intra e interespecífica, de orçamento de atividades, de área de vida e de dieta. Posteriormente, testou-se a influência de variáveis bióticas e abióticas no percurso diário pela análise de caminhos, uma vez que este possui forte correlação com os demais parâmetros ecológicos. As variáveis abióticas incluíram estação do ano, pluviosidade e temperatura. Os resultados dos parâmetros analisados foram semelhantes ao de outras espécies do gênero em fragmentos pequeno, embora a área de vida tenha variado amplamente entre os dois grupos. Além disso, detectamos diferenças notáveis com relação à competitividade, sendo menor nesse fragmento grande, representada tanto pela ausência de sobreposição de áreas de vida quanto pelos encontros intergrupo, competição intragrupo e competição interespecífica. Visto que o tamanho de fragmento não influenciou os parâmetros ecológicos desses grupos, seguiu-se para a análise do desdobramento de nível intermediário, o de organização social. Além da apresentação do sistema social dos grupos, também se testou qual fator – parentesco

mãe-filhote, sexo e idade – melhor explicou a variação nos padrões de interação das díades e relacionou-se com mudanças demográficas de imigração, nascimento e desaparecimento de indivíduos a partir da análise de redes sociais. Fêmeas foram os agentes fundamentais na catação e os índices de associações diádicas foram mais altas entre os filhotes e suas respectivas mães. O grupo onde ocorreu maiores mudanças demográficas ao longo do tempo tinha menores taxas de catação e maiores taxas de agressão. Ainda assim, considerando-se que esses grupos interagiram mais do que anteriormente relatado na literatura para a espécie, foi avaliado, então, o desdobramento ao nível mais baixo, o de interações diádicas. Para tanto, investigou-se a adequação das categorias de estilo materno a uma espécie de primata que pouco interage, a fim de detectar diferenças individuais nas interações entre mães e seus filhotes. A maioria das categorias foi extremamente rara e apenas o tempo em contato físico foi altamente variável entre as fêmeas, sendo esta a única variável significativa. Finalmente, os hormônios responderiam o nível ainda mais baixo, o dos mecanismos endocrinológicos subjacentes aos padrões encontrados em cada um desses níveis observados anteriormente em um fragmento dessa magnitude. Os resultados dos ensaios hormonais, embora negativos, ajudarão estudos posteriores, pois permitirão o ajuste das pesquisas futuras, aumentando as chances de sucesso. Essa tese é um dos poucos estudos ecológico-comportamentais de primatas em fragmento contínuo de Mata Atlântica. Os resultados aqui encontrados têm o potencial de auxiliar em planos de manejo *in situ* e *ex situ*, projetos de translocação, de reintrodução e de reprodução assistida. Esses resultados evidenciam como estudos de história natural e do comportamento social fornecem conhecimento fundamental para nossa compreensão de como grupos individuais se comportam em ambientes pristinos, de modo que possamos entender as consequências da nossa atividade e da fragmentação nas populações selvagens.

PALAVRAS-CHAVE: Análise de Redes Sociais; Animais Selvagens; Uso espaço-temporal; Interação mãe-filhote; Reprodução.

ABSTRACT

SOBRAL G. Natural History and social behaviour of brown howler monkeys (*Alouatta clamitans*, Primates: Atelidae) in one of the largest Atlantic Forest fragments in the world [História Natural e comportamento social de Bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*, Primates: Atelidae) em um dos maiores fragmentos de Mata Atlântica do mundo]. 2020. 200 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2020.

The ecology and behavior of several arboreal animals, such as ecological parameters, social organisation and stress, are strongly influenced by fragmentation. These findings are largely based on studies with primates, much of which were, and continue to be, conducted in small, isolated and highly altered fragments. *Due to this scarcity, this thesis's general objective is to investigate the unfolding of living in a large and continuous fragment for a primate's social behaviour.* To answer this question, I followed groups of wild howler monkeys between November 2017 and December 2018 at the Carlos Botelho State Park, SP, a fragment of 38,000 ha and included in a continuum that can reach 200,000 or 350,000 depending on the authority. I collected behavioural data, GPS positioning and non-invasive samples (urine and faeces). To analyse the unfolding at the highest level, that of ecological parameters, I describe quantitatively the intergroup variation for the parameters of intra and interspecific competition, activity budget, home range and the diet. Subsequently, I tested the influence of biotic and abiotic variables on the daily path, given that it presents a strong correlation with the other ecological parameters. The abiotic variables included season, rainfall, and temperature. Values of the analyzed parameters were similar to those of other species of the genus in small fragments, although home range varied widely between the two groups. Additionally, I detected notable differences with respect to competitiveness, being smaller in this large fragment, represented by the absence of overlapping home ranges, intergroup encounters, as well as intragroup and interspecific competition. Since fragment size did not influence these groups' ecological parameters, I went on to the following level of analysis, that intermediate level of social organization. I present the groups' social system and tested which factor – mother-infant relationship, sex or age – best explained the variation in the interaction patterns of the dyads. I also correlated these patterns with demographic changes (immigration, birth and disappearance of individuals) using social networks analysis. Females were the key agents in grooming, and the dyadic association rates were higher among those with infants. The group with the most

remarkable demographic changes had lower rates of grooming and higher rates of aggression. Considering that these groups interacted more than previously reported in the literature for the species, the following analysis included the lowest level, the dyadic interactions. Therefore, I analysed the adequacy of the maternal style categories to a primate species with little interaction rates, and if it enough to detect individual differences in the interactions between mothers and their offspring. Most of the categories were extremely rare and only the time in physical contact was highly variable among females, this being the only significant variable. Finally, the hormones would respond to the even lower level, that of the endocrinological mechanisms underlying the patterns found at each of these levels previously analysed in a fragment of this magnitude. The results of hormonal assays, although negative, will help further studies, as they will allow the adjustment of future research, increasing the chances of success. This thesis is one of the few ecological-behavioural studies of primates in a continuous Atlantic Forest fragment. The results found here can assist in *in situ* and *ex situ* management plans, translocation, reintroduction, and assisted reproduction projects. These results show how studies on natural history and social behaviour provide fundamental knowledge for our understanding of how individual groups behave in pristine environments, so that we can understand the consequences of our activity and fragmentation in wild populations.

KEYWORDS: Spatio-temporal use; Social Network Analysis; Mother-infant interaction; Reproduction; Wildlife.

LISTA DE TABELAS

Introdução Geral

Tabela 1: Relação dos comportamentos anotados pelo método de todas as ocorrências.

Capítulo I

Tabela 1: Esquema simples da modelagem utilizada na análise de caminhos. As colunas influenciam as linhas. Zero indica ausência de influência e 1 indica influência.

Tabela 2: Variáveis de deslocamento, orçamento de atividades e dieta para cada grupo de estudo.

Tabela 3: Diferença entre médias das variáveis com relação às diferentes categorias analisadas.

Capítulo II

Tabela 1: Lista de taxas de interações afiliativas por espécie, a taxa, a unidade, o nível avaliado (díade, grupo ou indivíduo) e a referência do estudo.

Tabela 2: Tamanho e composição dos grupos estudados.

Tabela 3: Métricas de rede para ambos os grupos (G3 e G4) com relação à categoria analisada.

Tabela 4: Relação das métricas individuais de cada uma das categoriais comportamentais separadas por grupo e por indivíduo.

Capítulo III

Tabela 1: Identidade da Mãe (ID Mãe), comportamentos positivos e a contagem, comportamentos negativos e a contagem, total de cada categoria e taxas de emissão dessas categorias comportamentais (número total de comportamentos emitidos por segundo).

Tabela 2: Valores de *eigenvector* da PCA realizada com as variáveis colapsadas e excluindo-se percentual em contato. Aqui são apresentados os valores para o primeiro componente principal (PC1) e o segundo componente principal (PC2). Os demais componentes principais foram suprimidos. Os valores estão em ordem decrescente e os valores negativos em cinza.

Tabela 3: Valores de correlação (*loadings*) entre as categoriais comportamentais e os fatores extraídos da PCA ajustada (análise fatorial). Os valores negativos estão marcados em cinza. Coeficientes altos (marcados em negrito, maiores que 0,50), independentes do sinal, indicam forte relação entre a variável e o fator.

Tabela 4: Sumário dos valores obtidos para cada uma das análises e cada uma das fêmeas de bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*) com filhote.

Capítulo IV

Tabela 1: Listagem de amostras eleitas para o primeiro ensaio de ocitocina para serem utilizadas nas validações.

Lista de Apêndices

APÊNDICE I.A: Lista de dias com a quantidade de horas de observação para cada grupo.

APÊNDICE I.B: Lista de valores diários das variáveis analisadas e incluídos no modelo da análise de caminhos.

APÊNDICE I.C: Valores mensais do tamanho da área de vida em hectare para cada grupo, calculado a partir do 95% MCP.

APÊNDICE IV.A: Resultado das diluições seriadas do *pool* das amostras de alta concentração para o ensaio de ocitocina urinária.

APÊNDICE IV.B: Diluições menores de quatro amostras (GS624, GS627, GS797 e GS844). "Fora" indica fora do limite de detecção do teste. A sequência de diluição não foi a mesma para todas as amostras por conta do menor volume.

APÊNDICE IV.C: Resultado do teste de acurácia. Primeira coluna indica as concentrações teóricas adicionadas de acordo com os valores do kit; a segunda coluna mostra o valor base mensurado do *pool* de amostras (hexaplicatas) e o valor mensurado no ensaio; a terceira coluna indica o valor esperado (valor médio do *pool* mais o valor adicionado); a quarta coluna mostra o valor observado; e a quinta coluna mostra a variação em porcentagem. Os valores marcados em vermelho foram discrepantes.

APÊNDICE IV.D: Resultado do teste de recuperação. Primeira coluna indica as concentrações teóricas adicionadas de acordo com os valores do kit; a segunda coluna mostra o valor base mensurado das quadruplicatas da amostra GS800 e o valor mensurado no ensaio; a terceira coluna indica o valor esperado (valor médio das quadruplicatas mais o valor adicionado); a quarta coluna mostra o valor observado; e a quinta coluna mostra a variação em porcentagem. As concentrações estão em picograma por poço (pg/poço).

APÊNDICE IV.E: Resultado do ensaio envolvendo algumas das frações intermediárias do teste de recuperação. SPE 1ª e 2ª indicam a ordem que foi realizada. Limite mínimo: 4.095pg/mL e limite máximo: 262.500 pg/mL.

APÊNDICE IV.F: Relação das concentrações oriundas do ensaio de ocitocina. Amostras GS627 e GS800 foram utilizadas como controle, sem utilização de filtro ou de uma segunda SPE. As amostras indicadas como "filtro" são aquelas da tentativa i, onde a amostra diluída em isopropanol passou por um filtro. Já as amostras indicadas como "SPE" são aquelas da tentativa ii, onde se realizou uma segunda extração de fase sólida (SPE).

APÊNDICE IV.G: Cromatogramas de Progesterona de cada um dos protocolos utilizados na análise multiesteroide do LC-MS.

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral

Figura 1: Distribuição geográfica de 12 espécies de *Alouatta*. Adaptado de: CORTÉS-ORTIZ *et al.* (2015).

Figura 2: Relação dos 100 trabalhos (artigo publicados ou teses) encontrados na plataforma Google Acadêmico com as palavras-chave "Alouatta clamitans" e "Alouatta guariba" (entre aspas). A busca incluiu a visualização até a última página disponível. A categorização do assunto foi feita com base em critérios pessoais apenas a título de ilustração. A: separação por assunto. B: separação por tamanho de fragmento. C: separação por localidade (ARG: Argentina, Museu: exemplares de museu sem referência ao local de coleta; as siglas dos Estados e vários: um estudo com várias localidades não informadas). Não foi incluída a nomenclatura antiga "Alouatta fusca".

Figura 3: Mapa indicando a localização do PECB dentro do Brasil, do estado de São Paulo e do Contínuo Ecológico da Serra de Paranapiacaba. Fonte: PLANO DE MANEJO (2015).

Figura 4: Representação gráfica dos territórios dos seis grupos vizinhos conhecidos na região. Apenas os territórios em verde (G3) e em laranja (G4) foram estimados. Os demais (rosa, azul, vermelho e branco) foram com base em avistamentos esporádicos e não foram estimados, com o tamanho e forma dos polígonos apenas para representação gráfica.

Capítulo I

Figura 1: Gráfico apresentando a pluviosidade acumulada (barras pretas, mm) e a média da temperatura (linha cinza, ºC) para cada mês do período de estudo (2018).

Figura 2: Representação gráfica dos territórios dos seis grupos vizinhos conhecidos na região. Apenas os territórios em verde (G3) e em laranja (G4) foram estimados. Os demais (rosa, azul, vermelho e branco) foram com base em avistamentos esporádicos e não foram estimados, com o tamanho e forma dos polígonos apenas para representação gráfica.

Figura 3: Variação mensal na proporção de folhas e frutos ingeridos em ambos os grupos conjuntamente. No mês de junho, houve apenas um dia de coleta e no mês de agosto, os grupos não foram encontrados. As barras indicam desvio padrão.

Figura 4: Média mensal do percurso diário em metros de cada grupo. Em cinza, média do G3 e em preto, média do G4. As barras indicam desvio padrão.

Figura 5: Esquema representativo dos efeitos pela análise de caminhos que influenciam o percurso diário (PD) de bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*). Linhas pretas cheias: efeitos diretos; linhas cinza tracejadas: efeitos indiretos. Efeitos significativos estão marcados com asterisco.

Capítulo II

Figura 1: Exemplo de um momento pelo método de varredura, onde se anotou o comportamento individual e os vizinhos mais próximos de cada indivíduo.

Figura 2: Redes direcionadas de catação para cada um dos grupos de bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*). A: indivíduos envolvidos na catação do grupo 3, no qual não participaram dois indivíduos; B: indivíduos do grupo 4, onde todos os indivíduos engajaram-se em sessões de catação.

Figura 3: Rede de associação espacial para cada um dos grupos de bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*). A: rede do grupo 3; B: rede do grupo 4. As arestas estão proporcionais entre os grupos.

Figura 4: Redes de associação espacial do grupo 3 evidenciando a ampliação da fêmea visitante ao longo do tempo. **A:** padrão em dezembro de 2017; **B:** padrão até fevereiro de 2018; e **C:** padrão em março de 2018. Note a restrição da relação da fêmea imigrante (Tênia) para apenas os indivíduos adultos em C.

Capítulo III

Figura 1: Orçamento de atividade por hora nos dois grupos de bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*) conjuntamente. Um dia completo compreendeu a duração das 6 às 20h (verão), porém um maior número de observações ocorreu entre 7 e 19h**.**

Figura 2: Média dos índices de associação espacial de cada díade ao longo da idade do filhote. RRN: Reco-Reco e Naldo, RRC: Reco-Reco e Cuíca, TTi: Teresa e Tiê, LM: Lolô e Manu. A barra tracejada demonstra a média total dos dois grupos de *Alouatta clamitans* estudados (0,36).

Figura 3: Latência para cada uma das mães (Lolô em preto, Reco-Reco em cinza) de bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*) ao longo da idade dos filhotes.

Figura 4: Os quatro estilos maternos encontrados em fêmeas de bugios-ruivos (*Aloautta clamitans*) separados por quadrantes. Os quadrantes foram definidos de acordo com a análise fatorial, onde o fator 1 refere-se ao eixo rejeitador, ao passo que o fator 2 refere-se ao eixo protetor. Marcadores pretos: Lolô; marcadores azuis: Teresa; marcadores vermelhos: Reco-Reco. Marcador triangular: observações comportamentais. Marcador em cruz: centroide da elipse de cada mãe.

Capítulo IV

Figura 1: Esquema de sinalização por hormônios esteroides e não-esteroides e seus respectivos mecanismos. Adaptado de: Bodell online bio (2019).

Figura 2: Domínios compartilhados entre os hormônios esteroides, sendo ER para receptor de estrogênio; GR receptor de glicocorticoide; PR receptor de progesterona; AR receptor de andrógeno e MR receptor de mineralocorticoide. Adaptado de: SCALLY (2018).

Figura 4: Biossíntese completa dos hormônios esteroides. Adaptado de: HÄGGSTRÖM & RICHFIELD (2014).

Figura 5: Diagrama esquemático da evolução da família da ocitocina/vasopressina. Adaptado de HOYLE (1999). Nota: não indica evolução filogenética das linhagens animais.

Figura 6: As duas vias de metabolização dos hormônios, resultando na presença concentrada de metabólitos nas fezes e/ou urina. Adaptado de: WHITTEN *et al.* (1998).

Figura 7: Curva padrão do ensaio imunoenzimático de ocitocina. A curva está em escala logarítmica.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABP	Androgen Binding Protein (Proteína Ligadora de Andrógenos)
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de Variância
AR-AP	Alta Rejeição-Alta Proteção
AR-BP	Alta Rejeição-Baixa Proteção
ARS	Análise de Redes Sociais
BR-AP	Baixa Rejeição-Alta Proteção
BR-BP	Baixa Rejeição-Baixa Proteção
Cr	Creatinina
DC	Dansyl chloride (Cloreto de Dansilo)
DP	Desvio Padrão
EIE	Enzimaimunoensaio
ER	Estrogen Receptor (Receptor de Estrogênio)
FA	Fêmea Adulta
FL	Fosfolipídio
FSH	Follicle-Stimulating Hormone (Hormônio Folículo-Estimulante)
G	Grau Médio
GE	Grau de Entrada
GEP	Grau de Entrada Ponderado
GLM	Modelos Lineares Generalizados
GM	Grau Médio
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone (Hormônio Liberador de Gonadotrofina)
GP	Grau Ponderado
GPM	Grau Ponderado Médio
GR	Glucocorticoid Receptor (Receptor de Glicocorticoides)
GS	Grau de Saída
GSP	Grau de Saída Ponderado
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Performance)
HWI	Half Weight Index
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
ISTD	Internal Standard (Padrão Interno)
KDE	Kernel Density Estimate (Estimativa de Densidade de Kernel)
LC	Least Concern (Menos Preocupante)

LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas)
LDH	Laboratório de Dosagens Hormonais
LH	Luteinizing Hormone (Hormônio Luteinizante)
LLE	Liquid-Liquid Extraction (Extração Líquida-Líquida)
LM	díade Lolô e seu filhote Manu
MA	Macho Adulto
MCP	Minimum Convex Polygon (Mínimo Polígono Convexo)
MI	Macho Infante
MR	Mineralocorticoid Receptor (Receptor de Mineralocorticoide)
mRNA	RNA mitocondrial
MS	Macho Subadulto
MTBE	Methyl Tert-Butyl Ether (Éter Metil Terciário Butílico)
NR3	Nuclear Receptor Subfamily 3 (Receptor Nuclear Subfamília 3)
NR3A1	Nuclear Receptor Subfamily 3 Subgroup A Member 1
NR3A2	Nuclear Receptor Subfamily 3 Subgroup A Member 2
OT	Ocitocina
PA	Padrão de Atividade
PC	Primatas Catarrhini (em substituição a “Primatas do Velho Mundo”)
PC1	Principal Component 1 (Componente Principal 1)
PC2	Principal Component 2 (Componente Principal 2)
PCA	Principal Component Analysis (Análise de Componentes Principais)
PD	Percurso Diário
PECB	Parque Estadual Carlos Botelho
PETAR	Parque Estadual Turístico do Alto do Ribeira
PLS-PM	Partial Least Squares Path Modelling (Análise de Caminhos)
PP	Primatas Platyrrhini (em substituição a “Primatas do Novo Mundo”)
PR	Progesterone Receptor (Receptor de Progesterona)
RIE	Radioimunoensaio
RR	Reco-Reco
RRC	díade Reco-Reco e seu filhote Cuíca
RRN	díade Reco-Reco e seu filhote Naldo
SPE	Solid-Phase Extraction (Extração de Fase Sólida)
TFA	Trifluoroacetic Acid (Ácido Trifluoroacético)
TTi	díade Teresa e seu filhote Tiê
VU	Vulnerable (Vulnerável)
WNPRC	Wisconsin National Primate Research Center

SUMÁRIO

Introdução Geral 24

Mamíferos são inerentemente sociais 25

Importância da área de estudo 31

Os grupos de bugio 32

Organização da tese 33

Referências 37

Capítulo I: Nada perturba a paz dos bugios: uso do tempo e do espaço por um primata folívoro Neotropical 44

Resumo 45

Introdução 46

Material e Métodos 49

Resultados 54

Discussão 60

Conclusões 67

Referências 67

Capítulo II: Demografia e sistema social de bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*): mecanismos subjacentes à estrutura social 78

Resumo 79

Introdução 80

Material e Métodos 83

Resultados 86

Discussão 92

Conclusões 99

Referências 100

Capítulo III: Analisando diferenças individuais no cuidado materno: podemos aplicar as categorias de Catarrhini em bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*)? 109

Resumo 110

Introdução 111

Material e Métodos 114
Resultados 119
Discussão 125
Conclusões 128
Referências 128

Capítulo IV: Evolução, ação e mensuração de hormônios proteicos e esteroides envolvidos nas interações sociais de bugios-ruivos 135
Resumo 136
Introdução 137
Material e Métodos 154
Resultados 160
Discussão 164
Conclusões 167
Referências 168

Conclusões Gerais 186
Apêndices 189

INTRODUÇÃO GERAL

MAMÍFEROS SÃO INERENTEMENTE SOCIAIS

Os mamíferos são parte de um grupo monofilético e inerentemente social devido à sua estratégia reprodutiva, onde os filhotes dependem integralmente do cuidado materno para sobrevivência e desenvolvimento (*e.g.* MASON, 1960; SIMPSON *et al*., 2016). Dessa forma, as interações sociais são cruciais para o desenvolvimento e manutenção do comportamento em mamíferos, sobretudo os sociais. As interações sociais são tão primordiais que indivíduos socialmente isolados desde tenra idade e que não tiveram oportunidade de desenvolver a comunicação (MASON, 1960; HALL, 1998; PITTET *et al.,* 2014) apresentam problemas de saúde e, em casos crônicos, pode levar à diminuição de serotonina (SHAMS *et al.,* 2015) e retardar o desenvolvimento motor (HOLSON & SACKETT, 1984). Similarmente, brincadeiras entre indivíduos estreitam os laços sociais destes no futuro, com consequências para a competência social de adultos (PALAGI, 2018). Dessa forma, comitês de ética têm endossado que animais de experimentação sejam mantidos em grupos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2010), e o confinamento em solitária de seres humanos foi considerado como tortura (ver SMITH, 2006). Em cenário mais recente, há ainda intenso debate sobre os efeitos da pandemia do novo coronavírus na ansiedade em adultos (MILMAN *et al.,* 2020) e no desenvolvimento social de crianças e adolescentes (GOLBERSTEIN *et al.,* 2020).

Diversas espécies de primatas são sociais e com rico repertório comportamental, de forma que os mamíferos são aqueles com comportamento social mais bem estudado. A socialidade dos primatas inicia-se nas primeiras semanas de vida, quando o cuidado com os filhotes pode ou não ser dividido entre outros membros do grupo, inclusive machos adultos (WRIGHT, 1990). Posteriormente, a socialidade durante o período entre a infância e a fase adulta, comumente chamado de juventude, também é fundamental, pois muito dos laços formados quando adultos são moldados durante essa transição, embora não haja muitos estudos a esse respeito (SANDEL *et al.,* 2020). Em geral, as fêmeas de primatas são filopátricas (permanecem no grupo natal mesmo quando adultas e reprodutivas), enquanto os machos são o sexo dispersor (SILK, 2009). Portanto, diversas espécies vivem em complexas sociedades matrilineares, de forma que fêmeas interagem mais umas com as outras do que com machos (STERCK *et al*., 1997). Já a relação entre machos, o enfoque da maioria dos estudos é na dominância e relações agonísticas entre eles (e.g. BERNSTEIN, 1976), embora haja relações cooperativas (PATZELT *et al.,* 2014).

A sociedade dos primatas emerge a partir de três elementos, sendo eles a organização social, a estrutura social e o sistema de acasalamento. A organização social diz respeito à

composição sexo-etária, onde se estabelece a razão sexual e a proporção de indivíduos adultos e jovens, e há uma miríade de combinações apresentada pelas espécies (CLUTTON-BROCK & HARVEY, 1977). Já estrutura social refere-se aos padrões comportamentais e relacionamentos, i.e., a frequência e a qualidade das interações sociais entre indivíduos (HINDE, 1983; KAPPELER, 1999; OKKO & JOHNSTONE, 1999; KAPPELER & VAN SCHAIK, 2002). Finalmente, o sistema de acasalamento compreende a quantidade de parceiros e a duração com que essas relações perduram, em um contínuo que varia entre monogâmico e promíscuo (WITTENBERGER & TILSON, 1980). A variação observada em primatas para esses três parâmetros têm sido foco de estudos há anos (e.g. CLUTTON-BROCK & HARVEY, 1977) e a ecologia alimentar e a inércia filogenética são as principais forças que ditam os padrões de sistema social entre os primatas.

Embora muito se fale sobre "padrões comportamentais" das espécies, há extensa literatura cujo foco é nas variações individuais (e.g. CARERE & MAESTRIPIEIRI, 2013). Características dos indivíduos têm consequências profundas para as interações sociais ao nível de grupo, assim como aspectos do ambiente social restringem e estimulam certos comportamentos individuais (RHODEWALT, 2008). A variação individual está bem consolidada inclusive em comportamentos críticos, como o cuidado materno (FAIRBANKS, 1996; BARDI & HUFFMAN, 2002). A forma com que as mães cuidam de sua prole resultam em distintas trajetórias de vida onde filhotes criados por mães protetoras são cautelosos e inseguros, ao passo que filhotes criados de maneira oposta são mais independentes e engenhosos (FAIRBANKS, 1996). Ainda assim, ambos os estilos maternos (denominados protetor/rejeitador) e ambas as personalidades/temperamentos dos filhotes (designados de tímidos – "shy" e ousado – "bold"), têm grande importância evolutiva (GOSLING, 2001), pois indivíduos ousados são mais facilmente predados, enquanto indivíduos tímidos podem não ser capazes de adquirir alimento em circunstâncias de redução de recursos (MATHER & LOGUE, 2013).

Outro aspecto interessante quanto ao comportamento social é o efeito de hormônios esteroides e proteicos. A exemplo das fêmeas, a função reprodutiva é regida principalmente pela progesterona e pelo estrogênio (DIZEREGA & HODGEN, 1981; SENGER, 2005), dois hormônios esteroides com profundos efeitos no comportamento, de modo que a interação entre fêmeas e machos flutue tanto quanto os hormônios (BONELLO *et al.*, 2004; STOCCO *et al.*, 2007). Já a ocitocina, um hormônio proteico, é chamada de "o grande facilitador da vida" dos

mamíferos, pois é primordial para a memória social, o apego, a expressão do comportamento materno, o estreitamento social e a agressão, todos comportamentos sociais (LEE *et al.,* 2009).

Embora nosso conhecimento esteja bem avançado com relação aos primatas Catarrhini (PC), também conhecidos como Primatas do Velho Mundo, estudos têm mostrado que os 35 milhões de anos (SCHNEIDER *et al.,* 1993) que separam estes e os primatas Platyrrhini (PP) geraram diferenças centrais entre estes e os do Novo Mundo. PP têm massa corporal menor, costumam viver em grupos pequenos, outros membros do grupo ajudam nos cuidados com o filhote, os indivíduos interagem menos, o dimorfismo sexual é menos pronunciado e fêmeas também podem migrar do grupo natal (LEE, 2004 e referências ali contidas). Devido a esses padrões, o conjunto de características ancestrais mais provável dos PP é de que fêmeas são o sexo dispersor e os machos são filopátricos e, portanto, mais aparentados.

Dentre os PP, os primatas Atelidae vivem em grandes grupos majoritariamente multimacho-multifêmea (SCHULTZ *et al.,* 2011) e essa família é notória por possuir padrões de agrupamento bastante flexíveis e com grande variação inter e intraespecífica (STRIER, 2004). Os representantes do gênero *Ateles* e *Brachyteles* exibem alto grau de dinâmica fissão-fusão e os subgrupos raramente se juntam para formar um grupo social maior. Além disso, o tipo de hábitat parece influenciar a dieta, o padrão de atividade e a formação dos subgrupos (e.g. SCHAFFNER *et al.,* 2012). Os sub-grupos de *Brachyteles* variam, em menor grau, em resposta à estação, à atividade e à composição desses grupos (COLES *et al.,* 2012). Já membros do gênero *Lagothrix* forrageiam em unidade, mas de forma espalhada, a tal ponto de que alguns autores erroneamente os consideravam como formação de subgrupos (ELLIS & DI FIORE, 2019). Finalmente, os bugios (*Alouatta* sp.) vivem em grupos coesos, porém apresentam a mais ampla distribuição geográfica de todos os primatas Neotropicais (CORTÉS-ORTIZ *et al*., 2003). Junto ao fato de ser um dos gêneros de primata Neotropical mais bem-estudados, ele é um excelente gênero para se estudar as variações e similaridades inter e intragenéricas (CROCKETT & EINSENBERG, 1987), bem como se estudar os diferentes efeitos da fragmentação da sua ecologia e comportamento (e.g. BICCA-MARQUES *et al.,* 2020).

Os bugios apresentam uma característica que os distinguem dos outros primatas. Por conta de uma distinta especialização laringeal – a hipertrofia do osso hióide –, forma-se uma câmara de ressonância (NAPIER & NAPIER, 1967) capaz de produzir um dos sons mais altos de todos os animais terrestres (DUNN *et al*., 2015). Ambos os sexos apresentam a hipertrofia do osso, porém há dimorfismo sexual no tamanho do hioide, bem como no tamanho do corpo, no canino e algumas espécies apresentam dicromatismo sexual (VAN BELLE & BICCA-

MARQUES, 2015). Entretanto, rugidos mais altos estão associados a um menor volume testicular (DUNN *et al.*, 2015) e testículos menores, por sua vez, são frequentemente associados a uma menor competição espermática (BIRKHEAD & MØLLER, 1998). Além disso, são um dos únicos primatas neotropicais a não formarem *plugs* copulatórios – um fracionado do esperma que se solidifica e impede novas cópulas (MORELAND *et al*., 2001), o que também é um indicativo de menor competitividade espermática.

Entretanto, uma menor competitividade espermática não se traduz em menos machos por grupo ou em fêmeas copulando com menos machos. Nas espécies em que mais de um macho convive com uma ou mais fêmeas, a agressão entre machos é quase nula (KOWALEWSKI & GARBER, 2014), e a definição de macho "dominante" (ou central) deriva de sua participação predominante nas sessões de vocalização e das maiores parcelas nas oportunidades de acasalamento, que lhes são exclusivas (fêmeas procuram os machos dominantes para cópula com mais frequência) ou monopolizadas (o macho posiciona-se próximo à fêmea fértil e inibe a aproximação de outros machos) (VAN BELLE *et al*., 2008; 2009).

Atualmente reconhece-se cerca de 12 espécies válidas no gênero *Alouatta* (Fig. 1), enquanto sub-espécies permanecem sob foco de discussão (CORTÉS-ORTIZ *et al.,* 2015). A exemplo da espécie *A. guariba*, há diferenças mitocondriais, genéticas e morfológicas, bem como a presença de barreira geográfica para as sub-espécies *A. guariba guariba* e *A. g. clamitans*. Contudo, há debate sobre a elevação das sub-espécies para o nível de espécie por conta dessas diferenças (GREGORIN, 2006), e classificação empregada na presente tese utiliza *A. clamitans* como espécie válida. Dentre as espécies que habitam o território brasileiro, o bugio-ruivo *Alouatta clamitans* (*sensu* GREGORIN, 2006, = *A. guariba clamitans sensu* RYLANDS *et al.,* 2000) é residente das regiões sudeste e sul. A cor ruiva característica dos machos adultos dá-se por conta de uma glândula que produz secreção avermelhada, possivelmente andrógeno-dependente (HIRANO *et al*., 2003).

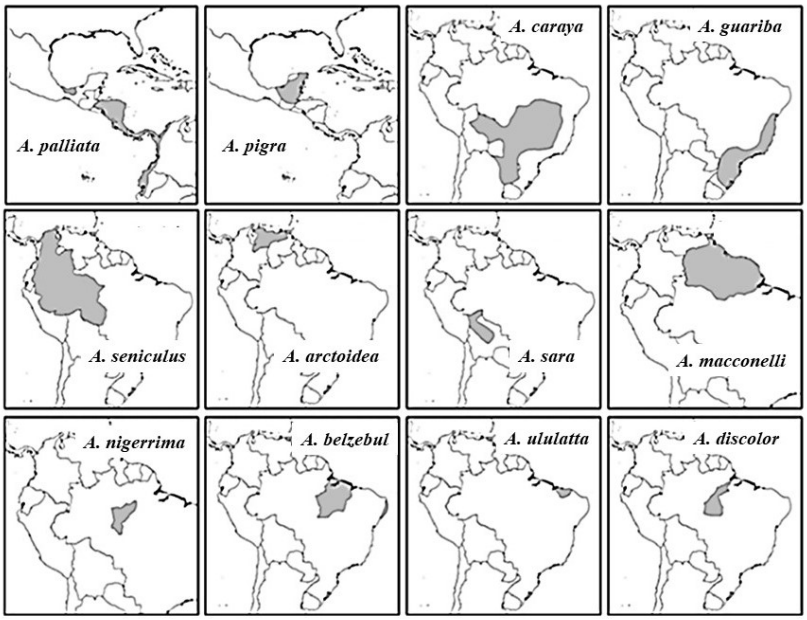


Figura 1: Distribuição geográfica de 12 espécies de *Alouatta*. Adaptado de: CORTÉS-ORTIZ *et al.* (2015).

Ressalta-se a importância de estudos relacionados à análise comportamental com essa espécie, pois, dentre os 100 trabalhos levantados (Figs. 2A, 2B e 2C), 17 foram sobre comportamento, sendo 10 deles observações oportunísticas (*e.g.* predação de ovos, BICCA-MARQUES *et al.,* 2009). Esta centena de trabalhos ocorreu em fragmentos florestais de variados tamanhos, porém apenas três foram realizados em fragmento de tamanho considerado grande segundo a classificação de RIBEIRO *et al.* (2009), possivelmente porque há poucos remanescentes naturais desta magnitude disponíveis para estudo (JANSON, 2000). Além disso, as pesquisas ocorreram mais frequentemente na região sul do Brasil (n=14). Dessa forma, é possível que o nosso conhecimento acerca do comportamento social e da história natural dos bugios-ruivos seja desviado pela natureza das circunstâncias e dos locais onde esses estudos foram conduzidos.

Devido a essa escassez, o objetivo geral da presente tese é investigar os desdobramentos para o comportamento social de grupos que vivem em um fragmento grande e contínuo. Recentemente, a espécie teve uma das piores taxas de mortalidade, causadas tanto pela febre amarela quanto por envenenamento (Revista Pesquisa FAPESP, 2018). Em alguns locais, houve redução de 85% da população (O Globo ES, 2019), de modo que essa espécie foi incluída como uma das 25 espécies de primata mais ameaçadas do mundo (BUSS *et al.,* 2019), caindo alguns níveis de conservação em dois anos (de LC para VU, JERUSALINSKY *et al.,* 2020). Há esforços correntes para a reintrodução dessa espécie em locais em que ela foi extinta, e

alguns deles têm sido bem-sucedidos (GENES *et al.,* 2019). Dessa forma, estudos visando aspectos sociais e ecológicos são essenciais para entender como as populações se mantêm na natureza e também podem auxiliar na recuperação frente a desastres ecológicos (ex. febre amarela). Em casos extremos, pode auxiliar no manejo adequado em cativeiro na eventualidade de surgirem programas de reprodução e reintrodução.

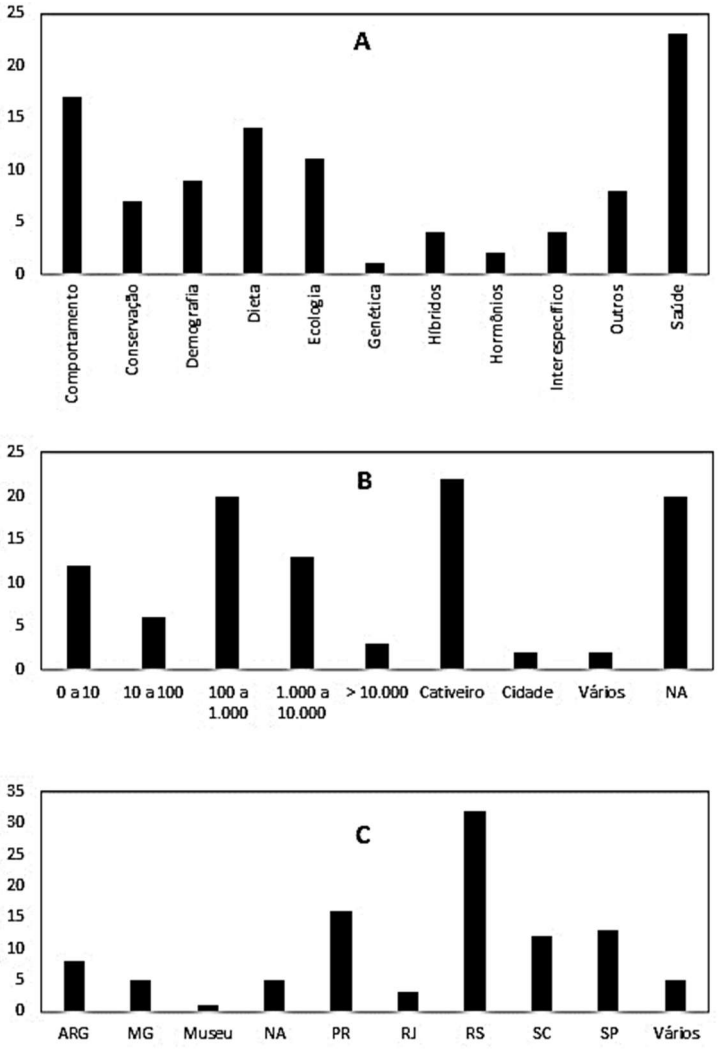


Figura 2: Relação dos 100 trabalhos (artigo publicados ou teses) encontrados na plataforma Google Acadêmico com as palavras-chave "Alouatta clamitans" (*sensu* GREGORIN, 2006) e "Alouatta guariba" (entre aspas). A busca incluiu a visualização até a última página disponível. A categorização do assunto foi feita com base em critérios pessoais apenas a título de ilustração. A: separação por assunto. B: separação por tamanho de fragmento. C: separação por localidade (ARG: Argentina, Museu: exemplares de museu sem referência ao local de coleta; as siglas dos Estados e vários: um estudo com várias localidades não informadas). Não foi incluída a nomenclatura antiga "Alouatta fusca".

IMPORTÂNCIA DA ÁREA DE ESTUDO

A presente tese foi realizada no Parque Estadual Carlos Botelho (PECB), núcleo São Miguel Arcanjo, São Paulo. O PECB apresenta uma área total de aproximadamente 38.000 hectares, incluída em uma área ainda maior, o Contínuo Ecológico da Serra de Paranapiacaba, com cerca de 250.000 ha. Devido a este tamanho, é considerado um dos maiores fragmentos de Mata Atlântica do mundo (PISCIOTTA, 2002; RIBEIRO *et al.,* 2009, Fig. 3). De acordo com o estudo de RIBEIRO *et al.* (2009), 97% dos remanescentes de Mata Atlântica são menores que 250 hectares e apenas 0,03% são maiores que 10.000 ha. Além disso, há vários remanescentes com mata secundária ou perturbada. Ainda de acordo com os autores, mesmo que matas secundárias sejam relevantes em abrigar biodiversidade, há espécies que necessitam de áreas grandes e pristinas de floresta. Nesse sentido, mesmo espécies que sabidamente são resilientes à antropização e alteração do ambiente, como os bugios, não sabemos exatamente como é sua ecologia e seu comportamento social em fragmentos grandes.

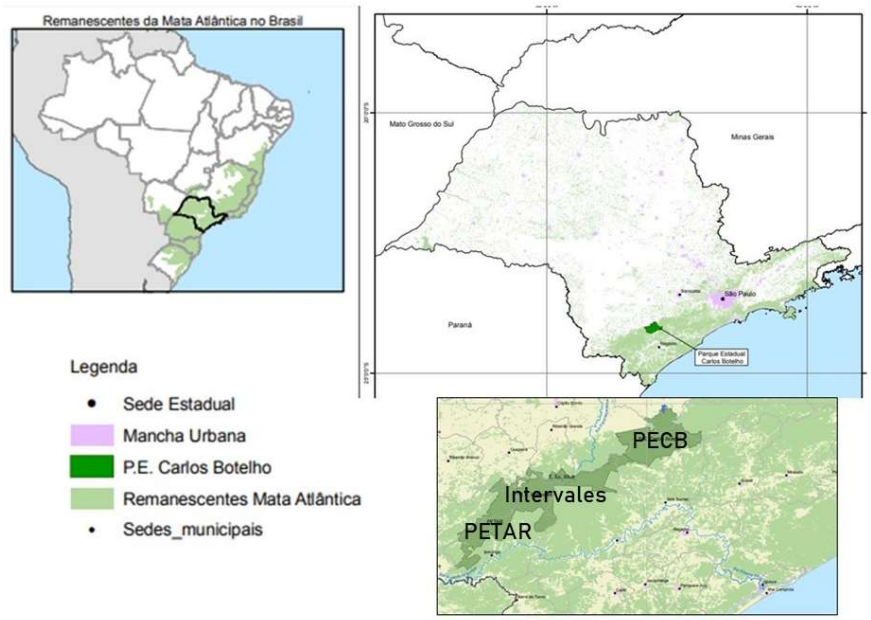


Figura 3: Mapa indicando a localização do PECB dentro do Brasil, do estado de São Paulo e do Contínuo Ecológico da Serra de Paranapiacaba. Adaptado de: PLANO DE MANEJO (2015).

As chuvas são distribuídas em períodos de maior pluviosidade no verão, alternando-se com períodos de menor pluviosidade no inverno, embora sem período de seca propriamente dita (PLANO DE MANEJO, 2015). Durante o período de estudo (novembro de 2017 e dezembro de 2018), o índice de pluviosidade total foi 1440 mm, sendo os meses de dezembro a março os mais chuvosos. A temperatura média anual variou entre 15 °C no inverno e 24 °C

no verão, com a mais baixa temperatura (1,8 °C) detectada em julho e a mais alta (35°C) em dezembro (dados INMET). A altitude da região varia entre 700 e 850 m anm, com toda a área de estudo montanhosa, apresentando Vegetação Ombrófila Densa Montana e Alto Montana (PLANO DE MANEJO, 2015).

OS GRUPOS DE BUGIO

Nos arredores da sede (até 3 km para dentro da mata), encontrou-se seis grupos de bugios. Três deles (G5, G6 e G7) foram acompanhados pontualmente, onde se anotou a localização geográfica por GPS e a composição sexo-etária dos grupos. Os demais (G1, G3 e G4) foram seguidos com mais assiduidade (Fig. 4). O Grupo 1 (G1) vivia em área em que metade era mata primária e metade secundária, e o contato com humanos era mediano, pois pesquisadores e turistas tinham acesso às trilhas que cruzavam sua área de vida. Um agravante foi a pouca habituação de três indivíduos à presença humana, alterando completamente a interação social do grupo enquanto na presença de observadores e, portanto, as observações comportamentais para esse grupo não foram incluídas na presente tese.

O Grupo 3 (G3) vivia em uma área composta quase exclusivamente por mata secundária e metade de sua área de vida era região de borda. O excesso de lianas, característica de matas secundárias (GEHRING *et al*., 2004), dificultou a observação em diversos momentos. Vizinho ao G3 estava a sede do parque, onde havia, portanto, contato diário com seres humanos. Além disso, esses animais frequentemente eram expostos a ruídos antrópicos (e.g. serralheria, buzina, etc.) e luz artificial. Esse era o grupo mais habituado de todos.

Por fim, o Grupo 4 (G4) encontrava-se imerso exclusivamente em mata primária, onde o contato com seres humanos era apenas com pesquisadores (o acesso era proibido para turistas). Apesar disso, a habituação dos animais era adequada desde o início do acompanhamento, permitindo aproximação de até 15m. A visibilidade era dificultada pela altura das árvores dessa região, que podiam chegar a 40m de altura (calculado com hipsômetro Nikon Laser Forestry Pro).

O projeto não dispunha de radiocolar e a busca pelos animais se seguia pelo método de busca ativa. Portanto, nem sempre os grupos eram encontrados, de forma que, apesar de um total de 273 dias em campo, o total de dias de coleta foi 120. A maior parte das campanhas incluíam ao menos duas pessoas, porém os dados aqui contidos foram coletados por apenas um observador. Os grupos G3 e G4 foram acompanhados mensalmente entre novembro de 2017 e dezembro 2018, e trimestralmente em 2019 (março, junho e setembro). Durante o ano de 2019

não houve coleta de dados comportamentais, apenas monitoramento (composição sexo-etária e localização) destes dois grupos. O etograma utilizado na tese foi um adaptado de NEVILLE *et al.* (1988), disposto na Tabela 1.

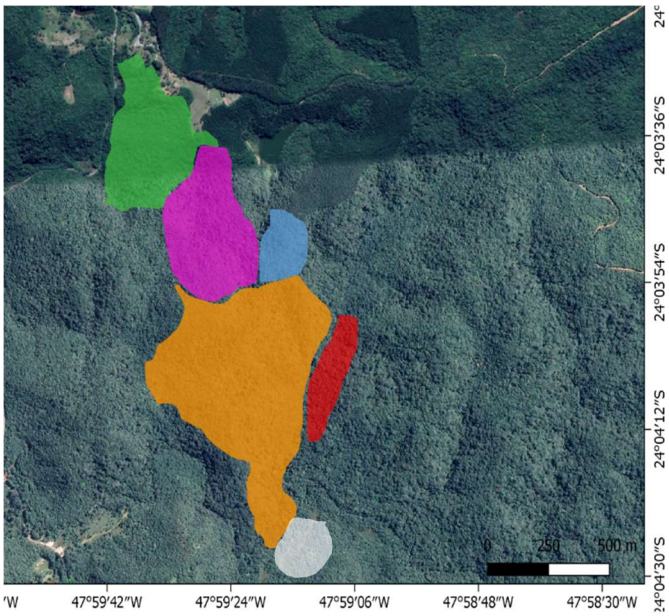


Figura 4: Representação gráfica dos territórios dos seis grupos vizinhos conhecidos na região. Apenas os territórios em verde (G3) e em laranja (G4) foram estimados. Os demais polígonos (rosa, azul, vermelho e branco) servem apenas para representação gráfica.

ORGANIZAÇÃO DA TESE

A organização da presente tese seguirá uma ordem do macro ao micro dos desdobramentos do tamanho do fragmento para o comportamento sistema social de bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*), da seguinte forma: no **Capítulo I** serão abordados os parâmetros ecológicos dos grupos de bugios estudados, como o orçamento de atividades, a dieta e o percurso diário, e o teste de possíveis influências abióticas e bióticas no percurso diário pela análise de caminhos. Já o **Capítulo II** abordará a composição dos grupos e a estrutura social destes pela análise de redes sociais, bem relacionará a redes sociais com as mudanças demográficas ocorridas para os grupos ao longo do período de estudo. O **Capítulo III** irá apresentar e detectar as diferenças individuais nas raras interações entre mães e seus filhotes. Finalmente, o **Capítulo IV** apresentará a influência hormonal sob a perspectiva de uma revisão bibliográfica, onde os métodos inovadores de ensaios hormonais realizados a partir de amostras de animais de vida livre proverão perspectivas futuras para as dosagens.

Tabela 1: Relação dos comportamentos anotados pelo método de todas as ocorrências. Etograma adaptado de NEVILLE *et al*. (1988). Asteriscos indicam comportamentos não descritos na literatura, ou não sinonimizados com outro comportamento já descrito para o gênero.

Comportamento	Descrição
Rejeitar Interação	Quando um indivíduo rejeita alguma das interações abaixo. Os comportamentos típicos de rejeição incluem: ignorar; morder; virar de costas; afastar-se; mostrar dentes; empurrar.
Amamentar	Sempre que o filhote estivesse na posição axial, foi considerado que ele estava em contato com o mamilo e sendo amamentado. Entretanto, contato com mamilo não significa necessariamente transferência de leite (designado como *pacifier*, CAMERON, 1998).
Apresentação das genitais	Mostrar o quarto traseiro para o receptor ao posicionar-se com os quatros traseiros – levantados ou não – na frente do receptor. No caso de ser uma fêmea para um macho, foi considerado um convite para a cópula (ver abaixo).
Alolactação	Mesmo de amamentar, porém com filhote que não o da emissora.
Auto-catação	Quando um indivíduo cata a si mesmo (mãos, cauda, flancos), desconsiderando-se coçar.
Balançar galho	Movendo-se erraticamente, agarrando e balançando galhos.
Beber Água	O indivíduo direciona a face para o local com água.
Boca-a-boca*	Dois indivíduos frente a frente, de boca aberta tocam seus lábios abertos e colocam a língua para dentro e para fora, ritmicamente.
Brincadeira social	Quando dois ou mais indivíduos envolviam-se em sessões de brincadeira, i.e., movimentos exagerados e erráticos, geralmente enquanto o grupo estava descansando. As brincadeiras incluíram lutas, mordidas, beliscões, perseguições e/ou jogar-se dos galhos. Distinções do tipo de brincadeira não foram feitas.
Carregar dorsalmente	Quando um indivíduo se desloca e carrega um filhote nas costas.
Carregar ventralmente	Quando um indivíduo se desloca e carrega um filhote na posição ventral.
Catação	Emissor passa as mãos ou ponta dos dedos no pelo do receptor uma ou diversas vezes, e acompanhado ou não do uso da boca.
Cheirar marca	Emissor cheira a marca deixada por outro indivíduo anteriormente.
Convite para cópula	Fêmea permanece deitada no tronco e próxima ao macho, com barriga encostada no tranco e pernas e braços para baixo e olha para trás. Pode vir acompanhado de movimentos pélvicos na direção da face do macho.
Cópula	Macho monta a fêmea completamente (mãos nos ombros dela, na cintura ou ancorado em galho próximo, pés agarrados nos calcanhares dela ou apoiados em galho). Não necessariamente envolvia ejaculação, uma vez que não foi possível determinar sua ocorrência.

Costas arqueadas*	Andar com as costas arqueadas e cauda entre as pernas, geralmente em ritmo acelerado e em direção ao receptor.
Dar tapa	Emissor dá um tapa no receptor na cabeça, no ombro ou na cauda. Pode ocorrer durante brincadeira.
Dardejar de língua	Movimentos da língua rítmicos para dentro e para fora da boca (=*tongue-flicking*). Não exclusivo de contexto sexual
Descanso	Indivíduo imóvel e de olhos fechados.
Esfregar costas	Posição bipedal ou quando deitado de costas, o animal esfrega as costas, movimentando-se lateralmente contra substrato (marcação).
Esfregar garganta	Esfrega a região da garganta e queixo repetidamente em substrato (marcação).
Esfregar região anogenital	Sentado, com os pés e mãos no galho, o emissor esfrega a região anogenital para frente e para trás contra um substrato. Pode ocorrer após defecação (marcação)
Forrageio	Mais de 50% do grupo manipula, explora e/ou escolhe alimentos, levando determinado item até a boca. Anotou-se o recurso consumido (folha, fruta, flor, goma, etc).
Inspecionar Filhote	Emissor inspeciona filhote (receptor) levantando a cauda ou outro membro do corpo. Diferencia-se de catação por não incluir movimentos de passar os dedos pela pelagem ou utilizar a boca.
Inspecionar Genitais	Emissor se aproxima do receptor e inspeciona as genitais com as mãos, com a língua ou nariz. Pode ocorrer durante contexto de excitação sexual ou não, como em casos de catação, por exemplo.
Interação Interespecífica	Identificou-se a espécie, o número, o sexo e a idade dos indivíduos (se possível). Anotou-se a duração da interação e o comportamento de ambas as espécies ou determinados indivíduos.
Investida	Emissor caminha rapidamente com velocidade crescente em direção ao receptor, envolvendo um ou mais botes. Geralmente não envolve contato físico.
Juntar-se à brincadeira social	Quando um outro indivíduo se junta a uma brincadeira já iniciada.
Latrina	Mais de dois indivíduos defecam e/ou urinam simultaneamente e próximos uns aos outros.
Locomover	Mais de 50% do grupo se desloca de ponto a outro, com direção pré-determinada.
Morder	Emissor morte receptor, brevemente (mordiscada) ou mais agressivamente.
Mostrar dentes	Enquanto levanta o queixo, emissor está com o canto da boca retraído para trás e os lábios ligeiramente abertos e dentes à mostra. Não envolve mordida.
Negar amamentação	Filhote (receptor) tenta colocar o mamilo na boca, porém fêmea (emissor) restringe ativamente o acesso à teta com o braço, bloqueando e/ou mordendo o filhote, ou afastando-se. Anotou-se a resposta do filhote (*e.g.* emitir som, morder galho).
*Overmarking**	Emissor marca no exato lugar em que outro indivíduo deixou sua marca anteriormente.

Passar por baixo	Emissor evita o receptor, passando por baixo, geralmente quando o receptor está no caminho do emissor.
Passar por cima	Emissor caminha por cima do receptor, com os pés no substrato e sem contato corporal, geralmente quando o receptor está no caminho do emissor.
Pênis ereto*	Quando um macho apresentava claramente o pênis ereto, não havendo necessariamente contexto sexual.
Perseguir	Perseguição rápida e de trajetória errática e de longa duração. Não necessariamente alcança o receptor, porém o afasta do local. A duração é mais longa que a investida. Pode ocorrer durante brincadeira.
Ponte	Emissor liga um galho a outro com o corpo para que o filhote passe por cima e tenha acesso ao galho adiante.
Restringir*	Quando um indivíduo restringe a movimentação do filhote ou o impede de romper contato, trazendo-o para o ventre, em um formato de "bola" com o corpo.
Restringir acesso ao filhote*	Quando um indivíduo restringe a aproximação/acesso de outro membro do grupo ao filhote. Dentre as restrições, inclui-se segurar as mãos, bloquear com o corpo ou carregar o filhote para longe.
Sentar-se em cima	Emissor imobiliza o receptor sentando-se em cima dele.
Solicitar Catação	Quando o indivíduo que deseja ser catado (emissor) aproxima-se do catador (receptor), permanecendo imóvel. O emissor abaixa a parte anterior do corpo enquanto a parte posterior permanece levantada, inclinando-se ao receptor e expondo a nuca, axilas, virilhas ou outra parte do corpo. Outra forma foi se posicionar com barriga para cima, expondo uma parte do corpo a ser catada.
Suplantar	Quando o emissor se dirige para o exato local onde o receptor se encontrava e o desaloja.
Toque	Quando o emissor encosta no receptor com as mãos ou ponta dos dedos por um período muito breve (menos de 3 segundos). Não necessariamente seguido de catação.
Vocalizar	Anotou-se qual a vocalização emitida (*e.g.* incômodo, perdido etc.) e, se possível, a identidade do emissor. No caso das sessões de rugido, anotou-se quem iniciou, quem se juntou ao coro e quando o coro foi encerrado (com fim há menos de um minuto; há menos de cinco minutos ou há mais de cinco minutos). Anotou-se também as vocalizações emitidas por outros grupos, sua duração, e a resposta do grupo que estava sendo seguido. Vocalização resposta foram definidas como ocorrendo em até 10 minutos após o término da vocalização de outro grupo.

REFERÊNCIAS

BARDI M & HUFFMAN MA. 2002. Effects of maternal style on infant behavior in Japanese macaques (*Macaca fuscata*). Developmental Psychobiology, 41(4), 364-372.

BERNSTEIN IS. 1976. Dominance, aggression and reproduction in primate societies. Journal of Theoretical Biology, 60(2), 459-472.

BICCA-MARQUES JC, MUHLE CB, PRATES HM, DE OLIVEIRA SG & CALEGARO-MARQUES C. 2009. Habitat impoverishment and egg predation by *Alouatta caraya*. International Journal of Primatology, 30(5), 743-748.

BIRKHEAD TR & MØLLER AP. 1998. Sperm Competition and Sexual Selection (Academic Press).

BONELLO N, JASPER MJ & NORMAN RJ. 2004. Periovulatory expression of intercellular adhesion molecule-1 in the rat ovary. Biology of Reproduction, 71, 1384–1390.

BUSS G, OKLANDER LI, BICCA MARQUES JC, HIRANO ZB, CHAVES OM, MENDES SL et al. 2019. Brown howler monkey: *Alouatta guariba* Humboldt, 1812. *In* Primates in Peril. The world's 25 most endangered primates 2018-2020 (SCHWITZER C, MITTERMEIER RA, RYLANDS AB, CHIOZZA F, WILLIAMSON EA, BYLER D, WICH S, HUMLE T, JOHNSON C, MYNOTT H AND MCCABE G, eds.).

CAMERON EZ. 1998. Is suckling behaviour a useful predictor of milk intake? A review. Animal Behaviour, 56(3), 521-532.

CARERE C & MAESTRIPIERI D (Eds.). 2013. Animal Personalities: Behavior, Physiology, and Evolution. The University of Chicago Press, Chicago and London, USA.

CLUTTON-BROCK TH & HARVEY PH. 1977. Primate ecology and social organization. Journal of Zoology, 183(1), 1-39.

CORTÉS-ORTIZ L, BERMINGHAM E, RICO C, RODRIGUEZ-LUNA E, SAMPAIO I & RUIZ-GARCIA M. 2003. Molecular systematics and biogeography of the Neotropical monkey genus, *Alouatta*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 26(1), 64-81.

CORTÉS-ORTIZ L, RYLANDS AB & MITTERMEIER RA. 2015. The taxonomy of howler monkeys: integrating old and new knowledge from morphological and genetic studies, p55-84. *In* Howler Monkeys: Adaptive Radiation, Systematics, and Morphology (KOWALEWSKI MM, GARBER PA, CORTÉS-ORTIZ L, URBANI B & YOULATOS D, eds.). Springer, New York, EUA.

CROCKETT CM & EISENBERG JF. 1987. Howlers: variations in group size and demography. Primate Societies, 54-68.

DIZEREGA GS & HODGEN GD. 1981. Folliculogenesis in the primate ovarian cycle. Endocrine Reviews, 2(1), 27-49.

DUNN JC, HALENAR LB, DAVIES TG, CRISTOBAL-AZKARATE J, REBY D, SYKES D, SABINE DENGG, FITCH WT, & KNAPP LA. 2015. Evolutionary trade-off between vocal tract and testes dimensions in howler monkeys. Current Biology, 25(21), 2839-2844.

ELLIS K & DI FIORE A. 2019. Variation in space use and social cohesion within and between four groups of woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha poeppigii*) in relation to fruit availability and mating opportunities at the Tiputini Biodiversity Station, Ecuador, p141-171. *In* Movement ecology of Neotropical forest mammals: focus on social animals (REYNA-HURTADO R & CHAPMAN CA, eds.). Springer, Cham.

FAIRBANKS LA. 1996. Individual differences in maternal style: causes and consequences for mothers and offspring, p579-611. *In* Advances in the Study of Behavior (Vol. 25). Academic Press.

FORTES VB. 2008. Ecologia e comportamento do bugio-ruivo (*Alouatta guariba clamitans* Cabrera, 1940) em fragmentos florestais na Depressão Central do Rio Grande do Sul, Brasil.

GEHRING C, PARK S & DENICH M. 2004. Liana allometric biomass equations for Amazonian primary and secondary forest. Forest Ecology and Management, 195(1-2), 69-83.

GENES L, FERNANDEZ FA, VAZ-DE-MELLO FZ, DA ROSA P, FERNANDEZ E & PIRES AS. 2019. Effects of howler monkey reintroduction on ecological interactions and processes. Conservation Biology, *33*(1), 88-98.

GLOBO ES, O. 2019. https://g1.globo.com/es/espirito-santo/noticia/2019/06/29/dois-anos-apos-surto-de-febre-amarela-pesquisa-estima-que-populacao-de-macacos-caiu-pela-metade-no-es.ghtml

GOLBERSTEIN E, WEN H & MILLER BF. 2020. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) and mental health for children and adolescents. *JAMA pediatrics*.

GOSLING SD. 2001. From mice to men: what can we learn about personality from animal research? Psychological Bulletin, 127, 45–86.

GREGORIN R. 2006. Taxonomia e variação geográfica das espécies do gênero *Alouatta* Lacépède (Primates, Atelidae) no Brasil. Revista Brasileira de Zoologia, 23(1), 64-144.

HALL FS. 1998. Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. Critical Reviews in Neurobiology, 12, 1-2.

HINDE RA. 1983. Primate Social Relationships. Blackwell, London.

HIRANO ZMB, TRAMONTE R, SILVA ARM, RODRIGUES RB & SANTOS WD. 2003. Morphology of epidermal glands responsible for the release of colored secretions in *Alouatta guariba clamitans*. Laboratory Primate Newsletter, 42(2), 4-7.

HOLSON R & SACKETT GP. 1984. Effects of isolation rearing on learning by mammals. Psychology of Learning and Motivation, 18, 199-254.

JANSON CH. 2000. Primate socio-ecology: The end of a golden age. Evolutionary Anthropology, 9, 73–86.

JERUSALINSKY L, CORTES-ORTÍZ L, DE MELO FR, MIRANDA J, ALONSO AC, BUSS G *et al*. 2020. *Alouatta guariba*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T39916A17926390.

KAPPELER PM & VAN SCHAIK CP. 2002. Evolution of primate social systems. International Journal of Primatology, 23, 707-740.

KAPPELER PM. 1999. Primate socioecology: new insights from males. Naturwissenschaften, 86(1), 18-29.

KOWALEWSKI M & GARBER PA. 2014. Solving the collective action problem during intergroup encounters: the case of black and gold howler monkeys, p165-191. In Howler Monkeys: Behaviour, Ecology and Conservation (KOWALEWSKI MM, GARBER PA, CORTÉS-ORTIZ L, URBANI B & YOULATOS D, eds.). Springer, New York.

LEE PC. (Ed.). 2004. Comparative primate socioecology Vol. 22. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

LEE HJ, MACBETH AH, PAGANI JH & YOUNG WS. 2009. Oxytocin: the great facilitator of life. Progress in Neurobiology, 88, 127-151.

MASON, W. A. 1960. The effects of social restriction on the behavior of rhesus monkeys: I. Free social behavior. Journal of Comparative and Physiological Psychology, 53, 582-589.

MATHER JA & LOGUE DM. 2013. The bold and the spineless: invertebrate personalities, p13-35. *In* Animal personalities: behavior, physiology, and evolution (CARERE C & MAESTRIPIERI D, eds.). The University of Chicago Press, Chicago and London, USA.

MILMAN E, LEE SA & NEIMEYER RA. 2020. Social isolation and the mitigation of coronavirus anxiety: The mediating role of meaning. Death Studies, 1-13.

MIRANDA JM, BERNARDI IP, MORO-RIOS RF, AGUIAR LM, LUDWIG G & PASSOS FC. 2004. Social structure of *Alouatta guariba clamitans*: a group with a dominant female. Neotropical Primates, 12(3), 135-138.

MORELAND RB, RICHARDSON ME, LAMBERSKI N & LONG JA. 2001. Characterizing the reproductive physiology of the male southern black howler monkey, *Alouatta caraya*. Journal of Andrology, 22, 395–403.

NAPIER JR & NAPIER PH. 1967. A handbook of the living primates. London Academic Press.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2010. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academies Press.

NEVILLE MK, GLANDER KE, BRAZA F & RYLANDS AB. 1988. The howling monkeys, genus Alouatta. In Ecology and behavior of Neotropical primates vol. 2

(MITTERMEIER RA, RYLANDS AB, COIMBRA-FILHO AF & FONSECA GAB, eds.). World Wildlife Fund, Washington.

OKKO H & JOHNSTONE RA. 1999. Social queuing in animal societies: a dynamic model of reproductive skew. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 266, 571-578.

PALAGI E. 2018. Not just for fun! Social play as a springboard for adult social competence in human and non-human primates. Behavioral Ecology and Sociobiology, 72(6), 1-14.

PARIKH TP, STOLZE B, OZARDA Y, JONKLAAS J, WELSH K, MASIKA L, HILL M, DECHERNEY A & SOLDIN SJ. 2018. Diurnal variation of steroid hormones and their reference intervals using mass spectrometric analysis. Endocrine connections, 7(12), 1354-1361.

PATZELT A, KOPP GH, NDAO I, KALBITZER U, ZINNER D & FISCHER J. 2014. Male tolerance and male–male bonds in a multilevel primate society. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(41), 14740-14745.

PISCIOTTA, K. 2002. The Paranapiacaba forest fragment. *In* Censuses of vertebrates in a Brazilian Atlantic rainforest area: The Paranapiacaba fragment (MATEOS E, GUIX JC, SERRA A & PISCIOTTA K, eds.). Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

PITTET F, LE BOT O, HOUDELIER C, RICHARD-YRIS MA & LUMINEAU S. 2014. Motherless quail mothers display impaired maternal behavior and produce more fearful and less socially motivated offspring. Developmental Psychobiology, 56(4), 622-634.

PLANO DE MANEJO, 2015. Título: Plano de Manejo Parque Estadual Carlos Botelho. Unidades de Terreno do Parque. Disponível em < http://observatorio.wwf.org.br/site_media/upload/gestao/planoManejo/PM_PECarlosBotelho_parte_002.pdf> . Último acesso em agosto de 2020.

Revista Pesquisa FAPESP, 2018. O Alarme dos Macacos. Edição 263. São Paulo, SP.

RHODEWALT F (ed.). 2008. Personality and Social Behavior. Psychology Press: Taylor & Francis Group. NY, Londres, UK.

RIBEIRO MC, METZGER JP, MARTENSEN AC, PONZONI FJ & HIROTA MM. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. Biological conservation, 142(6), 1141-1153.

RYLANDS AB, SCHNEIDER H, LANGGUTH A, MITTERMEIER RA, GROVES CP & RODRÍGUEZ-LUNA E. 2000. An assessment of the diversity of New World primates. Neotropical Primates 8: 61–93

SANDEL AA, LANGERGRABER KE & MITANI JC. 2020. Adolescent male chimpanzees (*Pan troglodytes*) form social bonds with their brothers and others during the transition to adulthood. American Journal of Primatology, 82(1), e23091.

SCHAFFNER CM, REBECCHINI L, RAMOS-FERNANDEZ G, VICK LG & AURELI F. 2012. Spider monkeys (*Ateles geoffroyi yucatenensis*) cope with the negative consequences of hurricanes through changes in diet, activity budget, and fission–fusion dynamics. International Journal of Primatology, 33(4), 922-936.

SCHNEIDER H, SCHNEIDER MPC, SAMPAIO I, HARADA ML, STANHOPE M, CZELUSNIAK J & GOODMAN M. 1993. Molecular phylogeny of the New World monkeys (Platyrrhini, Primates). Molecular Phylogenetics and Evolution 2, 225-242.

SHULTZ S, OPIE C & ATKINSON QD. 2011. Stepwise evolution of stable sociality in primates. Nature, 479, 219–222.

SENGER PL. (ed) 2005. Pathways to pregnancy and parturition. Pullman: Current Conceptions.

SHAMS S, CHATTERJEE D & GERLAI R. 2015. Chronic social isolation affects thigmotaxis and whole-brain serotonin levels in adult zebrafish. Behavioural Brain Research, 292, 283-287.

SILK JB. 2009. Nepotistic cooperation in non-human primate groups. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 364(1533), 3243–3254.

SIMPSON EA, MILLER GM, FERRARI PF, SUOMI SJ & PAUKNER A. 2016. Neonatal imitation and early social experience predict gaze following abilities in infant monkeys. Scientific Reports, 6, 20233.

SMITH PS. 2006. The effects of solitary confinement on prison inmates: A brief history and review of the literature. Crime and Justice, 34(1), 441-528.

STEINMETZ S. 2005. Vocalizações de longo alcance como comunicação intra-grupal nos bugios (*Alouatta guariba*). Neotropical Primates, 13, 11–15.

STERCK EH, WATTS DP & VAN SCHAIK CP. 1997. The evolution of female social relationships in nonhuman primates. Behavioral Ecology and Sociobiology, 41(5), 291-309.

STOCCO C, TELLERIA C & GIBORI G. 2007. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. Endocrine Reviews, 28, 117–149.

STRIER KB. 2004. Why is female kin bonding so rare? Comparative sociality of neotropical primates, p300-319. In Comparative primate socioecology Vol. 22 (LEE PC., ed.). Cambridge University Press, Cambridge, UK.

VAN BELLE S & BICCA-MARQUES JC. 2015. Insights into reproductive strategies and sexual selection in howler monkeys, p57-84. *In* Howler Monkeys: Adaptive radiation, systematics, and morphology (KOWALEWSKI, MM, GARBER PA, CORTÉS-ORTIZ L, URBANI B & YOULATOS D, eds). Springer, New York, USA.

VAN BELLE S, ESTRADA A & STRIER KB. 2008. Social relationships among male *Alouatta pigra*. International Journal of Primatology, 29, 1481–1498.

VAN BELLE S, ESTRADA A, ZIEGLER TE & STRIER KB. 2009. Social and hormonal mechanisms underlying male reproductive strategies in black howler monkeys (*Alouatta pigra*). Hormones and Behavior, 56, 355–363.

WITTENBERGER JF & TILSON RL. 1980. The evolution of monogamy: hypotheses and evidence. Annual Review of Ecology and Systematics, 11(1), 197-232.

WRIGHT PC. 1990. Patterns of paternal care in primates. International Journal of Primatology, 11(2), 89-102.

CAPÍTULO I

NADA PERTURBA A PAZ DOS BUGIOS: USO DO TEMPO E DO ESPAÇO POR UM PRIMATA FOLÍVORO NEOTROPICAL

RESUMO

O percurso diário é utilizado para entender como os primatas navegam e exploram o ambiente em que vivem. Em geral, espécies folívoras, como os bugios, apresentam estabilidade nesse e em outros ecológicos, tais como área de vida, orçamento de atividades e dieta. Estudos recentes têm mostrado que o tamanho do fragmento pode ser um importante fator alterador desses parâmetros. Portanto, o objetivo do presente trabalho é apresentar tais parâmetros para bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*) em um fragmento florestal grande e conectado, bem como testar a influência de variáveis ecológicas (descritas acima) e climatológicas (estação do ano, temperatura e pluviosidade) no percurso diário por meio da análise de caminhos. Dois grupos foram acompanhados entre 2017 e 2019, com registro dos seguintes parâmetros: orçamento de atividades, dieta, percurso diário, área de vida e encontros com competidores (inter e intraespecíficos). Os resultados mostraram que os bugios dispenderam 53,3% do seu tempo para o descanso, seguido pelo forrageio (22,5%) e deslocamento (13,7%). As áreas de vida totais variaram amplamente entre os grupos (18,4 ha para o G3 e 43,8 ha para o G4, 95% Kernel) e entre os meses, sem sobreposição entre grupos vizinhos. O percurso diário apresentou diferença entre os grupos (665 m para G3 e 779 m para G4) e a variação observada foi explicada apenas pelo percentual de folhas ingeridas e pelo grupo. Os encontros com competidores foram menos frequentes que o detectado em outros estudos, ocorrendo principalmente durante a estação chuvosa. A dieta foi majoritariamente folívora (39,5%) no geral e no inverno (49,5%), porém predominantemente frugívora no verão (34,7%). Os resultados dos parâmetros analisados foram semelhantes aos de outras espécies do gênero em fragmentos pequenos e também outros gêneros folívoros. No entanto, detectamos diferenças notáveis com relação à competitividade, sendo menor nesse fragmento grande, representada tanto pela ausência de sobreposição de áreas de vida quanto pelos encontros intergrupo, competição intragrupo e competição interespecífica. Dessa forma, o presente estudo confirma que o tamanho do fragmento não se traduz em parâmetros ecológicos diferenciados, apenas em uma menor competitividade. A competição direta pode acarretar o comprometimento da saúde dos indivíduos, além de potencialmente diminuir a aptidão e a fertilidade futuras.

Palavras-chave: área de vida; orçamento de atividades; percurso diário; dieta; fragmentação

INTRODUÇÃO

Os primatas interagem com o seu ambiente de forma complexa, expressando-se em uma diversidade de uso espaço-temporal da paisagem. A forma com que indivíduos transitam pelo ambiente resulta de um conjunto de parâmetros ecológicos, tais como o habitat, a dieta, o orçamento de atividades (i.e., tempo relativo dedicado a cada atividade), o tamanho de grupo, o padrão de dispersão e a área de vida (CROOK & GARTLAN, 1966; CLUTTON-BROCK & HARVEY, 1977). Esses parâmetros refletem sua habilidade de explorar recursos, com impactos diretos na sobrevivência e no sucesso reprodutivo (WILLIAMS, 1966; SMULDERS *et al.,* 2010).

Considerando-se que o deslocamento e a exploração do ambiente requerem energia, então é possível que o aporte energético obtido pela alimentação reflita as diferenças encontradas no hábito alimentar dos primatas. Folhas são tidas como um recurso de baixo valor energético, porém altamente disponível e abundante (SNAITH & CHAPMAN, 2007). Primatas folívoros são associados a uma baixa competitividade e diversas espécies apresentam estabilidade ao longo do ano em seus deslocamentos diários por comida (SNAITH & CHAPMAN, 2007 e as referências ali contidas). Contrariamente, frutas são consideradas recursos de alto valor energético e distribuídas heterogeneamente pelo ambiente e também ao longo do ano, com estações de frutificação (STRIER, 1989; CHAPMAN, 1990; CHAPMAN *et al.,* 1995; CAILLAUD *et al.,* 2010). Gêneros de primata frugívoros, especialmente se em grupos grandes, viajam grandes distâncias para encontrar este recurso (MAJOLO *et al.,* 2008). Ainda nessa dicotomia, animais folívoros competem menos intra e interespecífica/grupalmente por recurso, enquanto animais frugívoros apresentam maiores taxas de competição (ISBELL, 1991).

Contudo não existe consenso com relação às premissas acima. Ainda de acordo com o estudo de MAJOLO e colaboradores (2008), tanto primatas folívoros quanto frugívoros viajavam grandes distâncias e passavam mais tempo se alimentando quando em grupos grandes. Grupos maiores, apesar de aumentar a competição por alimento, também se beneficiam de ter vários indivíduos envolvidos na busca por fontes alimentares (ZUBERBÜHLER & JANMAAT, 2010). Além disso, há diferenças energéticas com relação às folhas (brotos *versus* jovens *versus* maduras) ao ponto de algumas espécies de primatas preferirem folhas jovens e partes macias visto que são de mais fácil digestão ou ricas em proteína (e.g. MATSUDA *et al.,* 2017); outras espécies podem complementar sua dieta com flores e sementes e há aquelas, ainda, que podem apresentar flexibilidade

alimentar dependendo da disponibilidade de recurso no ambiente (KOENIG *et al.,* 1998; CHAPMAN & CHAPMAN, 2002).

As condições climáticas também podem influenciar o uso espaço-temporal do ambiente pelos primatas, com efeitos imediatos e a longo prazo na navegação. Por exemplo, primatas podem usar o cheiro para detecção de habitats preferidos, de modo que dias de muito vento ou chuvosos podem alterar a direção e a velocidade com que os indivíduos se movimentam (BEARDER *et al.,* 2006; PRUETZ & HERZOG, 2017). Como efeitos de longo prazo, a sazonalidade altera a disponibilidade de recursos, e espécies podem explorar certas porções de sua área de vida na busca de recursos específicos, ou então não dispor de energia o suficiente para navegar longas distâncias em ambientes altamente sazonais (e.g., *Rinopithecus*, YIMING *et al.*, 2002).

Os bugios (gênero *Alouatta*) são primatas neotropicais conhecidos pela alta proporção de folhas na dieta, a tal ponto que muito da sua ecologia é tratada como resultado do baixo aporte energético. Ademais, o gênero é notório com relação à sua flexibilidade nos parâmetros ecológicos. Os grupos flutuam entre dois e 40 indivíduos; áreas de vida variam entre dois e 112 hectares, e algumas espécies podem passar até 80% do seu tempo paradas (HORWICH *et al.,* 1993; AGOSTINI *et al.,* 2010; FORTES *et al.,* 2015; VAN BELLE & BICCA-MARQUES, 2015). Nosso conhecimento sobre a variabilidade intragenérica provavelmente corresponde à sua ampla distribuição geográfica (CORTÉS-ORTIZ *et al*., 2003), fazendo com que os bugios sejam os primatas neotropicais mais bem estudados (CHAVES & BICCA-MARQUES, 2012; BICCA-MARQUES et al., 2020).

A flexibilidade ecológica encontrada nos bugios geralmente reflete sua capacidade de sobreviver e persistir em fragmentos de variados graus de conservação e tamanho, desde florestas contínuas a fragmentos pequenos e degradados (CHAVES & BICCA-MARQUES, 2012). Os efeitos da fragmentação têm ganhado atenção por ser uma realidade atual, transformando a estrutura do ambiente e, consequentemente, alterando a forma com que indivíduos usam seu tempo e seu espaço. Estudos anteriores mostram que áreas de vida menores estavam relacionadas a uma densidade populacional maior, mesmo em fragmentos grandes (CHIARELLO, 1992; BRAVO & SALLENAVE, 2003; KOWALEWSKI, 2007; GOMÉZ-POSADA & LONDOÑO, 2012). A diminuição de fragmentos florestais pode limitar a área de vida das espécies, aumentar a sobreposição de territórios, requerer distâncias maiores para suprir as demandas energéticas, impedir a

migração de indivíduos, diminuir a quantidade de recursos e aumentar a competição intraespecífica, com efeitos prejudiciais nos indivíduos em médio e longo prazos (KNOWLTON & GRAHAM, 2010; FORTES *et al.,* 2015).

Para o gênero *Alouatta*, diversos estudos relacionam o tamanho do fragmento com alterações no uso espaço-temporal (CRISTÓBAL-AZKARATE & ARROYO-RODRÍGUEZ 2007; ARROYO-RODRÍGUEZ & DIAS, 2010; ARROYO-RODRÍGUEZ *et al.,* 2013; FORTES *et al.,* 2015). Contudo, em um estudo comparativo entre espécies desse gênero, BICCA-MARQUES (2003) encontrou influência do tamanho de fragmento nos parâmetros de área de vida e dieta, mas não no percurso diário. Vale ressaltar que os fragmentos incluídos nos trabalhos de BICCA-MARQUES (2003) e BICCA-MARQUES *et al.* (2020) mira em fragmentos médios e pequenos, e pouco se sabe sobre como os parâmetros ecológicos se expressam em fragmentos pristinos (exceções são JULLIOT, 1994 e QUEIROZ, 1995 com *A. juara*; e STEINMETZ, 2000 com *A. guariba*).

A maior parte dos estudos com bugios está desviada a determinadas espécies (e.g. *A. pigra*). No caso de *A. guariba,* 34% dos estudos (SOBRAL, 2020, presente tese) estão concentrados em fragmentos pequenos (<100 ha, segundo RIBEIRO *et al.,* 2009), ao passo que estudos em ambientes grandes permanecem escassos, com apenas um realizado em um fragmento de 45.000 ha (STEINMETZ, 2000), possivelmente porque há poucos remanescentes naturais intactos no mundo para se conduzir pesquisa com primatas (JANSON, 2000). No contexto atual de perda e destruição de habitat pelas atividades humanas, esse conhecimento é um ponto de partida primordial para delinear as consequências dos diferentes graus de mudança ambiental na ecologia dos animais (BICCA-MARQUES *et al.,* 2020).

Além disso, recentemente, a espécie *Alouatta guariba* sofreu forte declínio ao longo de sua distribuição por conta de um surto de febre amarela, levando à sua inclusão na lista das 25 espécies de primatas mais ameaçadas do mundo (BUSS *et al.,* 2019). Portanto, o objetivo desta parte do trabalho é definir quantitativamente os parâmetros ecológicos para bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*) em um fragmento de floresta contínuo e conectado. O fragmento está situado no domínio da Mata Atlântica, um ecossistema não-sazonal com relação à pluviosidade e à temperatura, porém com sazonalidade do período de frutificação (MORELATTO *et al.,* 2000). Além disso, combinando-se as informações de KNOWLTON & GRAHAM (2010) e BICCA-MARQUES (2003), serão testadas quais

variáveis (área de vida, orçamento de atividades, dieta, taxa de encontro com competidores, estação do ano, pluviosidade e chuva) melhor explicam a variação do percurso diário (PD). Devido à correlação desta variável com as demais, ela foi utilizada como representante de todos os parâmetros analisados (e.g. RAÑO *et al.,* 2016). Por se tratar de um fragmento grande e conectado, os parâmetros ecológicos serão maiores que o limite máximo descrito nos outros estudos realizados em fragmentos pequenos.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo

O estudo foi realizado no Parque Estadual Carlos Botelho (PECB), núcleo São Miguel Arcanjo, São Paulo. O PECB apresenta uma área total de aproximadamente 38.000 hectares, incluída em uma área ainda maior, o Contínuo Ecológico da Serra de Paranapiacaba, com cerca de 250.000 ha. Esse contínuo inclui outros parques como, por exemplo, o Intervales e o Parque Estadual Turístico do Alto do Ribeira (PETAR), além de outras unidades de conservação privadas. Este é considerado, portanto, um dos maiores fragmentos de Mata Atlântica do mundo (PISCIOTTA, 2002; RIBEIRO *et al.,* 2009).

As chuvas são mais abundantes no verão, alternando-se com períodos de menor pluviosidade no inverno, embora sem período de seca propriamente dita (PLANO DE MANEJO, 2015). Durante o período de estudo, o índice pluviométrico total foi de 1.440 mm, sendo os meses de dezembro a março os mais chuvosos (Fig. 1). A temperatura média anual varia entre 15°C no inverno e 24°C no verão, com a mais baixa temperatura (1,8°C) detectada em julho e a mais alta (35°C) em dezembro (dados INMET). A altitude da região varia entre 700 e 850 m anm, com toda a área de estudo localizada em terreno montanhoso, onde os topos de morro apresentam Vegetação Ombrófila Densa Montana e Alto Montana (PLANO DE MANEJO, 2015).

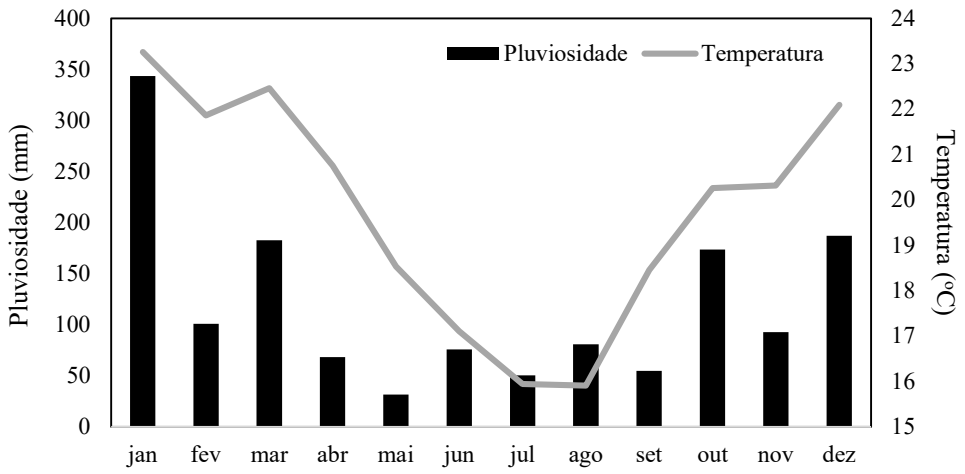


Figura 1: Gráfico apresentando a pluviosidade acumulada (barras pretas, mm) e a média da temperatura (linha cinza, ºC) para cada mês do período de estudo (2018).

Grupos Estudados

Na região de estudo, seis grupos foram registrados e identificados. Para o presente capítulo, serão apresentados os dados para os grupos G3 e G4, os dois únicos grupos acompanhados mensalmente entre novembro de 2017 e dezembro 2018 (com exceção de agosto, pois os grupos não foram encontrados). Os animais eram identificados individualmente por características singulares, como formato do rosto, marcas naturais, cicatrizes e despigmentação. Embora a área de 250.000 ha seja a área disponível para os grupos exercerem suas atividades, um deles (G3) vive na região de borda, delimitando sua livre circulação.

Área de Vida (AV)

Enquanto os grupos eram acompanhados, um GPS estava ligado continuamente, gerando uma média de 260 localizações por dia. Destes pontos, foram selecionados aqueles gerados a cada 20 minutos (três vezes por hora) se os grupos estivessem em movimento, ou uma vez a cada hora caso o grupo estivesse descansando, visto que eles poderiam passar várias horas em sequência sem se movimentarem. Só foram incluídos dias que tivessem um mínimo de quatro horas de observação (Apêndice I.A). Desse modo, no total foram contabilizados dados de 54 dias para o G3 e 50 dias para o G4. O corte para inclusão de um determinado dia no conjunto de dados era um mínimo de

Para cálculo de área de vida, utilizou-se o método de Mínimo Polígono Convexo (MCP, WORTON, 1995) e a Estimativa de Ddensidade de Kernel (KDE, POWELL 2000;

KERNOHAN *et al.,* 2001). O MCP é um dos métodos mais tradicionais da ecologia do movimento e calcula a área de um polígono complexo resultante da conexão dos pontos extremos. Entretanto, este método é sensível a lugares que são pouco utilizados pelo grupo, criando um grande viés de estimativa ao extrapolar a área de vida. A KDE, por outro lado, compensa esse viés e, por isso, vem gradualmente substituindo as estimativas MCP. A KD é um método não-paramétrico que determina a distância x-y em que indivíduos se deslocam, levando em consideração quanto tempo os animais passam em cada localização (POWELL, 2000). Considerou-se área de vida como sendo 95% dos pontos de GPS e, área de vida nuclear (*core area*), 50% dos pontos. O cálculo das áreas de vida foi com base no pacote *adeHabitatHR* do R (R Core Team, 2019).

Padrão de Atividade (PA)

O orçamento de atividades foi calculado para cada grupo, utilizando-se o método de varredura (ALTMANN, 1974) a cada 20 minutos, com informações coletadas por até 5 minutos. As categorias incluíram forrageio (manipular e ingerir alimentos ou beber água), deslocamento (movimento em qualquer direção e velocidade), descanso (imóvel ou dormindo) e social (brincadeiras, catações e quaisquer outras interações sociais entre indivíduos) e outros (comportamentos solitários ou de outra natureza), separados em proporções de tempo dispendidas para cada atividade. Cada grupo foi observado entre o amanhecer e o pôr-do-sol durante seis dias por mês (ca. 1.200h de contato, sendo 640h para o G3 e 570h para o G4).

Competidores

O uso do espaço é influenciado não só pela distribuição de recursos, mas também pelas interações intra- e interespecíficas (STEVENSON & CASTELLANOS, 2000). Alguns estudos mostraram que folívoros competem menos (SNAITH & CHAPMAN, 2007) e uma análise preliminar mostrou, de fato, uma frequência muito baixa de competição intraespecífica nos bugios do PECB. A competição por itens alimentares de alto valor energético, como as frutas, é uma das interações mais comuns entre indivíduos, quer seja da mesma espécie ou de espécies distintas. Dessa forma. optou-se por incluir espécies que competiam por alimento diretamente com os bugios, sendo elas outras espécies de primatas sintópicas, como o muriqui-do-sul *Brachyteles arachnoides* e o macaco-prego *Sapajus nigritus*. Ambas as espécies foram vistas se alimentando das mesmas árvores frutíferas que os bugios.

Portanto, “encontro com competidores” incluíram três fontes de interações agonísticas: intragrupo, intergrupo e interespecífica (Apêndice I.B). Porém, uma vez que estava se avaliando o contexto de competição por alimento, um dos indivíduos envolvidos na competição deveria, necessariamente, estar forrageando. Cada encontro com competidores foi contabilizado como um evento, independentemente do número de indivíduos envolvidos ou do tempo gasto no conflito.

Competição entre membros do próprio grupo foi definida como interações agonísticas no contexto de forrageio, i.e., quando um dos membros da díade estava forrageando. O comportamento agonístico poderia ser uma investida, empurrão, beliscão, vocalização, puxão, mostrar dentes, morder etc (NEVILLE *et al.,* 1988). O resultado dessa interação variou entre continuarem a comer próximos ou na suplantação/expulsão de um dos membros da díade.

Em bugios, as vocalizações podem ser utilizadas como defesa de recursos alimentares (KITCHEN *et al.,* 2015). Portanto, foi considerada competição entre grupos rivais sempre que vocalizações foram ouvidas enquanto um determinado grupo estava sendo acompanhado. Também se considerou competição intergrupo quando o grupo em questão inequivocamente avistou um indivíduo solitário ou grupo rival sem haver necessariamente a emissão de vocalização, podendo ou não o avistamento resultar em perseguições.

Percentual de Dieta

Durante as varreduras, não foi registrado o item alimentar de cada animal individualmente visto que outras fontes de dados estavam sendo coletadas simultaneamente e a dieta não era o foco do presente trabalho. Contudo, como o percentual de consumo de folhas e frutos é uma informação relevante, optou-se por utilizar uma fonte de dados que foi coletada a fim de saber, em linhas gerais, o que os grupos estavam comendo. Quando mais de 50% do grupo estava se alimentando, registrou-se o item alimentar majoritário (folha, fruto, flor, água, goma, outros e não identificados). Quando mais de 50% do grupo alternou a fonte de alimento (de folhas para frutos, por exemplo), isso foi novamente registrado. Vale ressaltar que esse método não corresponde ao que a literatura comumente utiliza (a varredura) e gera uma quantidade bem menor de observações. Esses eventos foram transformados em porcentagens (% destes eventos em que houve consumo de folhas, por exemplo), incluindo-se no total também os casos em que o item alimentar não pode ser identificado. Dentro do período

estudado, foram anotados 1.234 eventos de forrageio (548 para o G3 e 686 para o G4). Destes, em 370 vezes não foi possível registrar o item (n=147 para G3 e n=223 para o G4). As porcentagens foram calculadas diária e mensalmente.

Percurso Diário (PD)

O PD foi calculado somando-se as distâncias a cada intervalo dos pontos de GPS (e.g. RAÑO *et al.,* 2016), aqui designado "método soma". Outro método amplamente utilizado em vários estudos (e.g. HOPKINS, 2011) é o cálculo das distâncias diretas entre o início do acompanhamento até o final, aqui chamado de "método direto". Esse último foi calculado apenas a título de comparação para outros trabalhos.

Pluviosidade, Temperatura e Estação do Ano

As variáveis bióticas dizem respeito ao período analisado. Dados de chuva foram fornecidos pelo próprio Parque, ao passo que dados de temperatura foram cedidos pelo INMET. Apesar de o PECB não apresentar um período de seca propriamente dito (PLANO DE MANEJO, 2015), os meses de outubro a março foram considerados como período chuvoso-frutificação, ao passo que os meses de abril a setembro foram considerados como secos e de menor frutificação. A divisão dos períodos seco e chuvoso ocorreu quando estavam próximos ao limite de superávit hídrico e associados ao período de frutificação descrito em TALEBI *et al.* (2005). Sucintamente, superávit hídrico ocorre quando a altura da pluviosidade ultrapassa duas vezes a média da temperatura máxima em ºC (20,6ºC) (WALTER, 1973). Para o período analisado, apenas o mês de maio não apresentou superávit.

Análises Estatísticas

Medidas de tendência central (médias) e desvios-padrão (DP) foram analisadas no geral, mensalmente e diariamente, exceto AV que não pôde ser calculada diariamente. Essas variáveis foram testadas quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e diferenças entre meses foram com base em testes paramétricos (teste *t* ou ANOVA e teste Tukey *a posteriori*) ou não-paramétricos (Mann-Whitney U e teste de Wilcoxon pareado) dependendo do resultado do teste de normalidade. A saber, apenas PD teve distribuição não-normal.

Para o teste da hipótese de que as variáveis de área de vida, orçamento de atividades, dieta, encontro com competidores, estação do ano, pluviosidade e chuva influenciam o percurso diário, utilizou-se a análise de caminhos baseada nos quadrados mínimos

parciais (*Partial Least Squares Path Modeling*, PLS-PM), com base no pacote *plspm* (SANCHEZ, 2013) no software R (R Core Team, 2019). Para tanto, foram avaliados os efeitos diretos e indiretos das variáveis acima sobretudo no PD (Tabela 1). Uma vez que apenas PD não teve distribuição normal, o modelo foi construído sem transformação. A testagem da distribuição dos resíduos do modelo foi feita com o pacote DHARMa (HARTIG, 2017). Todas as análises estatísticas utilizaram o software R v. 3.6.3 (R, 2019). Considerou-se o limite de $p<0,05$ como significativo.

Tabela 1: Esquema simples da modelagem utilizada na análise de caminhos. As colunas influenciam as linhas. Zero indica ausência de influência e 1 indica influência.

Variável	Influência								
	Grupo	Estação	Chuva	Temperatura	Competidores	PA	%Frutas	%Folhas	PD
Grupo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Estação (seca/chuvosa)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chuva (mm)	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Temperatura (ºC)	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Competidores	0	1	1	1	0	0	0	0	0
PA	1	1	1	1	0	0	0	0	0
% Frutas	1	1	1	1	0	1	0	0	0
% Folhas	1	1	1	1	0	1	1	0	0
PD	1	1	1	1	1	1	1	1	0

RESULTADOS

Área de Vida

De acordo com a estimativa MCP 95%, o tamanho da área de vida do G3 foi de 13,5 hectares (ha), ao passo que o G4 foi de 32 ha (Fig. 2; Tabela 2). A estimativa Kernel 95% resultou em áreas de vida de tamanhos ligeiramente diferentes, com 18,4 ha para o G3 e 43,8 ha para o G4. Finalmente, a área de vida nuclear (50% estimativa de Kernel) foi de 5,9 ha para o G3 e 13 ha para o G4. Não houve sobreposição das áreas de vida entre nenhum grupo. Apenas durante um único dia em abril de 2018 o G3 explorou uma área pertencente ao G1, porém não houve encontros intergrupais e essa região não foi explorada novamente. Por se tratar de um evento atípico, esta visita é excluída das análises de área de vida, visto que utilizam 95% dos pontos de GPS. Foi constatado que

mesmo na ausência de contato visual ou auditivos (vocalizações), os grupos dificilmente ultrapassavam barreiras (ou marcos) compostas por vales e riachos.

Com base na análise MCP 95%, os grupos não exploravam a totalidade de sua área de vida em nenhum mês (Apêndice I.C), onde o mês com menor valor foi outubro para o G3 (7,7 ha) e dezembro para o G4 (16,5 ha), ao passo que o mês com maior área visitada foi abril para G3 (15,2 ha) e outubro para G4 (30,2 ha).

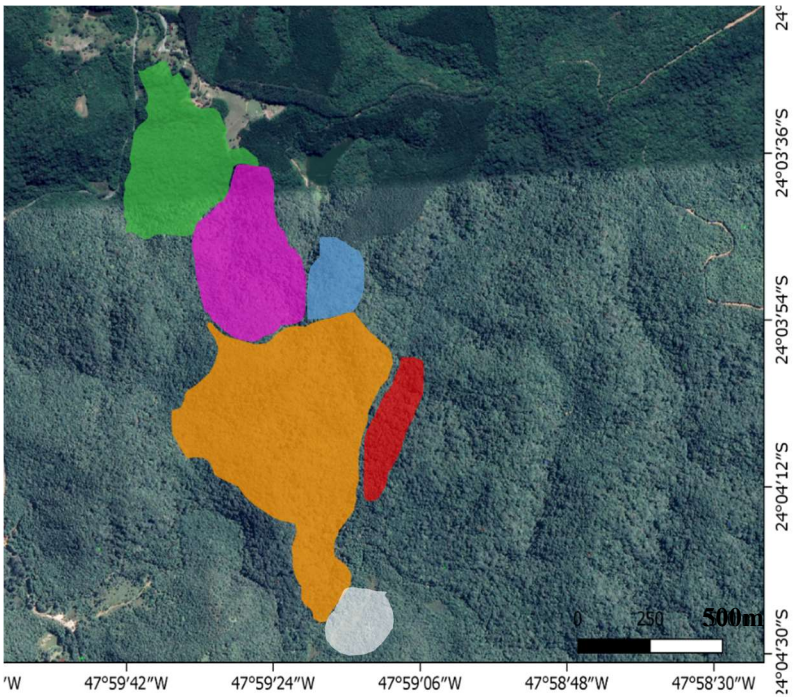


Figura 2: Representação gráfica dos territórios dos seis grupos vizinhos conhecidos na região. Apenas os territórios em verde (G3) e em laranja (G4) foram estimados. Os demais polígonos (rosa, G1; azul, G5; vermelho, G6; e branco, G7) servem apenas para representação gráfica.

Orçamento de Atividades

O percentual do orçamento de atividades dispendido para descanso, forrageio, deslocamento, social e outros para os grupos está disposto na tabela 2. Apenas os percentuais de deslocamento e descanso foram estatisticamente diferentes entre os grupos. A ANOVA não detectou diferenças nas médias do orçamento de atividades com relação ao grupo nem à estação, porém detectou diferenças entre os meses de novembro de janeiro (p=0,020) e novembro de junho (p=0,007) (Tabela 3).

Encontro com Competidores

Foram registrados 46 eventos interespecíficos, 112 encontros intergrupais e 24 eventos agonísticos de competição intragrupo (Apêndice I.B). Os encontros com competidores ocorreram em todos os meses, sendo mais frequentes entre os meses de

novembro a maio (n=147). Contudo, apenas os meses de março e dezembro, bem como setembro e dezembro apresentaram diferenças significativas (Tabela 3).

Tabela 2: Variáveis de deslocamento, orçamento de atividades e dieta para cada grupo de estudo.

Parâmetros	G3	G4	Média
Média do tamanho do grupo	6,5	5,5	6
Percurso Diário (PD)			
Método Direto (m)	229	274	251,5
Método Soma			
Média PD (m)	665	779	722
Mínimo PD (m)	226,5	209	217,7
Máximo PD (m)	1198,2	2592,6	1895,4
Área de Vida (ha)			
95% MCP	13,5	32	22,7
95% Kernel	18,4	43,8	31,1
50% Kernel	5,9	13	9,5
Orçamento de Atividades			
% Descanso	57,2	49,4	53,3
% Forrageio	22,3	22,6	22,5
% Deslocamento	9,8	17,6	13,7
% Social	4,5	4,7	4,6
% Outros	4,7	4,2	4,4
% Indefinido	1,5	1,6	1,5
Dieta			
% Folha	35,2	43,9	39,6
% Fruto	36,5	21	28,8
% Água	0,9	1,7	1,3
% Goma	0,4	0,7	0,6
% Indefinido	26,8	32,5	29,6

Tabela 3: Diferença entre médias das variáveis com relação às diferentes categorias analisadas.

Variável e o grupo estatístico analisado	*F*	p	Meses diferentes (*p*)
PD ~ Grupo		0,21	
PD ~ Estação		0,039	
PD ~ meses			Dez-abr (0,0059); dez-mai (0,0162)
Descanso ~ Grupo	10,29	0,00195	
Descanso ~ Estação	0,586	0,446	
Descanso ~ meses	1,347	0,225	
Forrageio ~ Grupo	2,461	0,121	
Forrageio ~ Estação	0,137	0,713	
Forrageio ~ meses	0,701	0,72	
Deslocamento ~ Grupo	14,12	0,00034	
Deslocamento ~ Estação	2,862	0,0948	
Deslocamento ~ meses	2,522	0,0122	Nov-Jan (p=0,020); Nov-Jul (p=0,007);
Folhas ~ Grupo	6,41	0,013	
Folhas ~ Estação	39,73	<0,0001	
Folhas ~ meses	13	<0,0001	Janeiro, fevereiro, abril e dezembro diferente de vários meses (p<0,001)
Frutas ~ Grupo	6,718	<0,001	
Frutas ~ Estação	1,572	0,214	
Frutas ~ meses	6,718	<0,001	Abril e dezembro diferentes de vários meses (p<0,001)
Comp. Interesp ~ Grupo	2,176	0,144	
Comp. Interesp ~ Estação	2,223	0,14	
Comp. Interesp ~ meses	1,184	0,315	
Comp. Intergrupo ~ Grupo	0,002	0,967	
Comp. Intergrupo ~ Estação	2,602	0,11	
Comp. Intergrupo ~ meses	2,817	0,00449	Mar-dez (p=0,001); Set-Dez (p=0,01)
Comp. Intragrupo ~ Grupo	0,116	0,737	
Comp. Intragrupo ~ Estação	0,278	0,604	
Comp. Intragrupo ~ meses	0,578	0,797	
Comp. Total ~ Grupo	1,03	0,313	
Comp. Total ~ Estação	2,651	0,107	
Comp. Total ~ meses	1,678	0,0986	

Teste da diferença de médias para PD: Wilcoxon pareado; demais: ANOVA seguida do teste Tukey.

Variação na Dieta

Dos 1.234 registros totais de forrageio, 370 não puderam ter o tipo de alimento identificado (30%). Houve poucos registros de outras fontes que não fossem folhas ou frutos, como flor (n=2), goma (n=7) e beber água (n=17), observados em ambos os grupos, embora mais frequentes no G4 (Tabela 2). Incluindo-se os registros não identificados, cerca de 35% dos eventos incluíram folha no G3 e 43% no G4, uma diferença estatisticamente significativa. Já frutos totalizaram 36% para o G3 e 20% para o G4, embora essa diferença não tenha sido significativa.

Os bugios ingeriram cerca de 60% de frutas entre dezembro e fevereiro, reduzindo drasticamente para 10% entre abril e outubro, enquanto o percentual de folhas flutuou no mesmo período (mínimo 3% em setembro e máximo 60% em fevereiro). O percentual de eventos incluindo folhas ou frutos variou com os meses (Fig. 3), de modo que diversos meses foram diferenciados entre si pela ANOVA e teste Tukey *a posteriori* (Tabela 3).

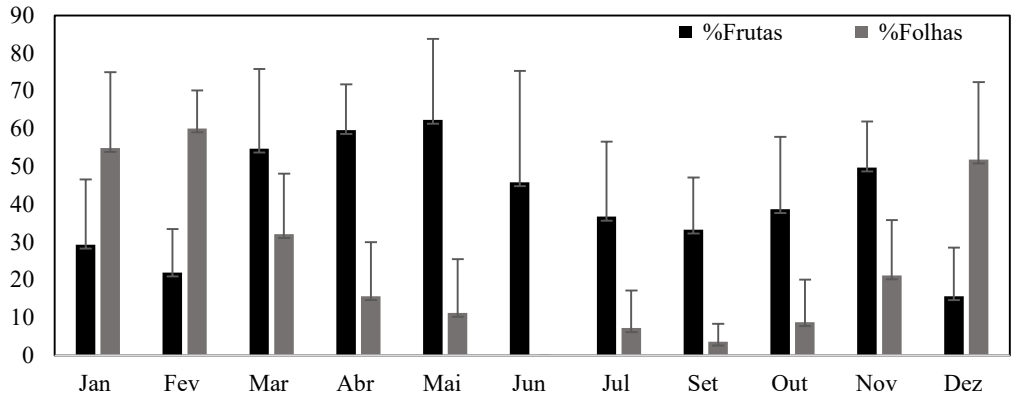


Figura 3: Variação mensal na proporção de folhas e frutos ingeridos em ambos os grupos conjuntamente. No mês de junho, houve apenas um dia de coleta e no mês de agosto, os grupos não foram encontrados. As barras indicam desvio padrão.

Percurso Diário

Os bugios foram vistos utilizando o solo da floresta uma única vez para escapar de uma briga com um grupo rival. Não houve diferença estatística no PD entre os grupos (Tabelas 2 e 3). Quando comparados com o método direto, a média foi de 229m para o G3 e 274m para o G4, também sem diferença estatística entre os grupos. Pelo método direto, não houve diferença estatística entre os grupos.

O teste pareado de Wilcoxon detectou diferença no PD entre os meses de dezembro e abril para o G3, porém nenhuma diferença entre os meses para o G4 (Fig. 4). Quando os dados dos dois grupos foram analisados juntos, houve diferença entre os meses de dezembro, abril e maio. Nenhum dos dois grupos apresentou diferenças nos percursos diários quanto à estação. Analisando-se os dois grupos conjuntamente, a média da estação seca foi 697,1 m e a média da estação chuvosa foi 789,4m.

Ao reunir essas informações, pode-se dizer que o G4 passou maior parte do seu tempo deslocando-se quando comparado ao G3, embora ambos tenham percorrido distâncias diárias semelhantes. É possível, então que a diferença observada seja explicada pela velocidade maior com que G3 se desloca. Curiosamente, a área de vida de cada grupo é inversamente proporcional a essa velocidade, já que a área de vida do G3 é menor.

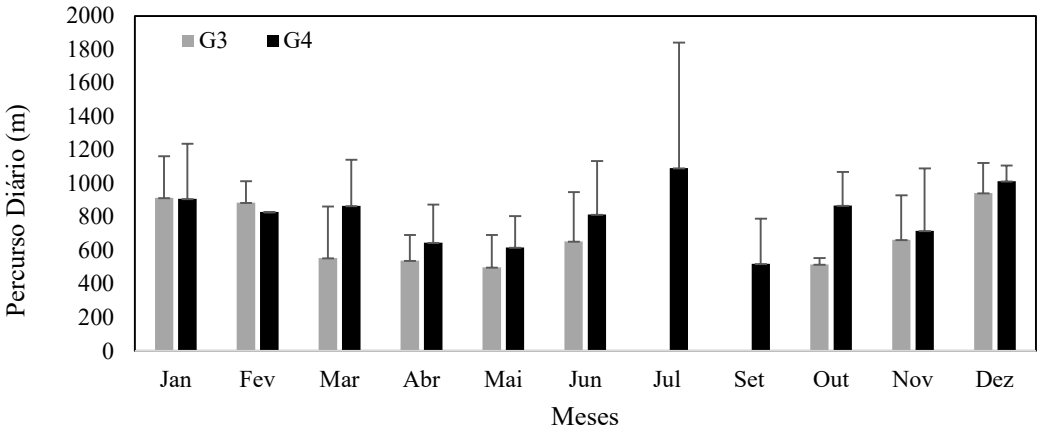


Figura 4: Média mensal do percurso diário em metros de cada grupo. Em cinza, média do G3 e em preto, média do G4. As barras indicam desvio padrão.

Análise de Caminhos

Os desvios dos resíduos não foram significativos (KS test p=0,28; teste de dispersão p=0,8; teste do *outlyer* p=0,44), permitindo que a análise de caminho fosse realizada. Na modelagem da análise de caminhos, as variáveis explicaram apenas 32% da variação no PD. Apesar desse baixo valor, os efeitos mais pronunciados diziam respeito ao grupo e ao percentual de folhas, ambos com efeito positivo sobre PD (Fig. 5). O intervalo de confiança dos demais parâmetros sobrepôs zero e, portanto, não foram significativos. Outra influência interessante detectada foi o efeito do grupo e da temperatura nos encontros com competidores.

Além da identidade do grupo, apenas o percentual de folhas ingeridas pelos grupos foi capaz de explicar parcialmente a variação encontrada. Os meses de maior deslocamento foram aqueles em que uma maior proporção de folhas foi ingerida, ao passo que os meses de menor deslocamento foram aqueles com menor percentual de ingestão de folhas.

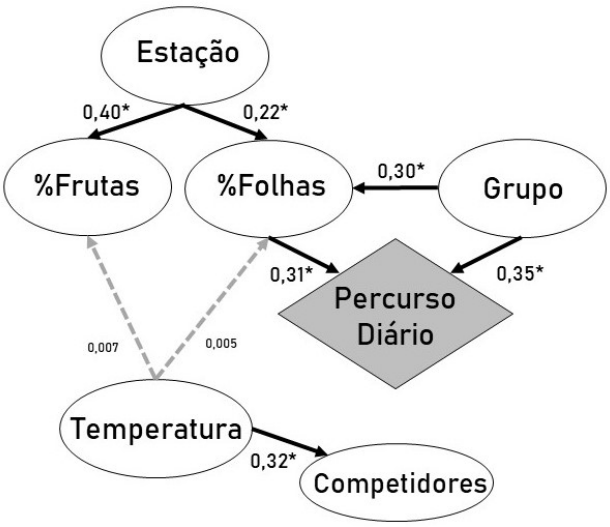


Figura 5: Esquema representativo dos efeitos pela análise de caminhos que influenciam o percurso diário (PD) de bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*). Linhas pretas cheias: efeitos diretos; linhas cinza tracejadas: efeitos indiretos. Efeitos significativos estão marcados com asterisco.

DISCUSSÃO

Os resultados mostram que, quantitativamente, os parâmetros ecológicos de grupos que vivem em um contínuo não diferem de fragmentos menores, contrário ao esperado. Apenas a competição, seja intra ou interespecífica, foi menor. Além disso, a identidade do grupo e o percentual de folhas ingerida foram capazes de explicar a variação no percurso diário.

Área de Vida e Territorialidade

A área de vida variou amplamente entre os grupos e também ao longo do ano, de modo que a totalidade não era visitada em todos os meses. A área de vida do G4 foi maior que o geralmente relatado na literatura (43,8 há *versus* 16,53 ha para a média da espécie; FORTES *et al.,* 2015), equiparando-se apenas ao estudo realizado por AGOSTINI (2009) com dois grupos da Argentina (47,4ha e 70,32ha). Já o tamanho da área de vida do G3,

que vivia na borda, aproximou-se da média (18,4 ha). Portanto, considerando-se os trabalhos realizados com a espécie, um terço foi em fragmentos menores que a área de vida encontrada no presente trabalho (SOBRAL, 2020, presente tese).

Ao longo de todo o período de estudo, nenhum dos grupos ultrapassou barreiras entre grupos vizinhos, geralmente compostas por riachos, ainda que a copa das árvores fosse conectada o suficiente para deslocamento dos indivíduos. Esse padrão pode sugerir que tais barreiras fossem características físicas da paisagem utilizadas pelos bugios como marcos para navegação (KILLIAN *et al.,* 2012; DE GUINEA *et al.,* 2019). O respeito às fronteiras de grupos vizinhos pode incutir em um menor risco de injúrias advindo de competições diretas ou indiretas e, consequentemente, o desperdício de energia e até a morte (HERNANDÉZ-SALAZAR *et al.,* 2015). A evitação de áreas pertencentes a outros grupos ocorria mesmo na ausência de pistas visuais ou acústicas de grupos vizinhos. Portanto, o olfato pode ter papel importante na detecção de grupos rivais, visto que fezes frescas de outros grupos foram encontradas nas regiões de fronteira. A comunicação olfativa já foi sugerida como um aspecto importante na vida social dos bugios, embora extensos estudos ainda não tenham sido realizados nesse aspecto (BALTISBERGER, 2003 *apud* HERNANDÉZ-SALAZAR *et al.,* 2015).

Encontros visuais entre grupos vizinhos foram raros (n=8, 4%) e não houve sobreposição de territórios entre dois grupos adjacentes (e nem com os demais grupos que foram acompanhados esporadicamente e que não foram considerados no presente trabalho), o que define esses grupos como sendo altamente territoriais (POWELL, 2000). Esse achado contraria diversos estudos realizados com bugios anteriormente, uma vez que não se costuma dizer que os grupos são territoriais devido à ampla sobreposição entre grupos vizinhos (e.g. CORNICK & MARKOWITZ, 2002). Esse resultado pode estar atrelado ao tamanho total dos fragmentos estudados, onde o espaço reduzido provido por fragmentos menores não permite que os grupos se evitem, levando à uma grande sobreposição da área de vida entre grupos vizinhos (KNOWLTON & GRAHAM, 2010). Logo, ao menos no PECB, os bugios podem ser descritos como territoriais. Encontros agonísticos com outros grupos de bugios serão discutidos em detalhe mais adiante.

Padrão de Atividade

No caso do presente estudo, os bugios passaram a maior do tempo descansando (53,3%), seguidos por forrageio (22,5%), deslocamento (13,7%), social (4,6%) e outros comportamentos (4,5%). Esse padrão é recorrente para o gênero, consagrando a letargia

como uma das características mais marcantes dos bugios (KLEIN, 1974), já que estudos demonstram que eles podem passar até 64,2% do tempo parados (CRISTÓBAL-AZKARATE & ARROYO-RODRÍGUEZ, 2007; ARROYO-RODRÍGUEZ *et al.,* 2015). É possível que os valores de descanso mais altos registrados para o gênero sejam encontrados no estudo de PAVELKA & KNOPFF (2004) com *Alouatta palliata*, onde os grupos passavam até 80% descansando, enquanto os bugios do PECB não ultrapassaram 60% em nenhum mês. Outros trabalhos indicam valores semelhantes, com 64,7% em *A. caraya* (RÍMOLI *et al.,* 2012) e 57-65% em *A. guariba* (AGOSTINI *et al.,* 2012; JUNG *et al.,* 2015); embora valores tão baixos quanto 45% tenham sido detectados em *A. guariba* de Ilha Grande (FERREGUETTI *et al.,* 2020).

O elevado tempo dispendido para o descanso tem sido proposto como uma estratégia de otimização de energia, já que folhas provêm baixo retorno energético (MILTON, 1998; DI FIORE *et al.,* 2011). Animais altamente folívoros apresentam estratégias para otimizar a digestão, onde algumas espécies podem ter especializações no sistema digestivo (*e.g.* presença de ceco desenvolvido ou compartimentalização do estômago), já outras necessitam comer mais para atingir os requerimentos energéticos diários e, talvez a estratégia mais abundante seja a de reduzir o tempo em atividade (HLADIK, 1978). Essa especialização comportamental não é exclusiva dos bugios, sendo observada também em colobus (DASILVA, 1992), preguiças (NAGY & MONTGOMERY, 1980), roedores *Sphiggurus* (PASSAMANI, 2010) e até coalas (NAGY & MARTIN, 1985).

A densidade populacional costuma ser outra fonte considerada importante no padrão de atividade, pois seu aumento causa redução de disponibilidade de recursos (DUNN *et al.,* 2009). Contudo, no estudo de CRISTÓBAL-AZKARATE & ARROYO-RODRÍGUEZ (2007), os autores não encontraram correlação entre um aumento no tempo dispendido para o descanso e a densidade populacional ou tamanho do fragmento. Nos grupos estudados aqui, o percentual do orçamento de atividade variou com o mês, porém não foi destoante com o já relatado na literatura. Todavia, a densidade populacional não está apenas relacionada ao aumento populacional em determinada área, mas também pode ser traduzida em um aumento no tamanho médio do grupo, um fator potencialmente influenciador de outros parâmetros ecológicos. Nos estudos com *Colobus*, grupos maiores prediziam maiores territórios, mais tempo de forrageio e maiores distâncias percorridas para que as necessidades energéticas fossem atingidas (TEICHROEB & SICOTTE,

2009). No caso dos bugios do PECB e de outros lugares, o tamanho médio dos grupos geralmente não ultrapassou a média da espécie (6 indivíduos no PECB *versus* 6,7 FORTES *et al.,* 2015 e FERREGUETTI *et al.,* 2020), não sendo possível verificar se o tamanho de grupo, de fato, influenciaria ou não o padrão de atividades.

Competidores

A competição intraespecífica foi extremamente rara, avaliada tanto pelas vocalizações (n=112) quanto pelas interações agonísticas intragrupo (n=24) e pelos encontros entre grupos (n=46). Em um estudo com *Alouatta pigra*, ao longo de 16 meses foram registradas 356 vocalizações e vizinhos se encontravam uma vez a cada três dias (VAN BELLE *et al.,* 2013). Outros estudos mostram incríveis 5,7 encontros por hora em *A. caraya* (KOWALEWSKI, 2007). Tais valores foram bem maiores que os detectados no PECB, visto que, convertendo nessas taxas, as vocalizações no PECB totalizaram 112 em 14 meses, e encontros entre grupos vizinhos ocorreram uma vez a cada 5 dias. Por ser uma característica marcante dos bugios, diversos estudos analisaram esse comportamento nas mais variadas espécies (CUNHA *et al.,* 2015; KITCHEN *et al.,* 2015), ao ponto de algumas espécies apresentarem o que é chamado de "coro matinal" (e,g, *Alouatta seniculus* SEKULIC, 1982). Tal padrão não foi observado nos bugios do PECB.

Além dos grupos vizinhos, o PECB merece destaque por conter diversas espécies de primatas, com duas delas competindo diretamente com os bugios: *Brachyteles arachnoides*, um grande primata folívoro-frugívoro (DE CARVALHO JR *et al.,* 2004; TALEBI *et al.,* 2005) e *Sapajus nigritus*, uma espécie menor que se alimenta de folhas e frutos (IZAR *et al.,* 2012), além de ser conhecida por sua agressividade (ROSE *et al.,* 2003). Quando se combinou a competição intraespecífica (n=182) com a competição interespecífica (n=157), o número de encontro com competidores (n=339) foi semelhante ao relatado para grupos de *A. pigra* descrito acima (n=356, VAN BELLE *et al.,* 2013). Considera-se que encontros com grupos rivais e com outras espécies resulte em competição por alimentos, incutindo em um *fitness* reduzido para os competidores, especialmente os perdedores (e.g., BENELLI *et al.*, 2015). Nesse sentido, recursos de alto valor energético, mas limitados, como a frutificação, são causa comum de competição interespecífica (TILMAN, 1987) e podem resultar em desvantagens potencialmente adaptativas, como danos á saúde por meio do estresse fisiológico (CHAVES *et al.,* 2019).

A densidade populacional do PECB parece ser menor que fragmentos pequenos, embora estimativas precisas não possam ser calculadas visto que não foi o objetivo do

presente estudo. Entretanto, considerando-se a média do tamanho do grupo e da área de vida (6 indivíduos vivendo em 31 ha), tem-se uma possível densidade de 1,86ind/km^2. Esse valor é bem mais baixo que o encontrado em *A. clamitans* para Ilha Grande (1 grupo/km^2), estudo com enfoque na estimativa populacional (FERREGUETTI *et al.,* 2020), ou no sul do Brasil (10ind/km^2, AGOSTINI *et al.,* 2010). A presença de competidores diretos de outras espécies, como o muriqui-do-sul e o macaco-prego, pode preencher o nicho vago deixado pelos encontros intergrupais menos frequentes. Ambientes pequenos, fragmentos e/ou altamente antropizados podem aumentar a competição intra e interespecífica e, consequentemente, o estresse fisiológico dos indivíduos (KAISIN *et al.,* 2020). Dessa forma, observar que dentro de um ambiente dessa magnitude a competição intraespecífica foi menor, revela a importância do tamanho do fragmento em diminuir a competitividade entre indivíduos da mesma espécie, porém permitindo a manutenção de outras espécies. Estudos mais detalhados com relação ao abordado aqui (e.g., densidade populacional, níveis de cortisol, interações agonísticas, endoparasitas) são necessários para se compreender melhor esse cenário.

Dieta

É importante salientar que os dados de dieta aqui obtidos não seguiram o método mais amplamente utilizado para estudos dessa natureza – varredura – e sim o método de todas as ocorrências, onde sempre se registraram todos os momentos em que mais de 50% do grupo estivesse se alimentando e qual o item alimentar em termos gerais. Portanto, grandes comparações não são possíveis. Ainda assim, os bugios ingeriram cerca de 60% de frutas entre dezembro e fevereiro, reduzindo drasticamente para 10% entre abril e outubro, enquanto o percentual de folhas flutuou no mesmo período (mínimo 3% em setembro e máximo 60% em fevereiro). Comparativamente, a proporção de folhas ingeridas pelos bugios do PECB é algumas dezenas menor que o máximo observado para *A. pigra* (86% de folhas ingeridas entre janeiro e março, e 67% de frutas entre abril e julho) (PAVELKA & KNOPFF, 2004), e com padrão inverso, visto que esta espécie prioriza frutos nos meses de chuvosos de verão (CANO-HUERTES *et al.,* 2017). No caso do presente trabalho, os meses de inverno eram aqueles mais frios e secos, de menor disponibilidade de frutas e também aqueles com maiores percentuais de descanso, corroborado a relação consagrada na literatura entre disponibilidade de alimentos de alto valor energético e letargia.

As diferenças observadas entre as dietas aqui e em PAVELKA & KNOPFF (2004) podem estar potencialmente relacionadas às diferenças no habitat de ambas as espécies, já que *A. palliata* está ao norte da distribuição do gênero (sul da América do Norte e A. Central, CORTÉS-ORTIZ *et al*., 2015), onde as temperaturas são mais elevadas e quase não há variação anual na disponibilidade de frutos (CANO-HUERTES *et al.,* 2017). Embora no estudo de PAVELKA & KNOPFF (2004) uma maior ingestão de frutas não tenha sido suficiente para alterar o orçamento de atividades dos grupos estudados, o trabalho de CANO-HUERTES *et al.* (2017), realizado com a espécie *A. palliata*, detectou que o orçamento de atividades de fêmeas reprodutivas se relaciona à disponibilidade de nutrientes e otimização de energia (CANO-HUERTES *et al.,* 2017).

Vale ressaltar que neste mesmo local (PECB), a espécie de primata *Brachyteles arachnoides* foi mais frugívora quando comparadas a outras populações da mesma espécie (DE CARVALHO JR *et al.,* 2004; TALEBI *et al.,* 2005). Já a espécie *Sapajus nigritus* foi mais folívora se comparada a outros locais (IZAR *et al.,* 2012). No caso de *S. nigritus*, além de uma dieta mais folívora, particularmente alimentando-se de bromélias, outros parâmetros do orçamento de atividades foram diferentes, indicando que a disponibilidade de frutos utilizada pelos macacos-prego é menor. Contrariamente, a disponibilidade de frutos para os *B. arachnoides* no PECB foi considerada maior que outros locais onde se encontram populações de *Brachyteles.* É possível que a competição direta entre as espécies de primatas do PECB favoreça esse padrão de dieta bastante distinto para cada uma das espécies nesse local. Portanto, as espécies-irmãs e indivíduos reagem de forma distinta, ainda que apresentem distribuições geográficas sobrepostas e, portanto, sujeitos a pressões semelhantes.

Percurso Diário

A média para o grupo G3 foi de 665 m, enquanto a média do G4 foi ligeiramente maior, com 779 m. Apesar de esses valores não terem sido estatisticamente diferentes, a análise de caminhos detectou que o grupo explicava parte da variação encontrada no PD. Ambos os grupos andaram mais no verão (Fig. 4), especificamente em dezembro, e menos no inverno, nos meses de abril e maio, época essa com uma maior proporção de frutas ingerida. Combinando-se essas informações, o G4 comeu proporcionalmente menos frutas, passava mais tempo se deslocando, mais tempo se alimentando e menos tempo descansando (Tabela 2). Isso significa que o G4 gastava mais energia que G3, embora não consumisse alimentos de alto valor energético (frutas, 36,5% para G3; 21% para G4).

Os trabalhos de DUNN *et al.* (2009) e RAÑO *et al.* (2016) identificaram que o número de árvores alimentares estava positivamente correlacionado com a distância percorrida. Ambos os trabalhos mostraram que o aumento no esforço de forrageio e a redução no tempo de descanso refletiam uma menor disponibilidade de árvores grandes e frutíferas, e consequentemente explicavam a variação no DP.

Devido à alta correlação que o percurso diário tem com demais parâmetros ecológicos (RAÑO *et al.,* 2016), ele foi utilizado para predizer a variação nos parâmetros ecológicos pela análise de caminhos. Além da identidade do grupo, apenas o percentual de folhas ingeridas pelos grupos foi capaz de explicar parcialmente a variação encontrada. Os meses de maior deslocamento foram aqueles em que uma maior proporção de folhas foi ingerida, ao passo que os meses de menor deslocamento foram aqueles com menor percentual de ingestão de folhas. No estudo de ESTRADA (1984) com *A. palliata*, um grupo utilizou uma ampla área, apesar de uma dieta constituída por 50% de folhas. Tal tamanho de área de vida foi relacionado à seletividade de folhas jovens, que poderiam estar tão heterogeneamente distribuídas quanto frutas e, portanto, requerendo uma área maior. A mesma explicação pode ser aplicada ao presente trabalho para justificar a área de vida de G4 quase duas vezes maior que G3. Outra informação relevante diz respeito à exploração da própria área de vida. Apesar de o G3 ter uma área menor e deslocamento semelhante ao de seu grupo vizinho, o grupo andava em círculos, explorando a mesma área mais de uma vez por dia. Um estudo com *Chiropotes satanas* encontrou padrão semelhante em fragmentos pequenos (BOYLE *et al.,* 2006). Grupos que perfazem o mesmo percurso com frequência têm maiores chances de se contaminar com parasitas, pois se deslocam em locais anteriormente defecados (HAUSFATER & MEADE, 1982; BRIVIDORO *et al.,* 2019).

O fato de o percurso percorrido pelos grupos do presente estudo não ter diferido da literatura parece estar relacionado à uma restrição da folivoria. O gênero *Colobus,* ainda mais especializado a uma dieta folívora que os bugios, apresenta um percurso diário que mal ultrapassa os 450m (TEICHROEB & SICOTTE, 2009), similar ao observado para *Colobus polykomos, Colobus guereza* e *Procolobus badius* (DASILVA, 1992), porém menor que a média do presente estudo (722m). Essa informação ressalta que esse gênero não parece depender de grandes fragmentos para persistirem na natureza (KOWALEWSKI & ZUNINO, 1999; BICCA-MARQUES *et al.,* 2020), embora o

tamanho do fragmento tenha gerado outras repercussões, como uma competição intraespecífica menor.

CONCLUSÕES

Embora outros estudos não tenham considerando todos os parâmetros ecológicos utilizados no presente trabalho, os valores aqui encontrados não diferiram de outros trabalhos realizados com a espécie. Contudo, ressalta-se a sobreposição de áreas de vida virtualmente ausente, contrastando todos os trabalhos realizados com a espécie, sendo uma condição rara em bugios. Ademais, os valores de área de vida aqui encontrados concordam parcialmente com dados já publicados, visto que o G3 apresentou valores de área de vida próximos à média, enquanto o G4 apresentou valores bastante altos, contido entre os mais altos já relatados para o gênero (FORTES *et al.,* 2015). Esperava-se que o tamanho do fragmento resultasse em áreas de vida significativamente maiores, já que não há restrição de espaço. Contudo, grupos reagiram de forma diferente com relação à área de vida.

Nossos dados corroboram o trabalho de BICCA-MARQUES (2003) que verifica que o percurso diário não é altamente variável para o gênero e parece independer do tamanho do fragmento. Tal aspecto pode ser uma vantagem frente à fragmentação e redução contínua dos remanescestes florestais do mundo, favorecendo sua resiliência em fragmentos de variados tamanhos e influência antrópica (CHAVES & BICCA-MARQUES, 2012). A estabilidade parece estar ligada não ao tamanho do fragmento, mas sim à ecologia do gênero, fato já observado por BICCA-MARQUES (2003) e BICCA-MARQUES *et al.* (2020) para o gênero *Alouatta*. Da mesma forma, outras espécies de primatas folívoros apresentam parâmetros ecológicos semelhantes sendo, portanto, a folivoria considerada por alguns autores como uma restrição ecológica (TEICHROEB & SICOTTE, 2009).

REFERÊNCIAS

AGOSTINI I, HOLZMANN I & DI BITETTI MS. 2010. Ranging patterns of two syntopic howler monkey species (*Alouatta guariba* and *A. caraya*) in Northeastern Argentina. International Journal of Primatology, 31, 363–381

AGOSTINI I. 2009. Ecology and behavior of two howler monkey species (*Alouatta guariba clamitans* and *Alouatta caraya*) living in sympatry in northeastern

Argentina. PhD dissertation, Università degli Studi di Roma “La Sapienza”, Rome, Italy.

ALTMANN J. 1974. Observational study of behaviour: sampling methods. Behaviour, 49, 227-267.

ARROYO-RODRÍGUEZ V & DIAS PAD. 2010. Effects of habitat fragmentation and disturbance on howler monkeys: a review. American Journal of Primatology, 72(1), 1-16.

ARROYO-RODRÍGUEZ V, ADRESEN E, BRAVO SP & STEVENSON PR. 2015. Seed dispersal by howler monkeys: current knowledge, conservation implications, and future directions, p111-139. *In* Howler Monkeys: Behavior, Ecology, and Conservation (KOWALEWSKI MM, GARBER PA, CORTÉS-ORTIZ L, URBANI B & YOULATOS D, eds.). Springer, New York, USA.

ARROYO-RODRÍGUEZ V, GONZÁLEZ-PEREZ IM, GARMENDIA A, SOLÀ M & ESTRADA A. 2013. The relative impact of forest patch and landscape attributes on black howler monkey populations in the fragmented Lacandona rainforest, Mexico. Landscape Ecology, 28(9), 1717-1727.

BALTISBERGER C. 2003. Untersuchungen zur geruchlichen Kommunikation bei Brüllaffen (*Alouatta palliata*) —Eine Freilandstudie. Diploma Thesis, Biology, University of Munich, Germany.

BEARDER SK, NEKARIS KAI & CURTIS DJ. 2006. A re-evaluation of the role of vision in the activity and communication of nocturnal primates. Folia Primatologica, 77(1-2), 50-71.

BENELLI G, DESNEUX N, ROMANO D, CONTE G, MESSING RH & CANALE A. 2015. Contest experience enhances aggressive behaviour in a fly: when losers learn to win. Scientific Reports, 5, 9347.

BICCA-MARQUES JC, CHAVES ÓM & HASS GP. 2020. Howler monkey tolerance to habitat shrinking: Lifetime warranty or death sentence? American Journal of Primatology, 82(4), 1-9.

BICCA-MARQUES JC. 2003. How do howler monkeys cope with habitat fragmentation? p283-303. *In* Primates in Fragments (). Springer: Boston, USA.

BRAVO SP & SALLENAVE A. 2003. Foraging behavior and activity patterns of *Alouatta caraya* in the Northeastern Argentinean flooded forest. International Journal of Primatology, 24, 825–846.

BRIVIDORO MV, KOWALEWSKI MM, SCARRY CJ & OKLANDER LI. 2019. Patterns of sleeping site and sleeping tree selection by black-and-gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) in northern Argentina. International Journal of Primatology, 40(3), 374-392.

BOYLE SA, LOURENÇO WC, DA SILVA LR & SMITH AT. 2009. Travel and spatial patterns change when *Chiropotes satanas chiropotes* inhabit forest fragments. International Journal of Primatology, 30(4), 515-531.

BUSS G, OKLANDER LI, BICCA MARQUES JC, HIRANO ZB, CHAVES OM, MENDES SL et al. 2019. Brown howler monkey: *Alouatta guariba* Humboldt, 1812. *In* Primates in Peril. The world's 25 most endangered primates 2018-2020 (SCHWITZER C, MITTERMEIER RA, RYLANDS AB, CHIOZZA F, WILLIAMSON EA, BYLER D, WICH S, HUMLE T, JOHNSON C, MYNOTT H AND MCCABE G, eds.).

CAILLAUD D, CROFOOT MC, SCARPINO SV, JANSEN PA, GARZON-LOPEZ CX, et al. 2010. Modeling the spatial distribution and fruiting pattern of a key tree species in a neotropical forest: methodology and potential applications. PLoS One, 5(11), e15002.

CARPENTER CR. 1934. A field study on the behaviour and. social relations of howler monkeys. Comparative Psychological Monographs, 10, 1–168

CHAPMAN CA & CHAPMAN IJ. 2002. Foraging challenges of red colobus monkeys: influence of nutrients and secondary compounds. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology, 133, 861-875.

CHAPMAN CA, WRANGHAM RW & CHAPMAN LJ. 1995. Ecological constraints on group size: an analysis of spider monkey and chimpanzee subgroups. Behavioral Ecology and Sociobiology, 36, 59–70.

CHAPMAN CA. 1990. Ecological constraints on group size in three species of neotropical primates. Folia Primatologica, 55,1–9.

CHAVES ÓM & BICCA-MARQUES JC. 2012. Dietary flexibility of the brown howler monkey throughout its geographic distribution. American Journal of Primatology, 75(1), 16–29.

CHAVES ÓM, FERNANDES FA, OLIVEIRA GT & BICCA-MARQUES JC. 2019. Assessing the influence of biotic, abiotic, and social factors on the physiological stress of a large Neotropical primate in Atlantic forest fragments. Science of the Total Environment, 690, 705-716.

CHIARELLO AG. 1992. Dieta, padrão de atividades e área de vida de um grupo de bugios (*Alouatta fusca*) na Reserva de Santa Genebra, Campinas, SP. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil.

CLUTTON-BROCK TH & HARVEY PH. 1977. Primate ecology and social organization. Journal of Zoology, 183(1), 1-39.

CORNICK LA & MARKOWITZ H. 2002. Diurnal vocal patterns of the black howler monkey (*Alouatta pigra*) at Lamanai, Belize. Journal of Mammalogy, 83(1), 159-166.

CORTÉS-ORTIZ L, BERMINGHAM E, RICO C, RODRIGUEZ-LUNA E, SAMPAIO I & RUIZ-GARCIA M. 2003. Molecular systematics and biogeography of the Neotropical monkey genus, *Alouatta*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 26(1), 64-81.

CRISTÓBAL-AZKARATE J & ARROYO-RODRÍGUEZ V. 2007. Diet and activity pattern of howler monkeys (*Alouatta palliata*) in Los Tuxtlas, Mexico: effects of habitat fragmentation and implications for conservation. American Journal of Primatology, 69, 1013–1029.

CRISTÓBAL-AZKARATE J, URBANI B & ASENSIO N. 2015. Interacionts of howler monkeys with other vertebrates: a review, p141-164. *In* Howler Monkeys: Behavior, Ecology, and Conservation (KOWALEWSKI MM, GARBER PA, CORTÉS-ORTIZ L, URBANI B & YOULATOS D, eds.). Springer, New York, USA.

CROOK JH & GARTLAN JS. 1966. Evolution of primate societies. Nature, 210(5042), 1200-1203.

CUNHA RGT, OLIVEIRA, DAG, HOLZMANN I & KITCHEN, DM. 2015. Production of loud and quiet calls in howler monkeys, p337-369. *In* Howler monkeys: adaptive

radiation, systematics, and morphology (KOWALEWSKI MM, GARBER PA, CORTÉS-ROTIZ L., URBANI B & YOULATOS D., eds.). Springer, New York, USA.

DASILVA GL. 1992. The western black-and-white colobus as a low-energy strategist: activity budgets, energy expenditure and energy intake. Journal of Animal Ecology, 79-91.

DE CARVALHO JR O, FERRARI SF & STRIER KB. 2004. Diet of a muriqui group (*Brachyteles arachnoides*) in continuous primary forest. Primates, 45(3), 201-204.

DE GUINEA M, ESTRADA A, NEKARIS KAI & VAN BELLE S. 2019. Arboreal route navigation in a Neotropical mammal: energetic implications associated with tree monitoring and landscape attributes. Movement Ecology, 7(1), 1-12.

DI FIORE A, LINK A & CAMPBELL CJ. 2011. The atelines: behavioral and socioecological diversity in a New World monkey radiation, p155–188. *In* Primates in perspective (CAMPBELL CJ, FUENTES A, MACKINNON MC, BEARDER SK & STUMPF RM, eds). Oxford University, New York, USA.

DIAS P & RANGEL-NEGRIN A. 2015. Diets of howler monkeys, p21-57. *In* Howler Monkeys: Behavior, Ecology, and Conservation (KOWALEWSKI M, GARBER P, CORTÉSORTIZ L, URBANI B & YOULATOS D, eds). Springer, New York, USA.

DUNN JC, CRISTÓBAL-AZKARATE J & VEÀ JJ. 2009. Differences in diet and activity pattern between two groups of *Alouatta palliata* associated with the availability of big trees and fruit of top food taxa. American Journal of Primatology, 71(8), 654-662.

ESTRADA A. 1984. Resource use by howler monkeys (*Alouatta palliata*) in the rain forest of Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. International Journal of Primatology, 5(2), 105-131.

FORTES VB, BICCA-MARQUES JC, URBANI B, FERNÁNDEZ VA & DA SILVA PEREIRA T. 2015. Ranging behavior and spatial cognition of howler monkeys, p219-258. *In* Howler Monkeys: Behaviour, Ecology and Conservation (KOWALEWSKI MM, GARBER PA, CORTÉS-ORTIZ L, URBANI B & YOULATOS D, eds.). Springer, New York, USA.

GENES L, FERNANDEZ FA, VAZ-DE-MELLO FZ, DA ROSA P, FERNANDEZ E & PIRES AS. 2019. Effects of howler monkey reintroduction on ecological interactions and processes. Conservation Biology, 33(1), 88-98.

GÓMEZ-POSADA C & LONDOÑO JM. 2012. *Alouatta seniculus*: density, home range and group structure in a bamboo forest fragment in the Colombian Andes. Folia Primatologica, 83, 56–65.

GOSS-CUSTARD JD, DUNBAR RIM & ALDRICH-BLAKE FPG. 1972. Survival, mating and rearing strategies in the evolution of primate social structure. Folia Primatologica, 17(1-2), 1-19.

HARTIG F. 2017. DHARMa: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level/Mixed) Regression Models. <https://cran.r-project.org/package=DHARMa>.

HAUSFATER G & MEADE BJ. 1982. Alternation of sleeping groves by yellow baboons (*Papio cynocephalus*) as strategy for parasite avoidance. Primates, 23(2), 287–297

HERNANDEZ-SALAZAR LT, DOMONY DJ & LASKA M. 2015. The sensory systems of *Alouatta*: evolution with an eye to ecology, p317-336. *In* Howler monkeys: adaptive radiation, systematics, and morphology (KOWALEWSKI MM, GARBER PA, CORTÉS-ROTIZ L., URBANI B & YOULATOS D., eds.). Springer, New York, USA.

HLADIK CM. 1978. Adaptive strategies of primates in relation to leaf eating, p373-395. *In* The Ecology of arboreal Folivores (MONTGOMERY GG, Ed.). Smithsonian Institution Press, Washington, USA.

HOPKINS ME. 2011. Mantled howler (*Alouatta palliata*) arboreal pathway networks: relative impacts of resource availability and forest structure. International Journal of Primatology, 32(1), 238-258.

HORWICH RH, KOONTZ F, SAQUL E, SAQUL H & GLANDER K. 1993. A reintroduction program for the conservation of the black howler monkey in Belize. Endangered Species Update 10, 1-6.

ISBELL LA. 1991. Contest and scramble competition: patterns of female aggression and ranging behavior among primates. Behavioral Ecology, 2(2), 143-155.

JANSON CH & GOLDSMITH ML. 1995. Predicting group size in primates: foraging costs and predation risks. Behavioral Ecology, 6(3), 326-336.

JANSON CH. 2000. Primate socio-ecology: The end of a golden age. Evolutionary Anthropology, 9, 73–86.

JULLIOT C. 1994. Diet diversity and habitat of howler monkeys, p67– 71. *In* Current Primatology - Vol. I: Ecology and Evolution (THIERRY B, ANDERSON JR, ANDERSON JR, ROEDER JJ & HERRENSCHMIDT N, eds.). ULP: Strasbourg, FRA.

JUNG L, MOURTHE I, GRELLE CE, STRIER KB & BOUBLI JP. 2015. Effects of local habitat variation on the behavioral ecology of two sympatric groups of brown howler monkey (*Alouatta clamitans*). PLoS One, 10(7), e0129789.

KAISIN O, FUZESSY L, PONCIN P, BROTCORNE F & CULOT L. 2020. Meta-analysis of anthropogenic impacts on physiological stress in wild primates. Conservation Biology, 0(0), 1-14.

KERNOHAN BJRA, GITZEN & MILLSPAUGH JJ. 2001. Analysis of animal space use and movements, p125–166 *In* Radio tracking and animal populations (MILLSPAUGH JJ & MARZLUFF JM, eds.). Academic Press: San Diego, USA.

KILLIAN NJ, JUTRAS MJ & BUFFALO EA. 2012. A map of visual space in the primate entorhinal cortex. Nature, 491(7426), 761–764.

KITCHEN DW, CUNHA RGT, HOLZMANN I, & OLIVEIRA DAG. 2015. Function of loud calls in howler monkeys, p369-402. *In* Howler monkeys: adaptive radiation, systematics, and morphology (KOWALEWSKI MM, GARBER PA, CORTÉS-ROTIZ L., URBANI B & YOULATOS D., eds.). Springer, New York, USA.

KLEIN LL. 1974. Agonistic behavior in neotropical primates, p77-122. *In* Primate Aggression, Territoriality, and Xenophobia. (HOLLOWAY RL, ed.) Academic Press, New York, USA.

KNOWLTON JL & GRAHAM CH. 2010. Using behavioral landscape ecology to predict species' responses to land-use and climate change. Biological Conservation, 143(6), 1342-1354.

KOENIG A, BEISE J, CHALISE MK & GANZHORN JU. 1998. When females should contest for food-testing hypotheses about resource density, distribution, size and quality with Hanuman langurs (*Presbytis entellus*). Behavioral Ecology and Sociobiology, 42, 225-237.

KOWALEWSKI MM & ZUNINO GE. 1999. Impact of deforestation on a population of *Alouatta caraya* in northern Argentina. Folia Primatologica, 70, 163–166.

KOWALEWSKI MM. 2007. Patterns of affiliation and co-operation in howler monkeys: an alternative model to explain social organization in non-human primates. PhD dissertation, University of Illinois, Urbana, USA.

MAJOLO B, DE BORTOLI VIZIOLI A & SCHINO G. 2008. Costs and benefits of group living in primates: group size effects on behaviour and demography. Animal Behaviour, 76(4), 1235-1247.

MATSUDA I, CLAUSS M, TUUGA A, SUGAU J, HANYA G, YUMOTO T, BERNARD H & HUMMEL J. 2017. Factors affecting leaf selection by foregut-fermenting proboscis monkeys: new insight from in vitro digestibility and toughness of leaves. Scientific Reports, 7, 42774.

MILTON K. 1998. Physiological ecology of howlers (*Alouatta*): energetic and digestive considerations and comparison with the Colobine. International Journal of Primatology, 19, 513–548.

MORELLATO LPC, TALORA DC, TAKAHASI A, BENCKE CC, ROMERA EC & ZIPPARRO VB. 2000. Phenology of Atlantic rain forest trees: a comparative study 1. Biotropica, 32(4b), 811-823.

NAGY KA & MARTIN RW. 1985. Field metabolic rate, water flux, food consumption and time budget of koalas, *Phascolarctos cinereus* (Marsupialia: Phascolarctidae) in Victoria. Australian Journal of Zoology, 33(5), 655-665.

NAGY KA & MONTGOMERY GG. 1980. Field metabolic rate, water influx, and food consumption in three-toed sloths (*Bradypus variegatus*). Journal of Mammalogy, 61, 465-472.

NEVILLE MK, GLANDER KE, BRAZA F & RYLANDS AB. 1988. The howling monkeys, genus Alouatta. *In* Ecology and behavior of Neotropical primates vol. 2 (MITTERMEIER RA, RYLANDS AB, COIMBRA-FILHO AF & FONSECA GAB, eds.). World Wildlife Fund, Washington.

PASSAMANI M. 2010. Use of space and activity pattern of *Sphiggurus villosus* (F. Cuvier, 1823) from Brazil (Rodentia: Erethizontidae). Mammalian Biology-Zeitschrift fur Saugetierkunde, *75*(5), 455.

PASTOR-NIETO R. 2015. Health and welfare of howler monkeys in captivity. *In* Howler Monkeys: Behavior, Ecology, and Conservation (KOWALEWSKI MM, GARBER PA, CORTÉS-ORTIZ L, URBANI B & YOULATOS D, eds.). Springer: New York, USA.

PAVELKA MS & KNOPFF KH. 2004. Diet and activity in black howler monkeys (*Alouatta pigra*) in southern Belize: does degree of frugivory influence activity level?. Primates, 45(2), 105-111.

PISCIOTTA K. 2002. The Paranapiacaba forest fragment. *In* Censuses of vertebrates in a Brazilian Atlantic rainforest area: The Paranapiacaba fragment (MATEOS E, GUIX JC, SERRA A & PISCIOTTA K, eds.). Universitat de Barcelona, Barcelona.

PLANO DE MANEJO. 2015. Título: Plano de Manejo Parque Estadual Carlos Botelho. Unidades de Terreno do Parque. Disponível em < http://observatorio.wwf.org.br/site_media/upload/gestao/planoManejo/PM_PECarlosBotelho_parte_002.pdf> . Último acesso em agosto de 2020.

POWELL RA. 2000. Animal home ranges and territories and home range estimators, p65-110. *In* Research techniques in animal ecology: controversies and consequences (BOITONI L & FULLER TK, eds). Columbia University press, New York, USA.

PRUETZ JD & HERZOG NM. 2017. Savanna chimpanzees at Fongoli, Senegal, navigate a fire landscape. Current Anthropology, 58(S16), S337-S350.

QUEIROZ HL. 1995. Preguiças e guaribas: os mamíferos folívoros arborícolas do Mamirauá, CNPq/Sociedade Civil Mamirauá, Brasília.

QUINTANA-MORALES, P. C., MORALES-MÁVIL, J. E., ESCOBAR-ALIAGA, M., & BRAVO-XICOTENCATL, R. 2017). Use of space in two neighboring groups of the howler monkey *Alouatta palliata mexicana* (Primates: Atelidae): overlap and home range size. Therya, 8(2), 91-97.

RAÑO, M., KOWALEWSKI, M. M., CEREZO, A. M., & GARBER, P. A. (2016). Determinants of daily path length in black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) in northeastern Argentina. American Journal of Primatology, *78*(8), 825-837.

RÍMOLI J, NANTES RDS & JÚNIOR AL. 2012. Diet and activity patterns of black howler monkeys *Alouatta caraya* (Humboldt, 1812, Primates, Atelidae) in ecotone

Cerrado-Pantanal in the left bank of Aquidauana River, Mato Grosso do Sul, Brazil. Oecologia Australis, 16, 933-948.

ROSE LM, PERRY S, PANGER MA, JACK K, MANSON JM, GROS-LOUIS J & MACKINNON VE. 2003. Interspecific interactions between Cebus capucinus and other species: data from three Costa Rican sites. Interantional Journal of Primatology, 24, 759–779.

R CORE TEAM, 2019. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Disponível em <https://www.R-project.org>

RIBEIRO MC, METZGER JP, MARTENSEN AC, PONZONI FJ & HIROTA MM. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. Biological conservation, 142(6), 1141-1153.

SANCHEZ G. 2013. PLS Path Modeling with R. Trowchez Editions. Berkeley, 2013. Disponível em: http://www.gastonsanchez.com/PLS Path Modeling with R.pdf. Último acesso em 20 de maio de 2020.

SEKULIC R. 1982. The function of howling in red howler monkeys (*Alouatta seniculus*). Behaviour, 38-54.

SMULDERS TV, GOULD KL & LEAVER LA. 2010. Using ecology to guide the study of cognitive and neural mechanisms of different aspects of spatial memory in food hoarding animals. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 365, 883–900

SNAITH TV & CHAPMAN CA. 2007. Primate group size and interpreting socioecological models: do folivores really play by different rules?. Evolutionary Anthropology, 16(3), 94-106.

STEINMETZ S. 2000. Ecologia e comportamento do bugio (*Alouatta fusca clamitans*) no Parque Estadual Intervales. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

STEVENSON PR & CASTELLANOS MC. 2000. Feeding rates and daily path range of the colombian woolly monkeys as evidence for between-and within-group competition. Folia Primatologica, 71, 399–408.

STRIER KB. 1989. Effects of patch size on feeding associations in muriquis (*Brachyteles arachnoides*). Folia Primatologica, 52, 70-77.

TALEBI M, BASTOS A & LEE PC. 2005. Diet of southern muriquis in continuous Brazilian Atlantic Forest. International Journal of Primatology, 26(5), 1175-1187.

TEICHROEB JA & SICOTTE P. 2009. Test of the ecological-constraints model on ursine colobus monkeys (*Colobus vellerosus*) in Ghana. American Journal of Primatology, 71(1), 49-59.

TILMAN D. 1987. The importance of the mechanisms of interspecific competition. The American Naturalist, 129(5), 769-774.

VAN BELLE S & BICCA-MARQUES JC. 2015. Insights into reproductive strategies and sexual selection in howler monkeys, p57-84, *In* Howler Monkeys: Adaptive radiation, systematics, and morphology (KOWALEWSKI, MM, GARBER PA, CORTÉS-ORTIZ L, URBANI B & YOULATOS D, eds). Springer, New York, USA.

VAN BELLE S, ESTRADA A & GARBER PA. 2013. Spatial and diurnal distribution of loud calling in black howlers (*Alouatta pigra*). International Journal of Primatology, 34(6), 1209-1224.

WALTER H. 1973. Vegetation of the Earth in Relation to Climate and the Eco-Physiological Conditions. Springer, New York, USA.

WILLIAMS GC. 1966. Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle. The American Naturalist, 100(916), 687-690.

WORTON BJ. 1995. A convex hull-based estimator of home-range size. Biometrics, 1206-1215.

WRANGHAM RW. 2000. Why are male chimpanzees more gregarious than mothers? A scramble competition hypothesis, p248– 258. *In* Primate males: causes and consequences of variation in group composition (KAPPELER PM, ed.). Cambridge University Press, Cambridge, UK.

YIMING L, STANFORD CB & YUHUI Y. 2002. Winter feeding tree choice in Sichuan snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus roxellanae*) in Shennongjia Nature Reserve, China. International Journal of Primatology, 23(3), 657-675.

CAPÍTULO II
DEMOGRAFIA E SISTEMA SOCIAL DE BUGIOS-RUIVOS (*Alouatta clamitans*): MECANISMOS SUBJACENTES À ESTRUTURA SOCIAL

RESUMO

A estrutura social reflete os padrões de interação entre indivíduos, i.e., a frequência e a intensidade de determinados comportamentos sociais. Os bugios são primatas Neotropicais que apresentam migração bissexual, interagem pouco e vivem em grupos pequenos. Dessa forma, a interação entre indivíduos adultos, quando presente, dá-se principalmente entre indivíduos não aparentados e restritos em número. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi testar qual fator – parentesco mãe-filhote, sexo e idade – melhor explica a variação encontrada em bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*) e relacionar com mudanças demográficas de imigração, nascimento e desaparecimento de indivíduos por meio da análise de redes sociais. Foram registrados o tamanho e a composição sexo-etária de seis grupos vizinhos e duas redes sociais foram analisadas, sendo elas a de catação e a de associação espacial para dois deles. Todos os grupos apresentaram composição similar, com um macho adulto, duas fêmeas adultas e suas crias, e um a dois machos subadultos. Fêmeas foram os agentes fundamentais na catação, sendo as principais catadoras e os principais alvos da catação. Espacialmente, a centralidade e a força dos imaturos foram mais altas. Os índices de associações diádicas foram mais altas entre os filhotes e suas respectivas mães. O grupo onde ocorreu maiores mudanças demográficas ao longo do tempo tinha menores taxas de catação e maiores taxas de agressão, embora os valores médios das métricas das redes de ambos os grupos fossem semelhantes. Por conta dessa variação, é sumariamente necessária a realização de mais estudos com maior abrangência de grupos. O estudo das redes tem implicações diretas para o entendimento da transmissão de informações, parasitas e fluxo gênico, essenciais para a manutenção de grupos na natureza.

Palavras-chave: Análise de redes sociais; Associação Espacial; Catação; Interação social Primatas; Platyrrhini; Mamíferos.

INTRODUÇÃO

Os mamíferos apresentam uma estratégia reprodutiva bem distinta dos outros animais, onde todas as espécies são dioicas, reproduzem-se sexuadamente e exibem cuidado parental pela lactação. Dessa forma, duas díades – mãe e filhote, macho e fêmea – são de suma importância para se entender os padrões de interação entre os indivíduos. Entretanto, algumas espécies vivem em grupos sociais estáveis ao longo de suas vidas de modo que outras díades ganham importância (EISENBERG, 1981). Portanto dependendo da conformação desses grupos sociais, pode-se observar interações mais frequentes entre fêmeas (e.g. hiena *Crocuta crocuta* HOLEKAMP *et al*., 1997); ou entre machos, por exemplo (e.g. esquilo-de-chão *Xerus inauris* WATERMAN, 1997).

Os grupos sociais, também chamados de sociedades ou sistemas sociais, apresentam três elementos principais para sua categorização, sendo eles a organização social, a estrutura social e o sistema de acasalamento (KAPPELER, 1999; KAPPELER & VAN SCHAIK, 2002). A organização social diz respeito à distribuição espaço-temporal das categorias sexo-etárias de um grupo (e.g. solitários, associados aos pares ou com mais de dois indivíduos, associados com membros do mesmo sexo ou do sexo oposto). Já a estrutura social refere-se ao padrão (intensidade e frequência) das interações e relações sociais entre os indivíduos adultos (HINDE, 1983; OKKO & JOHNSTONE, 1999). Por fim, o sistema de acasalamento prediz com quantos parceiros sexuais que o sexo oposto tem, em um *continuum* que varia entre monogâmico e promíscuo (WITTENBERGER & TILSON, 1980).

Os primatas são animais majoritariamente sociais e apresentam uma grande diversidade nos três elementos que definem as sociedades. Existem espécies que vivem em duplas (e.g. *Aotus* sp., WRIGHT, 1986), espécies que vivem em grupos unimacho-multifêmea (e.g. algumas espécies de *Alouatta*, DI FIORE *et al.,* 2011), ou grupos multimacho-multifêmea (*e.g. Brachyteles* spp. e *Pan paniscus,* KANO, 1982; STRIER *et al.,* 2006). Há espécies em que a hierarquia é bem definida (e.g. *Cebus capucinus*, BERGSTROM & FEDIGAN, 2010) outras em que a hierarquia é mais relaxada (e.g. *Macaca fuscata*, ZHANG & WATANABE, 2007). Com relação ao sistema de acasalamento, pode-se encontrar espécies monogâmicas (*Aotus* sp. e *Callicebus* sp., WRIGHT, 1986), poliândricas (e.g. algumas espécies de calitriquídeos, GOLDIZEN, 1987) e, mais comumente, poligínicas (diversas espécies, CLUTTON-BROCK, 1989).

Os bugios (gênero *Alouatta*) são os primatas neotropicais mais amplamente distribuídos geograficamente (CORTÉS-ORTIZ *et al*., 2003) e as cerca de 12 espécies apresentam distintas sociedades. Com relação à conformação sexo-etária, algumas espécies vivem em grupos multimacho-multifêmea (*A. palliata*) ou unimacho-multifêmea (*A. clamitans*); o tamanho dos grupos varia amplamente, desde três até 44 animais por grupo (*A. palliata*), enquanto outras espécies, como o *A. clamitans* e *A. pigra*, apresentam médias menores, em torno de 7 a 10 animais (VAN BELLE & ESTRADA, 2006; BEZANSON *et al.,* 2008). Nesses grupos, o grau de parentesco entre indivíduos adultos pode ser baixo (e.g. MILTON *et al.,* 2016) uma vez que a migração nesse gênero é bissexual, em que ambos os sexos podem migrar de seu grupo natal (CROCKETT & POPE, 1993; HORWICH *et al.,* 2000; CLARKE & GLANDER, 2008).

Outra característica distinta dos bugios é a proporção de tempo destinado ao descanso, onde os animais podem passar até 80% do tempo em repouso (BICCA-MARQUES, 2003; CRISTÓBAL-AZKARATE & ARROYO-RODRÍGUEZ, 2007; PASTOR-NIETO, 2015). Talvez por isso, a interação entre indivíduos de um grupo de bugios é baixa, com reduzidas taxas de agressão (WANG & MILTON, 2003; KOWALEWSKI & GARBER, 2014) e sem padrão claro na direção das agressões, de modo que as relações de dominância são consideradas inconsistentes, instáveis e não-lineares (ZUCKER & CLARKE, 1998). Portanto, a dominância em machos é definida pela participação predominante nas sessões de vocalização e maiores parcelas nas oportunidades de acasalamento– que lhes podem ser exclusivas ou monopolizadas (VAN BELLE *et al.,* 2008; 2009). Já com relação à catação, esta é um evento raro e, por vezes, ausente (JONES, 1979; ZUCKER & CLARKE, 1998) e, portanto, o padrão continua pouco claro entre os bugios.

Considerando-se que os bugios apresentam baixas taxas de interação, poucos foram os estudos que analisaram interações sociais, com um total de cinco estudos até o momento, sendo três com *Alouatta palliata* (ZUCKER & CLARKE, 1998; BEZANSON *et al.,* 2008; MILTON *et al.,* 2016), um com *A. pigra* (VAN BELLE *et al.,* 2014) e um para *A. clamitans* (MORO-RIOS *et al.,* 2009) (Tabela 1). Nos casos em que os animais pouco interagem entre si, a utilização da associação espacial pode ser uma das únicas formas de se analisar a natureza dos laços sociais (CROCKETT & EISENBERG, 1987; CHAPMAN *et al.*, 1995) e a estrutura social de um grupo. Em um interessante trabalho em *Alouatta palliata*, JONES (1980) relata que um grupo residente de áreas decíduas

(ambiente considerado mais estressante) apresentou taxas mais altas de interação (no caso, agonísticas). Ela sugere que, devido a fatores ecológicos, é possível que o grupo apresente menor distância interindividual, facilitando a ocorrência de interações.

Tabela 1: Lista de taxas de interações afiliativas por espécie, a taxa, a unidade, o nível avaliado (díade, grupo ou indivíduo) e a referência do estudo.

Comportamento	Espécie	Taxa	Unidade	Nível	Referência
Catação	*clamitans* (G3)	0,011	/ind/h	Indivíduo	*
Catação	*clamitans* (G4)	0,053	/ind/h	Indivíduo	*
Catação	*clamitans* (G3)	0,001	/díade/h	Díade	*
Catação	*clamitans* (G4)	0,01	/díade/h	Díade	*
Catação	*palliata*	0	/h	Grupo	1,2
Catação	*palliata*	0,02	/h	Grupo	3
Catação	*palliata* (G5)	0,03	/h	Grupo	4
Catação	*palliata*	0,03	/h	Grupo	5
Catação	*clamitans (G3)*	0,08	/h	Grupo	*
Catação	*palliata* (G12)	0,09	/h	Grupo	4
Catação	*clamitans*	0,31	/h	Grupo	6
Catação	*clamitans (G4)*	0,32	/h	Grupo	*
Catação	*seniculus*	0,36	/h	Grupo	7

* e células em cinza: Presente estudo**; 1:** RICHARD (1970); **2:** SMITH (1977); **3:** BERNSTEIN (1964); **4:** JONES (1980); **5:** JONES (1979); **6:** MENDES (1989); **7:** NEVILLE (1972).

Nos poucos trabalhos que avaliaram a associação espacial, o sexo foi um importante preditor dos padrões de proximidade espacial, em que machos preferem associar-se a fêmeas, enquanto fêmeas associam-se igualmente com qualquer indivíduo (MILTON *et al.,* 2016). Já outro estudo detectou que indivíduos aparentados passam mais tempo próximos quando comparados a indivíduos não-aparentados (MORO-RIOS *et al.,* 2009). Portanto, sexo e parentesco parecem ter um papel importante.

Uma vez que os padrões de associação espacial podem dar pistas importantes das interações e relações entre indivíduos, este trabalho teve dois objetivos principais: 1) entender se com uma baixa taxa de interação, é possível recuperar padrões de interação sociais afiliativas semelhantes ao de associação espacial; e 2) entender se os padrões estão relacionados com variações demográficas.

Dessa forma, espera-se 1) Ambos os padrões sejam parecidos, onde o sexo será decisivo para os padrões obtidos, seguido pela relação entre mãe e seu filhote. Potranto, fêmeas sem filhotes interagirão associar-se-ão a machos adultos, ao passo que fêmeas com filhotes preferirão interagir e posicionar-se próximas aos seus filhotes. Já para o

objetivo 2, espera-se que uma maior instabilidade na composição do grupo se reflita em menores níveis de catação e maior espaçamento entre indivíduos.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo

O estudo foi realizado no Parque Estadual Carlos Botelho (PECB), núcleo São Miguel Arcanjo, São Paulo. O índice pluviométrico é de 1.700mm a 2.400mm, alternando-se entre períodos de maior pluviosidade no verão e menor pluviosidade no inverno, e a temperatura pode variar entre 4 (inverno) e 35°C (verão). A altitude da região varia entre 700 e 850 m anm. A vegetação local é composta por Floresta Ombrófila Denso-Montana e Sub-Montana, majoritariamente primária, embora haja lugares (raio de até 1km a partir da sede) onde a vegetação é secundária (PLANO DE MANEJO, 2015).

Grupos de Interesse

Na região de estudo há seis grupos de bugios conhecidos. Os grupos G1, G5, G6 e G7 foram acompanhados esporadicamente, ao passo que os grupos G3 e G4 e dois grupos vizinhos foram acompanhados mensalmente entre novembro de 2017 e dezembro 2018, e trimestralmente em 2019. Pela proximidade do G3 com a sede do parque, a equipe do parque enviou registros desse grupo, sendo possível fazer seu monitoramento remoto em 2020. Os animais podem ser identificados individualmente por características singulares, como formato do rosto, marcas naturais, cicatrizes e despigmentação.

Categorização Sexo-Etária

A categorização etária foi simplificada, onde os indivíduos eram considerados como i) filhotes, enquanto estivessem sendo amamentados (quer fosse 100% dependentes da mãe ou não); ii) jovens, tão logo fossem desmamados; e iii) adultos (machos com testículos cobertos por pelos e fêmeas que estivessem apresentando comportamento sexual ou estivessem com filhotes). Uma vez que os grupos eram pequenos e cada indivíduo tinha uma categoria sexo-etária específica, descartamos a utilização de uma classificação etária refinada, como a de MENDES (1989), pois não seria diferente de analisar cada animal individualmente ou cada categoria sexo-etária individualmente.

Coleta de Dados Comportamentais

Os dados comportamentais foram coletados entre novembro de 2017 e dezembro de 2018. Cada grupo foi observado por cerca de nove horas por dia, durante seis dias por

mês (ca. 1200h de contato, sendo 640h para o G3 e 570h para o G4, e mais 100h para outros grupos não incluídos no presente estudo). Os dados foram coletados baseando-se em duas técnicas complementares e exclusivas, sendo elas a de todas as ocorrências (*all occurrence*), na qual todas as interações sociais foram anotadas (com a mesma descrição para a varredura), e a varredura instantânea a cada 20 minutos (*scan sampling*, ALTMANN, 1974), onde o comportamento dos indivíduos e seu vizinho mais próximo foram registrados (Fig. 1). O método de todas as ocorrências é o preferido para as interações sociais pois estas costumam ser raras, infrequentes e imprevisíveis (BOLIN, 1981; DIAS & RODRÍGUEZ-LUNA, 2006; BOWLER & BODMER, 2009). Os comportamentos analisados para o presente artigo foram a catação e a associação espacial.

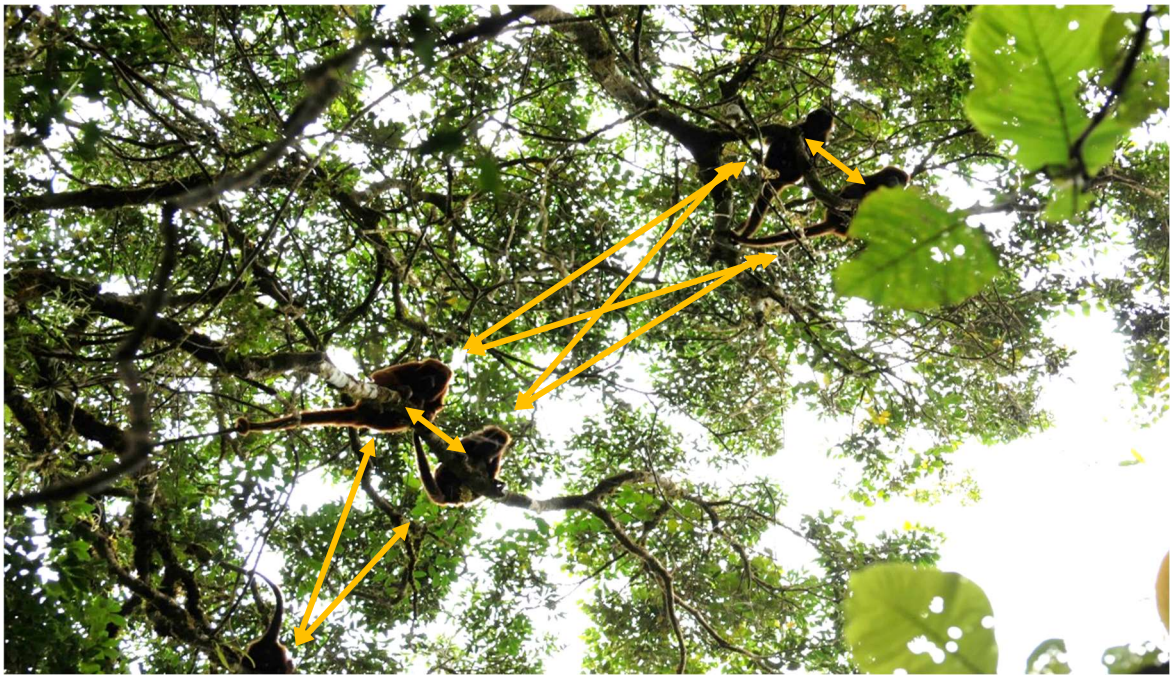


Figura 1: Exemplo de um momento pelo método de varredura, onde se anotou o comportamento individual e os vizinhos mais próximos de cada indivíduo, marcados com setas amarelas.

Catação: Quando o emissor passa as mãos ou ponta dos dedos no pelo do receptor uma ou diversas vezes, acompanhado ou não pelo uso da boca. Para duas sessões de catação terem sido consideradas como sessões distintas, o emissor deve interromper a catação com outro comportamento ou interromper por mais de 10 segundos (HENZI *et al.,* 1997; MANSON *et al.,* 2004). Solicitações não foram incluídas na análise.

Associação Espacial: Foram registrados os vizinhos (quando dois indivíduos estivessem até 2m um do outro) a cada 20 minutos. Cada indivíduo e seus vizinhos (i.e. cada linha) foi considerado como um registro. Finalmente, mesmo quando todos os vizinhos não puderam ser identificados, manteve-se na análise aqueles que foram reconhecidos.

Dados Gerais de Varredura

As varreduras foram conduzidas em 40 dias distintos no G3 e 52 dias no G4, com uma média de 95 varreduras por dia. No total, obteve-se um total de 3.655 varreduras para o G3 e 3.659 para o G4. Todos os indivíduos estavam sempre presentes, apresentando igual probabilidade de serem observados durante as varreduras. Os indivíduos com menos observações foram aqueles que nasceram ou desapareceram no meio do estudo, e os mais frequentemente observados aqueles que estavam presentes desde o início do estudo.

Análise de Redes Sociais

O estudo das interações e relações entre indivíduos a partir da perspectiva de análise de redes sociais (ARS) mede diretamente a relação entre indivíduos e o papel de cada um na estrutura social de um grupo (WHITEHEAD, 2008; BORGATTI *et al.,* 2013). A estrutura social de um grupo, então, pode ser representada por uma rede cujos nós representam os indivíduos e as linhas – ou arestas – são as interações entre os nós. Os nós possuem características – chamados atributos -, que são intrínsecas ao nó, como sua idade, seu status ou seu sexo (BORGATTI *et al.,* 2013). Já as arestas são resultantes da frequência e intensidade das interações diádicas.

Medidas de rede foram tomadas com os programas SOCPROG 2.9 (WHITEHEAD, 2009) e Gephi v0.9.2. A visualização gráfica das redes foi feita com base no programa Gephi v0.9.2. O índice de associação simples (*simple ratio*) foi utilizado em uma matriz de associação simétrica. Este índice foi o elencado apesar de outro trabalho com *Alouatta* ter utilizado o índice *half weight* (HWI) (e.g. BEZANSON *et al.,* 2008). Nesse caso, os autores avaliaram a formação de subgrupos e o HWI confere peso maior às concordâncias negativas, que é o caso da formação de subgrupos. No caso dos bugios do PECB, além de o grupo ser pequeno, nenhum animal passou um dia longe do grupo (apenas raras exceções em que o grupo se separou por conta de encontros agonísticos interespecíficos

ou por chuva, porém juntaram-se no dia seguinte, n=3). Os índices de associação entre uma díade variaram entre 0 (nunca vistos juntos) até 1 (sempre vistos juntos).

As medidas globais de rede obtidas foram os graus médios, de entrada e de saída (ponderado e não-ponderado), o diâmetro, a modularidade, a força e a centralidade. Todas as medidas foram tomadas utilizando o método de reamostragem (*bootstrap*) do SOCPROG para testar se o observado diferia ou não de uma média teórica, obtida a partir de permuta randomizada de 1.000 vezes. Já as medidas individuais avaliam individualmente a importância dos nós (indivíduos) em cada uma das redes, dentre elas força e centralidade (redes não-direcionadas e direcionadas); além dos valores de entrada e saída ponderados (redes direcionadas). Testes para díades preferidas e evitadas foram realizados com base em um limiar de significância de 0,05, com 1.000 tentativas para 1.000 permutações.

Análises Estatísticas

Os valores de grau ponderados (entrada, saída e geral) não apresentaram distribuição normal ($p>0,05$), enquanto a normalidade dos demais valores (grau não-ponderado, centralidade e força) foi confirmada ($p<0,05$).

Por meio de modelos lineares generalizados (GLM), foi verificada a relação entre atributos (sexo, idade e grupo) e métricas individuais. Uma análise interativa dos efeitos não foi possível uma vez que havia apenas fêmeas adultas. Outra forma de análise foi por correlação simples.

RESULTADOS

Categorização Sexo-Etária

O tamanho dos grupos variou entre 3 e 7 indivíduos (média 5,6) ao longo do estudo. Todos os grupos apresentaram a seguinte composição básica: um macho adulto e duas fêmeas adultas (1MA:2FA). Os demais indivíduos do grupo, quando presentes, eram sempre machos jovens ou filhotes (Tabela 2). Não foram registradas fêmeas filhotes/imaturas ao longo do estudo, embora fêmeas solitárias tenham sido avistadas e a imigração de fêmeas também foi testemunhada.

Nos grupos acompanhados assiduamente, apesar das mudanças na conformação dos membros, eles mantiveram a conformação 1MA:2FA (mais os machos jovens/filhotes). No G3, houve mudança na composição do grupo a cada mês, com o nascimento, desaparecimento e/ou imigração de novos indivíduos. Já no grupo G4, a composição foi

estável durante todo o ano de 2018. Foram observados indivíduos solitários de ambos os sexos (cinco machos, uma fêmea e dois indivíduos pretos de sexo desconhecido) e a imigração de machos (n=3) e fêmeas (n=2) para os grupos estudados também foi acompanhada. A duração exata do processo de imigração para todos os eventos não pôde ser estimada, mas podia durar cerca de três até seis meses. Ambos os grupos apresentaram tamanho de 6 indivíduos durante o ano de 2018, o que inviabilizou o uso do tamanho de grupo como variável nos parâmetros seguintes.

Apesar de certa estabilidade do G4 em 2018, durante o ano de 2019 ambos os grupos apresentaram mudanças drásticas. Em setembro de 2019, foram observados apenas o macho adulto e as duas fêmeas adultas residentes no G3. Em 2020, observou-se que as fêmeas permaneceram no território original, porém o macho dominante havia trocado novamente. Em outubro de 2020, foi registrado um novo filhote macho da fêmea que imigrou em 2017. Já o G4, apenas uma das fêmeas, seu filhote mais velho e seu filhote mais novo permaneceram no grupo, com a imigração de um novo macho adulto e uma fêmea.

Tabela 2: Tamanho e composição dos grupos estudados.

	G1	G3	G4	G5	G6	G7	Média
Tamanho do grupo	7	6-7	5-6	4	5	3	5,2
Machos adultos	1	1	1	1	1	1	1
Fêmeas adultas	2	2	2	2	2	2	2
Subadultos e filhotes	4	3	3	2	1	0	2,2
Número de dias de coleta	18	43 (74)*	57 (62) *	1	2	1	NA

*** número entre parênteses inclui dados de 2017 (G3) e 2019 (G3 e G4)**

Análise de Redes Sociais

Catação: As métricas gerais estão apresentadas na Tabela 3. Foram registrados 237 eventos de catação (55 para G3 e 182 para G4), com uma taxa de 0,08 catações/hora para o G3 e 0,32 catações/hora para o G4 (também representado por 0,001 cat/díade/h e 0,01 cat/díade/hora, respectivamente). Para o G3, dois indivíduos não participaram da rede, sendo eles MS 2 e Cuica MI 2 (Fig. 2a).

Tabela 3: Métricas de rede para ambos os grupos (G3 e G4) com relação à categoria analisada.

Grupo	Comportamento	GM	GPM	Diâmetro	Modularidade	Força	Centralidade
G3	Catação	2	11	2	Ausente	0.44 (0.36)	0.38 (0.27)
G4	Catação	3,2	30,3	3	Presente	0.41 (0.05)	0.37 (0.20)
G3	Associação Espacial	6	4,84	1	Ausente	1.29 (0.24)	0.37 (0.07)
G4	Associação Espacial	5	4,25	1	Ausente	1.04 (0.48)	0.35 (0.16)

Grau médio (GM); o grau ponderado médio (GPM); o diâmetro; a modularidade; a força e a centralidade totais.

Embora os grupos tenham apresentado graus médios distintos e modularidade (G4), tanto a força quanto a centralidade foram semelhantes entre os grupos (Tabela 3). Por exemplo, no G4 houve formação de módulos, com Teresa e seu filhote formando um módulo à parte e os demais formando outro (Fig. 2b). Por meio da análise de associações preferidas e evitadas, para o G3 houve apenas uma preferida (FA2-MA) e uma evitada (FA1-FA2). Já para o G4, três díades apresentaram valores acima do limiar, indicando preferência (MA-MS; mães e seus filhotes), enquanto duas indicaram díades evitadas (FA1-MS; FA2-MI1).

Já com relação às medidas individuais apresentadas na Tabela 4, os valores individuais de força e centralidade mostraram-se altamente correlacionados ($p<0,05$). Os indivíduos com os valores mais altos e destoantes foram o MA do G3 e a FA 2 do G4. Os indivíduos imaturos apresentaram os menores valores.

Para o grupo 3, o MA foi quem mais iniciou as catações (56%), seguido pelas FA (38%) e os demais indivíduos (6%). MA cataram FA quase exclusivamente (94%). Já as FA cataram vários indivíduos, embora o MA tenha sido o principal alvo (67%). Contrapondo esse grupo, o G4 teve uma distribuição bastante desviada para as fêmeas, as quais iniciaram as catações em 75% dos casos. O MA iniciou apenas 10 catações, sendo elas dirigidas tanto para FA quanto para outras categorias (MS e MI). Já as FA direcionaram suas catações a todos os indivíduos, porém majoritariamente à outra FA do grupo (44%), seguida pelo MA (23%), e o restante nos demais indivíduos. Vale ressaltar a importância da fêmea FA2, responsável por 69% das catações observadas nesse grupo.

Tabela 4: Relação das métricas individuais de cada uma das categoriais comportamentais separadas por grupo e por indivíduo.

Comportamento	Grupo	Indivíduo	Sexo-Etária	GE	GS	G	GEP	GSP	GP	Força	Centralidade
Groom	G4	Dende	MA	3	3	6	41	10	51	0.41	0.36
Groom	G4	Teresa	FA1	4	1	5	15	2	17	0.57	0.53
Groom	G4	Lolo	FA2	2	5	7	19	126	145	0.89	0.64
Groom	G4	85% Cacau	MS	1	2	3	14	3	17	0.4	0.37
Groom	G4	Tie	MI1	5	4	9	70	11	81	0.13	0.14
Groom	G4	Manu	MI2	4	4	8	23	30	53	0.19	0.17
Groom	G3	Guapuruvu	MA	3	3	6	16	31	47	0.9	0.69
Groom	G3	Reco-Reco	FA1	3	3	6	17	29	38	0.74	0.63
Groom	G3	Tenia	FA2	1	1	2	13	1	14	0.29	0.31
Groom	G3	Quimera	MS1	2	2	4	5	2	7	0.16	0.16
Groom	G3	Candiru	MS2	-	-	-	-	-	-	NA	NA
Groom	G3	Naldo	MI1	1	1	2	3	1	4	0.1	0.1
Groom	G3	Cuica	MI2	-	-	-	-	-	-	NA	NA
Spatial	G4	Dende	MA	-	-	-	-	-	-	1.03	0.35
Spatial	G4	Teresa	FA1	-	-	-	-	-	-	1.11	0.37
Spatial	G4	Lolo	FA2	-	-	-	-	-	-	1.35	0.45
Spatial	G4	85% Cacau	MS	-	-	-	-	-	-	1.07	0.36
Spatial	G4	Tie	MI1	-	-	-	-	-	-	1.47	0.48
Spatial	G4	Manu	MI2	-	-	-	-	-	-	1.24	0.41
Spatial	G3	Guapuruvu	MA	-	-	-	-	-	-	1.65	0.46
Spatial	G3	Reco-Reco	FA1	-	-	-	-	-	-	0.88	0.26
Spatial	G3	Tenia	FA2	-	-	-	-	-	-	1.21	0.35
Spatial	G3	Quimera	MS1	-	-	-	-	-	-	1.2	0.34
Spatial	G3	Candiru	MS2	-	-	-	-	-	-	1.4	0.41
Spatial	G3	Naldo	MI1	-	-	-	-	-	-	1.42	0.41
Spatial	G3	Cuica	MI2	-	-	-	-	-	-	1.29	0.39

Grau de entrada (GE), grau de saída (GS) e grau médio (G) não-ponderados, além dos graus de entrada, saída e médio ponderados (GEP, GSP e GP, respectivamente), a força e a centralidade.

Uma vez que a taxa de catação foi muito alta para o G4, uma análise mais refinada será feita para este grupo. As fêmeas apresentaram os maiores valores de força e centralidade, seguido pelo MA, MS e os imaturos. Indivíduos específicos (FA2) foram responsáveis pelas altas taxas de saída, porém não necessariamente de entrada, e estes indivíduos não são necessariamente os dominantes, e nem direcionam suas catações aos dominantes ou seus filhotes.

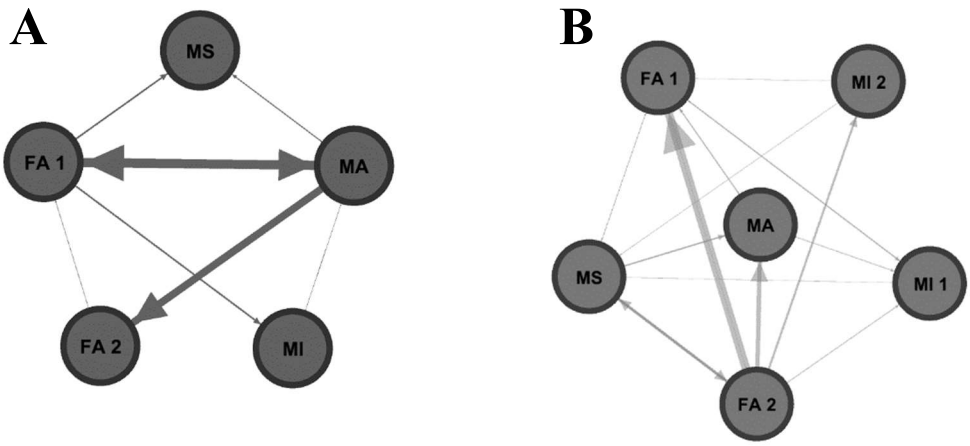


Figura 2: Redes direcionadas de catação para cada um dos grupos de bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*). A: indivíduos envolvidos na catação do grupo 3, no qual não participaram dois indivíduos; B: indivíduos do grupo 4, onde todos os indivíduos engajaram-se em sessões de catação.

Associação Espacial: As medidas individuais de força e de centralidade estão dispostas na tabela 3. Assim como os valores individuais da rede de catação, a força e a centralidade dos indivíduos foram diretamente correlacionadas ($p<0,05$). Contudo, os valores apresentaram pouca variação e o padrão não foi consistente entre os grupos. Fêmeas poderiam ou não ter altos valores, machos dominantes apresentam os valores máximos no G3, porém próximos aos valores mínimos no G4. O único padrão recuperado para os dois grupos foi o de os imaturos apresentarem altos valores.

Todos os indivíduos estiveram associados espacialmente a todos os membros em algum momento, resultado em rede totalmente conectada (Figs. 3a e 3b), com diâmetro 1, sem formação de módulos e graus médios similares (G3 com 6 e G4 com 5).

Os índices de associação entre díades mostraram associações preferidas em ambos os grupos. A preferência ocorreu entre todas as mães e suas respectivas crias, e entre FA2 e MA no G3 e entre MA e MS no G4. Com relação às associações evitadas, apenas no G4 isso foi detectado, com MA-MI1 e FA1-MI2 como as díades evitadas.

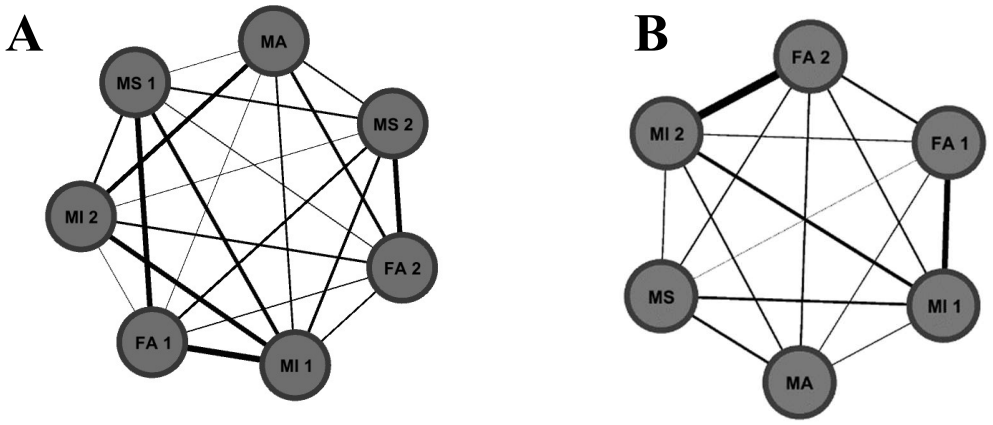


Figura 3: Rede de associação espacial para cada um dos grupos de bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*). A: rede do grupo 3; B: rede do grupo 4. As arestas estão proporcionais entre os grupos. As linhas indicam os índices de associação espacial da díade em questão.

Análise Conjunta

A díade que se associou consistentemente de maneira afiliativa (tanto espacialmente quanto na rede de catação) no G3 foram a FA2 e o MA. Já para o grupo 4, três díades associaram-se preferencialmente, sendo elas MA e MS; e ambas as fêmeas adultas com seus respectivos filhotes.

A ANOVA encontrou diferenças nos valores de força relacionados às categorias comportamentais (catação e espacial), mas não na centralidade e nem nos graus. Portanto, a força será analisada separadamente por comportamento. As análises de GLM mostraram que a variação nos graus (entrada, saída e médios, ponderados e não-ponderados) foi explicada principalmente pelo sexo. Apenas o grau de saída não-ponderado teve efeito da idade (imaturo). O grupo também explicou parte da variação nos graus ($p<0,05$). Esses efeitos não foram significativos quando analisados de maneira interativa ($p>0,5$). Já a força pelo GLM mostrou que apenas o sexo foi explicativo para a variação de todas as categoriais comportamentais. Portanto, o padrão mais consistentemente recuperado foi a influência do sexo.

Mudanças Demográficas

Conforme dito acima, o G3 apresentou composição do grupo variável ao longo de cada mês e a informação aqui destacada é a de imigração de uma fêmea adulta. Entre novembro de 2017 e janeiro de 2018, uma fêmea visitante foi perseguida inúmeras vezes

pela fêmea residente, culminando com cópulas frequentes com o macho dominante em janeiro de 2018 e consequente imigração para o grupo em março do mesmo ano. Ao longo deste processo, a rede de associações espaciais gradualmente se amplia (Fig. 4). Após sua imigração, ela mantém interações apenas com os indivíduos adultos, embora os valores de centralidade desta fêmea permanecessem muito baixos. Duas catações foram registradas entre ambas as fêmeas (imigrante e residente), embora demonstrações agressivas originadas da fêmea residente e direcionadas para a fêmea imigrante continuassem sendo registradas mesmo após a imigração.

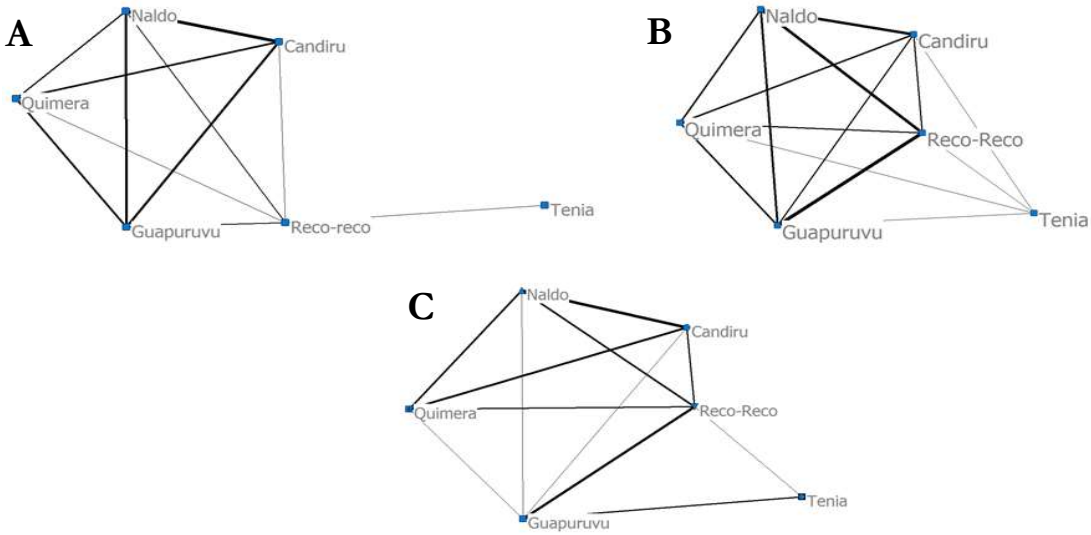


Figura 4: Redes de associação espacial do grupo 3 evidenciando a ampliação da fêmea visitante ao longo do tempo. **A:** padrão em dezembro de 2017; **B:** padrão até fevereiro de 2018; e **C:** padrão em março de 2018. Note a restrição da relação da fêmea imigrante (Tênia) para apenas os indivíduos adultos em **C.**

DISCUSSÃO

Tamanho e Composição de Grupo

Ambos os parâmetros foram relativamente constantes para os grupos do PECB. Os indivíduos que desapareciam eram substituídos pelo nascimento de filhotes ou imigração de novos membros, de forma que a conformação 1MA:2MA e um total de 6 indivíduos fosse mantida. Outros estudos realizados com essa espécie mostram pouca variação no tamanho do grupo, de 3 até 11, com média de 6,7 (ver revisão de FORTES *et al.,* 2015 e FERREGUETTI *et al.,* 2020), mesmo em populações que vivem em ilhas, como o caso de Ilha Grande, RJ (FERREGUETTI *et al.,* 2020) e Ilha do Cardoso, SP (INGBERMAN

et al., 2009). Contudo, ressalta-se a quase ausência de variação nos grupos do PECB, pois um grupo com 7 indivíduos foi avistado apenas uma vez e esse tamanho não se manteve por muito tempo.

A constância na composição entre os diversos grupos e momentos não é algo comumente relatado na literatura, pois é considerado que os grupos de *A. clamitans* possa incluir 1 a 2 machos adultos e duas a três fêmeas adultas, e a variação pode ocorrer em momentos distintos da história do grupo (STEINMETZ, 2000; MIRANDA *et al.,* 2004; MIRANDA & PASSOS, 2005; MIRANDA *et al.,* 2006; BICCA-MARQUES *et al.,* 2008; FERREGUETTI *et al.,* 2020). No trabalho de STEINMETZ (2000) com a mesma espécie e no mesmo contínuo florestal (Parque Intervales), a composição de um grupo acompanhado por um ano consistia em 2MA:1FA, sendo os demais membros do grupo, todos machos. Portanto, ainda que consistam no mesmo contínuo, a composição dos grupos foi diferente. Já no caso dos bugios de Ilha Grande (RJ) dos nove grupos identificados, apenas um apresentou dois machos adultos, embora os grupos pudessem apresentar 2 ou 3 FA (FERREGUETTI *et al.,* 2020). Ademais, a literatura não aponta para uma relação entre o tamanho do grupo e o tamanho do fragmento, visto que mesmo em um fragmento de grande tamanho como o PECB, os grupos apresentaram tamanhos e composições quase constantes (*e.g.* STEINMETZ, 2000).

O tamanho de grupo entre primatas sempre recebeu bastante atenção dos pesquisadores (CLUTTON-BROCK & HARVEY, 1977; JANSON & GOLDSMITH, 1995; SNAITH & CHAPMAN, 2007 apenas para citar alguns). Dentre as diversas pesquisas realizadas sobre o tema, ressaltam-se os benefícios – geralmente associados à proteção contra predadores – e malefícios – onde se enumeram os custos da competição por comida – da vida em grupo. Cada espécie e população tem tamanhos ótimos e tais tamanhos refletem dieta, locomoção e habitat (ALEXANDER, 1974; CLUTTON-BROCK & HARVEY, 1977), especialmente a competição por comida (WRANGHAM, 1980), sendo esse o maior custo da vida em grupo. Portanto, animais com baixa competição intragrupo poderiam conviver em grupos grandes, como é o caso de animais folívoros. Estes são comumente categorizados como espécies que competem pouco já que as folhas são abundantes no ambiente (SNAITH & CHAPMAN, 2007). Caso isso fosse absolutamente verdade, animais folívoros apresentariam grupos maiores, o que não acontece. Primatas folívoros vivem em grupos pequenos se comparados aos cercopitecídeos africanos, como os babuínos *Papio* spp., com seus grupos de mais de 100

indivíduos (SHARMAN & DUNBAR, 1982). Esse "paradoxo", como tem sido chamado, pode ser justificado pelo risco de infanticídio. CROCKETT & JANSON (2000), em seu estudo com *Alouatta juara*, detectaram que um grupo maior causava mais confusão pela paternidade e menor propensão dos machos em defender a prole. Essa hipótese talvez explique, ao menos parcialmente, o porquê de em nenhum dos grupos do PECB ter sido observado mais machos adultos, embora infanticídio ainda ocorra em espécies que vivem em grupos grandes (ENGH *et al.,* 2006). Contudo, é possível perceber que este é um tópico ainda longe de ser concluído.

Ausência de Fêmeas Jovens

Foi observada imigração tanto de indivíduos machos quanto de fêmeas entre os grupos do PECB. Ainda assim, um ponto que sobressaiu em ambos os trabalhos, o presente e o de STEINMETZ (2000), foi a ausência de fêmeas filhotes e jovens, apesar de a razão sexual de indivíduos adultos ter sido desviada para as fêmeas. Um trabalho recente analisou a razão sexual dos filhotes em várias espécies de bugios (DIAS *et al.,* 2020). A razão sexual foi ligeiramente desviada para machos em várias espécies (exceto *Alouatta seniculus*), embora estatisticamente a razão tenha tendido à uniformidade 1:1. De acordo com a modelagem dos autores, fêmeas tenderão a produzir mais filhotes machos quando as densidades populacionais forem altas. No caso do PECB, a densidade populacional parece ser baixa, o que vai de encontro a tal explicação.

Já o trabalho de TREVES (2001), também com várias espécies de bugio, porém indivíduos adultos, mostrou que o sucesso reprodutivo das fêmeas aumenta quando a razão sexual dos adultos é desviada para os machos. O autor também verificou que a presença de machos aumenta as chances de sobrevivência dos filhotes (VAN SCHAIK & HOSTERMANN, 1994; CROCKETT & JANSON, 2000). A diferença com relação a estes trabalhos é que, no presente estudo, havia apenas um macho adulto e reprodutivo, apesar de os demais membros também serem machos, porém imaturos. Em um dado momento, um dos machos subadultos (um em cada grupo) entrou na categoria adulto, sobrepondo sua presença com o macho mais velho e dominante. Esse macho recém-entrado na fase adulta desapareceu alguns meses depois. Portanto, esse desvio sexual para os machos não se refletiu em grupos com maior proporção de machos adultos, o que contrapõe com as questões levantadas nos trabalhos anteriores.

A preponderância de machos juvenis e adultos foi observada em outras espécies (e.g. *Alouatta caraya*, RUMIZ, 1990; e *A. seniculus*, RUDRAN & FERNANDEZ-

DUQUE, 2003). De acordo com RUMIZ (1990), o motivo pelo qual se observa mais machos que fêmeas nos grupos é que fêmeas maturam mais rapidamente e há maiores chances de deixarem seu grupo natal antes dos machos. Ainda que essa hipótese possa explicar o padrão, não justifica a ausência completa de recém-nascidos fêmeas. Portanto, outra hipótese levantada é com relação à sobrevivência diferencial entre sexos e, por que não, a hipótese do filho sexy, onde fêmeas com boas condições físicas têm maiores chances de produzir filhotes machos (WEATHERHEAD & ROBERTSON, 1979), onde se assume, então, que o PECB proveria excelentes condições às mães e estas produziriam mais filhotes machos.

Em consonância com essa hipótese, está a análise de DIAS *et al.* (2020) citada acima, que aponta para altas densidades populacionais, atingindo a capacidade de suporte do ambiente, como mecanismo regulador da razão sexual desviada para o nascimento de filhotes machos. Os autores ressaltam que a condição física das mães pode sim alterar o investimento diferenciado entre sexos. Esse é um dado extremamente interessante, porém demanda que uma mesma população seja acompanhada por diversos anos para se entender os mecanismos reguladores da razão sexual.

Rede de Catação

Nessa categoria comportamental, indivíduos imaturos engajaram-se menos nessa atividade (cataram e foram catados menos frequentemente). Afora isso, os grupos de bugios do PECB cataram-se com frequência similar ao relatado por outros trabalhos (Tabela 1). Contudo, novamente houve grande variação entre os dois grupos estudados. Enquanto o G3 apresentou baixas taxas – apesar de similares a outras espécies, como *A. palliata* –, o G4 apresentou uma das taxas mais altas registradas para o gênero. As diferenças descritas para *A. palliata* foram relacionadas à falta de coesão dos grupos, o que pode valer para o G3 (BERNSTEIN, 1964; RICHARD, 1970; SMITH, 1977; JONES, 1979). Nesse grupo, a baixa coesão pode ser interpretada como a variação na composição do grupo, seus baixos valores de catação e valores mais baixos de associação espacial.

No caso do presente estudo, apenas indivíduos adultos e subadultos engajaram-se nessa atividade. Para outras espécies do gênero *Alouatta*, indivíduos jovens também foram observados catando coespecíficos. Já os machos – dominantes ou não –, raramente cataram outros indivíduos (STEINMETZ, 2000; SÁNCHEZ-VILLAGRA *et al.*, 1998). Nesses estudos, nas raras vezes em que os machos adultos aderiram à catação, fêmeas ciclantes foram as principais receptoras (VAN BELLE & BICCA-MARQUES, 2015).

Entretanto, não foi possível definir se as fêmeas envolvidas no presente trabalho estavam ciclando ou não. Além disso, a catação, embora envolvesse frequentemente díades heterossexuais, não estava necessariamente associada ao contexto sexual (i.e. não foram sucedidas ou precedidas por cópula) e, portanto, não foi um indicador de solicitação sexual por nenhuma das partes (VAN BELLE & BICCA-MARQUES, 2015).

A diversidade de organizações sociais dos primatas também se expressa em uma diversidade de métricas de redes sociais, o que torna difícil uma comparação entre espécies (KASPER & VOELKL, 2009). Todavia, a categorização numérica, provida pela análise de redes sociais, permite que essa comparação seja possível. Estudos que incluíram a catação na análise de redes sociais mostraram métricas bem mais altas que as observadas no presente estudo. Por exemplo, em um estudo com indivíduos de *Macaca fuscata* provisionados, as métricas (ex. o diâmetro, o coeficiente de clustering etc) foram mais altas (ROMANO *et al.,* 2016). Esses índices, entretanto, não surpreendem na diferença, visto que ambas as espécies variam amplamente em diversos aspectos, em particular na catação. A catação é uma interação comum entre primatas antropóides, porém mais rara em primatas Neotropicais (DUNKEL, 2019).

Fêmeas adultas foram as mais "catadoras" e tal padrão já havia sido corroborado por CHIARELLO (1995) e SÁNCHEZ-VILLAGRA *et al.* (1998), e aparentemente é ubíquo aos primatas (SADE, 1965; STRUHSAKER, 1967; NEVILLE, 1972; SEYFARTH, 1977, 1980; AHUMADA, 1992). Em espécies em que fêmeas não-aparentadas coexistem em um grupo, como os gorilas e macacos japoneses, a preferência entre indivíduos para sessões de catação são entre animais familiares entre si (HARCOURT, 1979; MUROYAMA, 1991). Tal padrão pode ser verdadeiro para os bugios, visto que a migração bissexual do gênero se reflete em um parentesco e familiaridade reduzidos entre indivíduos adultos. No caso do presente estudo, fêmeas direcionam catações mais frequentemente a outras fêmeas, enquanto machos poderiam ou não dirigir seus comportamentos afiliativos a fêmeas com igual frequência, o que está de acordo com alguns estudos anteriores (MILTON *et al.,* 2016), porém diverge de outros (CHIARELLO, 1995). O conhecimento sobre a familiaridade é limitado já que só é possível saber se os indivíduos estavam juntos ou não ao início do estudo. Com relação ao parentesco, este não foi analisado, embora não haja indícios de que os indivíduos adultos sejam aparentados e, de acordo com outros trabalhos, o parentesco não é um preditor de interação em *Alouatta* (MILTON *et al.,* 2016).

As métricas individuais do presente trabalho apresentaram valores conflituosos. Por exemplo, uma única fêmea (G4 FA 2) foi a maior responsável pelas catações, enquanto o macho adulto do G3 foi o segundo maior. Enquanto o macho pode ter interesse em manter relações estreitas com outras fêmeas, confirmada pela direção de suas catações, a intenção da fêmea é tida como menos clara. Dentre os modelos propostos por SEYFARTH (1977) para explicar por que fêmeas eram as principais catadoras, estão incluídas mudanças no estado reprodutivo. Ademais, fêmeas com recém-nascido recebem mais catação (atração natal, GLANDER; 1974; MACK, 1979). Novamente, o status reprodutivo permanece desconhecido para as fêmeas em questão, e praticamente todas elas estavam com crias, agindo tanto como catadoras e quando alvos da catação. Portanto, não se pode descartar a possibilidade de atração natal. Além disso, diferenças individuais em níveis de catação foi também exposto no estudo de SÁNCHEZ-VILLAGRA *et al*. (1998).

CHIARELLO (1995) ressalta que fêmeas são subordinadas aos machos e, em geral, dominantes são mais atraentes para catação. O autor também discorre sobre o fato de que as fêmeas cataram com frequência após situações agonísticas, o que poderia ser interpretado como uma resolução de conflitos. De acordo com os presentes resultados, esse padrão não procede, já que as fêmeas cataram mais frequentemente outras fêmeas (que são supostamente subordinadas aos machos adultos). Ademais, as fêmeas foram as que mais iniciaram catações, e maiores taxas de catação estavam presentes no grupo mais afiliativo. Tal padrão converge com os achados em *A. palliata*, em que os dominantes catam indivíduos de menor status hierárquico (JONES, 1979). Os padrões de catação requerem mais estudos para se entender as direcionalidades.

Associação Espacial

Assim como as redes de catação, a associação espacial também apresentou resultados divergentes, com o único padrão recorrente o de valores altos para os imaturos. No caso dos bugios, os machos são designados centrais, e raramente são chamados de "dominantes". Entretanto a centralidade dos machos adultos não foi recuperada pela análise de redes da associação espacial. WHITEHEAD (2008) explica que a força de centralidade (aqui chamada de grau de centralidade) está intimamente associada ao tamanho do grupo. No caso dos grupos do PECB, o fato de serem reduzidos (máximo de 7 indivíduos) pode limitar a diferença dos valores observada entre os indivíduos. Portanto, o reduzido tamanho dos grupos pode impedir a categorização de machos dominantes como "centrais" a partir dos valores de centralidade.

É interessante perceber que, espacialmente, o grupo mais instável apresentou os maiores valores de associação e força. Além disso, apenas para a fêmea sem filhote (FA 2 do G3) é que houve maior associação entre ela e o MA. No caso do G4, onde ambas as fêmeas apresentaram filhotes dependentes, o MA apresentou maiores valores de associação ao MS. Pode-se especular que quando as fêmeas estão com filhotes, essa é a associação mais forte. Entretanto, na ausência de filhotes, as FA podem associar-se aos MA, ou com MS (na ausência de fêmeas disponíveis). Portanto, os presentes resultados corroboram o estudo de MILTON *et al.* (2016), em que os autores encontraram que o sexo explicou melhor os padrões de interação social e espacial.

Além dos valores de associação mais altos entre mães e seus filhotes, esses mesmos indivíduos imaturos apresentaram altos valores de força e centralidade, além dos valores elevados de associação entre os imaturos e os demais membros do grupo (particularmente para o G4). Esse posicionamento espacial pode estar relacionado a uma proteção do grupo ou, ao menos, proteção por parte da mãe (ARROYO-RODRÍGUEZ *et al.,* 2007; TOLENTINO *et al.,* 2008).

O posicionamento espacial entre indivíduos de um grupo pode ser relevante para a transmissão de informações ecológicas fundamentais para a sobrevivência como a vigilância, a coordenação de grupo e também a alimentação (RAMÓS-FERNANDEZ *et al.,* 2006). No estudo com *Alouatta palliata*, uma espécie que apresenta um grande tamanho de grupo, onde fissões e fusões são comuns. o sexo também foi fator determinante de formação de subgrupos (BEZANSON *et al.,* 2008). Esse estudo também detectou associações preferidas, como por exemplo fêmeas e alguns machos, como também foi observado no presente trabalho. Portanto, afora a associação entre mães e seus filhotes, associações heterossexuais entre indivíduos adultos parecem ser a segunda conformação preferida. Esse padrão está em sintonia com o levantado por BEZANSON e colaboradores (2008), onde machos parecem preferir associar-se a potenciais parceiras sexuais e fêmeas agrupam-se com suas proles, ou outras fêmeas adultas, focando no forrageio e sobrevivência dos filhotes.

Padrões de Interação e Associação Combinados

Os padrões de interação social e associação espacial foram complexos e bastante distintos entre os grupos. Os atributos individuais (sexo e idade) não influenciaram consistentemente em como os indivíduos se associaram a outros em nenhum grupo e em nenhuma rede. Os dados mostram alguns poucos padrões gerais e diversos padrões

específicos. Por exemplo, o único padrão consistente foi a associação espacial preferida entre mães e filhotes, porém não necessariamente associação preferida na rede de catação. Portanto, boa parte da variação pode ser explicada pelo sexo, embora mães e seus filhotes apresentaram-se como associações preferidas. Ademais, vale ressaltar que todas as fêmeas eram adultas e seus filhotes, machos. Portanto, a influência da maternidade pode estar ofuscando os padrões de interação entre machos e fêmeas. Adultos e subadultos envolveram-se mais nas interações, ao passo que os padrões de associação espacial mostraram maior efeito da maternidade, enquanto o status hierárquico dos machos adultos também não ditou os padrões de associação espacial e afiliativos. Aparentemente, há uma setorização entre atividades e entre indivíduos.

No caso dos grupos do presente estudo, o G3 apresentou menores taxas de catação e maior força de associação espacial, se comparado ao G4. Além disso, o território do G3 é metade do tamanho do G4. Portanto, contrário ao que JONES (1980) havia identificado, a distância reduzida entre indivíduos do G3 não facilitou interações. Adicionando-se a isso está a instabilidade da composição do grupo e a influência antrópica/efeito de borda ao qual o G3 está sujeito. Os grupos de bugios-ruivos são demasiado pequenos, de modo que com frequência as fêmeas do grupo estão com filhotes, ao passo que filhotes mais velhos possivelmente já migraram, ou migrarão em breve.

CONCLUSÕES

A relação mãe-filhote foi a principal força preditora dos padrões de associação espacial, seguido pelo sexo, o que contradiz as expectativas. As fêmeas foram as principais catadoras, porém os padrões de emissão e recepção não foram claros. Tal realidade possivelmente deve-se ao fato de que as maiores taxas de catação são provenientes de um único indivíduo, o que pode indicar personalidades distintas entre os animais. Finalmente, a associação espacial demonstrou que todos os indivíduos permaneceram próximos, raramente estavam sozinhos e os machos adultos, geralmente designados de “centrais”, não foram espacialmente centrais. Contudo, eles apresentam acesso prioritário a recursos alimentares e oportunidades de acasalamento. Os imaturos apresentaram os maiores valores de associação diádica, o que pode indicar uma iniciativa (in)consciente do grupo de manter sempre um indivíduo próximo aos imaturos como uma forma de proteção. Devido à grande variabilidade entre os grupos do presente trabalho, é necessário mais estudos e mais réplicas para se entender os padrões de interações sociais em bugios-ruivos.

REFERÊNCIAS

AHUMADA JA. 1992. Grooming behavior of spider monkeys (*Ateles geoffroyi*) on Barro Colorado Island, Panama. International Journal of Primatology, 13(1), 33-49.

ALEXANDER RD. 1974. The evolution of social behavior. Annual review of ecology and systematics, 5(1), 325-383.

ALTMANN J. 1974. Observational study of behaviour: sampling methods. Behaviour, 49, 227-267.

ARROYO-RODRÍGUEZ V, SERIO-SILVA JC, ÁLAMO-GARCÍA J & ORDANO M. 2007. Exploring immature-to-mother social distances in Mexican mantled howler monkeys at Los Tuxtlas, Mexico. American Journal of Primatology, 69(2), 173-181.

BERGSTROM ML & FEDIGAN LM. 2010. Dominance among female white-faced capuchin monkeys (*Cebus capucinus*): hierarchical linearity, nepotism, strength and stability. Behaviour, 899-931.

BERNSTEIN IS. 1964. A field study of the activities of howler monkeys. Animal Behavior, 12, 92-97.

BEZANSON M, GARBER PA, MURPHY JT & PREMO LS. 2008. Patterns of subgrouping and spatial affiliation in a community of mantled howling monkeys (*Alouatta palliata*). American Journal of Primatology, 70(3), 282-293.

BICCA-MARQUES JC. 2003. How do howler monkeys cope with habitat fragmentation?, p283-303. *In* Primates in Fragments: Ecology and Conservation (MARSH LK, ed.). Kluwer Academic, New York, USA.

BICCA-MARQUES JC, PRATES HM, DE AGUIAR FRC & JONES CB. 2008. Survey of *Alouatta caraya*, the black-and-gold howler monkey, and *Alouatta guariba clamitans*, the brown howler monkey, in a contact zone, State of Rio Grande do Sul, Brazil: evidence for hybridization. Primates, 49(4), 246-252.

BOLIN I. 1981. Male parental behavior in black howler monkeys (*Alouatta palliata pigra*) in Belize and Guatemala. Primates, 22(3), 349-360.

BORGATTI SP, EVERETT MG & JOHNSON JC (eds.). 2013. Analyzing social networks. Sage Publications, London, UK.

BOWLER M & BODMER R. 2009. Social behavior in fission–fusion groups of red uakari monkeys (*Cacajao calvus ucayalii*). American Journal of Primatology, 71(12), 976-987.

CHAPMAN CA, CHAPMAN LJ & WRANGHAM RW. 1995. Ecological constraints on group size: an analysis of spider monkey and chimpanzee subgroups. Behavioral Ecology and Sociobiology, 36, 59-70.

CHIARELLO AG. 1995. Grooming in brown howler monkeys, *Alouatta fusca*. American Journal of Primatology, 35(1), 73–81.

CLARKE MR & GLANDER, K. E. 2008. Natal emigration by both sexes in the La Pacifica population of mantled howlers: when do some stay?. American Journal of Primatology, 70(2), 195-200.

CLUTTON-BROCK TH. 1989. Mammalian mating systems. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 236, 339–372.

CLUTTON-BROCK TH & HARVEY PH. 1977. Primate ecology and social organization. Journal of Zoology, 183(1), 1-39.

CORTÉS-ORTIZ L, BERMINGHAM E, RICO C, RODRIGUEZ-LUNA E, SAMPAIO I & RUIZ-GARCIA M. 2003. Molecular systematics and biogeography of the Neotropical monkey genus, *Alouatta*. Molecular Phylogenetics and Evolution, v26(1), p64-81.

CRISTÓBAL-AZKARATE J & ARROYO-RODRÍGUEZ V. 2007. Diet and activity pattern of howler monkeys (*Alouatta palliata*) in Los Tuxtlas, Mexico: effects of habitat fragmentation and implications for conservation. American Journal of Primatology, 69(9), 1013-1029.

CROCKETT CM & EISENBERG JF. 1987. Howlers: Variations in Group Size and Demography. Primate Societies. The University of Chicago Press, Chicago, USA.

CROCKETT CM & JANSON CH. 2000. Infanticide in red howlers: female group size, male membership, and a possible link to folivory, p75-98. *In* Infanticide by males and its implications (VAN SCHAIK CP & JANSON CH, eds). Cambridge, Cambridge University Press, UK.

CROCKETT CM & POPE TR. 1993. Consequences of sex differences in dispersal for juvenile red howler monkeys. *In* Juvenile primates: life history, development and

behaviour (PEREIRA ME & FAIRBANKS LA, eds.). Oxford University Press, New York, USA.

DIAS PAD & RODRÍGUEZ-LUNA E. 2006. Seasonal changes in male associative behavior and subgrouping of *Alouatta palliata* on an island. International Journal of Primatology, 27(6), 1635-1651.

DIAS PA, MONTERO-DOMÍNGUEZ IL & RANGEL-NEGRÍN A. 2020. Factors influencing infant sex ratio in howler monkeys (*Alouatta* spp.): A literature review and analysis. American Journal of Physical Anthropology, 172(1), 48-57.

DI FIORE A, LINK A & CAMPBELL CJ. 2011. The atelines: behavioral and socioecological diversity in a New World monkey radiation, p155-188. *In* Primates in Perspective (CAMPBELL CJ, FUENTES A, MACKINNON MC, BEARDER SK & STUMPF RM, eds). Oxford University Press, New York, USA.

DUNKEL A. 2019. The Evolution of Grooming and Hand Use in Primates: An Interdisciplinary Perspective. Preprint.

EISENBERG JF (ed.). 1981. The mammalian radiations: An analysis of trends in evolution, adaptation and behavior. University of Chicago Press, Chicago, USA.

ENGH AL, BEEHNER JC, BERGMAN TJ, WHITTEN PL, HOFFMEIER RR, SEYFARTH RM & CHENEY DL. 2006. Female hierarchy instability, male immigration and infanticide increase glucocorticoid levels in female chacma baboons. Animal Behaviour, 71(5), 1227-1237.

FERREGUETTI AC, OLIVEIRA A, PEREIRA BC, SANTORI RT. GEISE L & BERGALLO HG. 2020. Encounter rate and behavior of *Alouatta guariba clamitans* in the Ilha Grande State Park, Rio de Janeiro state, Brazil. Zoologia (Curitiba), 37, e36846.

FORTES VB, BICCA-MARQUES JC, URBANI B, FERNÁNDEZ VA & DA SILVA PEREIRA T. 2015. Ranging behavior and spatial cognition of howler monkeys, p219-259. *In* Howler Monkeys: Behaviour, Ecology and Conservation (KOWALEWSKI MM, GARBER PA, CORTÉS-ORTIZ L, URBANI B & YOULATOS D, eds.). Springer, New York, USA.

GLANDER KE. 1974. Baby-sitting, infant sharing and adaptive behavior in mantled howling monkeys. American Journal of Physical Anthropology, 41, 482.

GOLDIZEN AW. 1987. Facultative polyandry and the role of infant-carrying in wild saddle-back tamarins (*Saguinus fuscicollis*). Behavioral Ecology and Sociobiology, 20(2), 99-109.

HARCOURT AH. 1979. Social relationships among adult female mountain gorillas. Animal Behaviour, 27, 251-264.

HENZI SP, LYCETT JE & WEINGRILL T. 1997. Cohort size and the allocation of social effort by female mountain baboons. Animal Behaviour, 54(5), 1235-1243.

HINDE RA. 1983. Primate Social Relationships. Blackwell, London, UK.

HOLEKAMP KE, COOPER SM, KATONA CI, BERRY NA, FRANK LG & SMALE L. 1997. Patterns of association among female spotted hyenas (*Crocuta crocuta*). Journal of Mammalogy, 78(1), 55-64.

HORWICH RH, BROCKETT RC & JONES CB. 2000. Alternative male reproductive behaviors in the Belizean black howler monkey (*Alouatta pigra*). Neotroprical Primates, 8, 95–98.

INGBERMAN B, FUSCO-COSTA R, MONTEIRO-FILHO EL. 2009. Population survey and demographic features of a coastal island population of *Alouatta clamitans* in Atlantic Forest, southeastern Brazil. International Journal of Primatology 30(1): 1

JANSON CH & GOLDSMITH ML. 1995. Predicting group size in primates: foraging costs and predation risks. Behavioral Ecology, 6(3), 326-336.

JONES CB. 1979. Grooming in the mantled howler monkey, *Alouatta palliata* Gray. Primates, 20, 289-292.

JONES CB. 1980. The functions of status in the mantled howler monkey, *Alouatta palliata* Gray: intraspecific competition for group membership in a folivorous neotropical primate. Primates, 21(3), 389-405.

KANO T. 1982. The social group of pygmy chimpanzees (*Pan paniscus*) of Wamba. Primates, 23(2), 171-188.

KAPPELER PM. 1999. Primate socioecology: new insights from males. Naturwissenschaften, 86(1), 18-29.

KAPPELER PM & VAN SCHAIK CP. 2002. Evolution of primate social systems. International Journal of Primatology, 23, 707-740.

KASPER C & VOELKL B. 2009. A social network analysis of primate groups. Primates, 50(4), 343-356.

KOWALEWSKI M & GARBER PA. 2014. Solving the collective action problem during intergroup encounters: the case of black and gold howler monkeys, p165-191. *In* Howler Monkeys: Behaviour, Ecology and Conservation (KOWALEWSKI MM, GARBER PA, CORTÉS-ORTIZ L, URBANI B & YOULATOS D, eds.). Springer, New York, USA.

MACK D. 1979. Growth and development of infant red howling monkeys (*Alouatta seniculus*) in a free ranging population, p126-136. *In* Vertebrate Ecology in the Northern Neotropics (EISENBERG JF, ed.), Smithsonian Press, Washington DC, USA.

MANSON JH, NAVARRETE CD, SILK JB & PERRY S. 2004. Time-matched grooming in female primates? New analyses from two species. Animal Behaviour, 67(3), 493-500.

MENDES SL 1989. Estudo ecológico de *Alouatta fusca* (Primates: Cebidae) na Estação Biológica de Caratinga, MG. Revista Nordestina de Biologia, 6, 271–104.

MILTON K, NOLIN DA, ELLIS K, LOZIER J, SANDEL B & LACEY EA. 2016. Genetic, spatial, and social relationships among adults in a group of howler monkeys (*Alouatta palliata*) from Barro Colorado Island, Panama. Primates, 57(2), 253-265.

MIRANDA JMD, BERNARDI IP, MORO-RIOS RF, AGUIAR LM, LUDWIG G & PASSOS FC. 2004. Social structure of *Alouatta guariba clamitans*: a group with a dominant female. Neotropical Primates, 12, 135–138.

MIRANDA JMD & PASSOS FC. 2005. Composição e dinâmica de grupos de *Alouatta guariba clamitans* Cabrera (Primates, Atelidae) em Floresta Ombrófila Mista no Estado do Paraná, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia, 22, 199–106.

MIRANDA J, BERNARDI IP, MORO-RIOS RF & PASSOS FC. 2006. Three years on demography of a group of *Alouatta guariba clamitans* Cabrera (Primates, Atelidae): growth and fragmentation. Revista Brasileira de Zoologia, 23(3), 703-706.

MORO-RIOS RF, MIRANDA JMD & DE CAMARGO PASSOS F. 2009. Relações sociais, emigração e fissão de um grupo de *Alouatta guariba clamitans* em um remanescente de floresta ombrófila mista. Neotropical Primates, 16(2), 57-61.

MUROYAMA Y. 1991. Mutual reciprocity of grooming in female Japanese macaques (*Macaca fuscata*). Behaviour, 119(3-4), 161-170.

NEVILLE MK. 1972. Social relations within troops of red howler monkeys (*Alouatta seniculus*). Folia Primatologica, 18(1-2), 47-77.

OKKO H & JOHNSTONE RA. 1999. Social queuing in animal societies: a dynamic model of reproductive skew. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 266, 571-578.

PASTOR-NIETO R. 2015. Health and welfare of howler monkeys in captivity, p313-357. *In* Howler Monkeys: Behavior, Ecology, and Conservation (KOWALEWSKI MM, GARBER PA, CORTÉS-ORTIZ L, URBANI B & YOULATOS D, eds.). Springer, New York, USA.

PLANO DE MANEJO, 2015. Título: Plano de Manejo Parque Estadual Carlos Botelho. Unidades de Terreno do Parque. Disponível em < http://s.ambiente.sp.gov.br/fundacaoflorestal/planos-manejo/VolumePrincipalCompleto.pdf >. Último acesso em agosto de 2020

RAMOS-FERNANDEZ G, BOYER D & GÓMEZ VP. 2006. A complex social structure with fission-fusion properties can emerge from a simple foraging model. Behavioral Ecology and Sociobiology, 60, 536–49.

RICHARD A. 1970. A comparative study of the activity patterns and behavior of *Alouatta villosa* and *Ateles geoffroyi*. Folia Primatologica,2(4), 241.

ROMANO V, DUBOSCQ J, SARABIAN C, THOMAS E. SUEUR C & MACINTOSH AJ. 2016. Modeling infection transmission in primate networks to predict centrality-based risk. American Journal of Primatology, 78(7), 767-779.

RUDRAN R & FERNANDEZ-DUQUE E. 2003. Demographic changes over thirty years in a red howler population in Venezuela. International Journal of Primatology, 24(5), 925-947.

RUMIZ DI. 1990. *Alouatta caraya*: population density and demography in northern Argentina. American Journal of Primatology, 21(4), 279-294.

SADE DS. 1965. Some aspects of parent offspring and sibling relations in a group of rhesus monkeys, with a discussion of grooming. American Journal of Physical Anthropology, 23, 1-1.

SÁNCHEZ-VILLAGRA MR, POPE TR & SALAS V. 1998. Relation of intergroup variation in allogrooming to group social structure and ectoparasite loads in red howlers (*Alouatta seniculus*). International Journal of Primatology, 19(3), 473-491.

SEYFARTH RM. 1977. A model of social grooming among adult female monkeys. Journal of Theoretical Biology, 65, 67-698.

SEYFARTH RM. 1980. The distribution of grooming and related behaviours among adult female vervet monkeys. Animal Behaviour, 28, 798-813.

SHARMAN M & DUNBAR RIM. 1982. Observer bias in selection of study group in baboon field studies. Primates, 23(4), 567-573.

SMITH CC. 1977. Feeding behavior and social organisation in howling monkeys. p97-126. *In* Primate Ecology: studies of feeding and ranging behavior of lemurs, monkeys and apes (CLUTTON-BROCK TH, ed.). Academic Press, London, UK.

SNAITH TV & CHAPMAN CA. 2007. Primate group size and interpreting socioecological models: do folivores really play by different rules?. Evolutionary Anthropology,16(3), 94-106.

STEINMETZ S. 2000. Ecologia e comportamento do bugio (*Alouatta fusca clamitans*) no Parque Estadual Intervales. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

STRIER KB, BOUBLI JP, POSSAMAI CB & MENDES SL. 2006. Population demography of northern muriquis (*Brachyteles hypoxanthus*) at the Estação Biológica de Caratinga/Reserva Particular do Patrimônio Natural-Feliciano Miguel Abdala, Minas Gerais, Brazil. American Journal of Physical Anthropology, 130(2), 227-237.

STRUHSAKER TT. 1967. Social structure among vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*). Behaviour, 29(2), 83-121.

TOLENTINO K, ROPER JJ, PASSOS FC & STRIER KB. 2008. Mother–offspring associations in northern muriquis, *Brachyteles hypoxanthus*. American Journal of Primatology, 70(3), 301-305.

TREVES A. 2001. Reproductive consequences of variation in the composition of howler monkey (*Alouatta* spp.) groups. Behavioral Ecology and Sociobiology, 50(1), 61-71.

VAN BELLE S & BICCA-MARQUES JC. 2015. Insights into reproductive strategies and sexual selection in howler monkeys, p57-84. *In* Howler Monkeys: Adaptive radiation, systematics, and morphology (KOWALEWSKI, MM, GARBER PA, CORTÉS-ORTIZ L, URBANI B & YOULATOS D, eds). Springer, New York, USA.

VAN BELLE S & ESTRADA A. 2006. Demographic features of *Alouatta pigra* populations in extensive and fragmented forests p121-142. *In* New perspectives in the study of Mesoamerican primates (ESTRADA A, GARBER PA, PAVELKA MM, LUECKE L, eds.). Springer, Boston, EUA.

VAN BELLE S, ESTRADA A & STRIER KB. 2008. Social relationships among male *Alouatta pigra*. International Journal of Primatology, 29, 1481–1498.

VAN BELLE S, ESTRADA A, ZIEGLER TE & STRIER KB. 2009. Social and hormonal mechanisms underlying male reproductive strategies in black howler monkeys (*Alouatta pigra*). Hormones and Behavior, 56, 355–363.

VAN BELLE S, GARBER PA, ESTRADA A & DI FIORE A. 2014. Social and genetic factors mediating male participation in collective group defence in black howler monkeys. Animal Behaviour, 98, 7–17.

VAN SCHAIK CP & HORSTERMANN M. 1994. Predation risk and the number of adult males in a primate group: a comparative test. Behavioral Ecology and Sociobiology, 35(4), 261-272.

WANG E & MILTON K. 2003. Intragroup social relationships of male *Alouatta palliata* on Barro Colorado Island, Republic of Panama. International Journal of Primatology, 24, 1227–1243.

WATERMAN JM. 1997. Why do male Cape ground squirrels live in groups?. Animal Behaviour, 53(4), 809-817.

WEATHERHEAD PJ, & ROBERTSON RJ. 1979. Offspring quality and the polygyny threshold:" the sexy son hypothesis". The American Naturalist, 113(2), 201-208.

WHITEHEAD H. 2008. Analyzing animal societies: quantitative methods for vertebrate social analysis. Chicago: The University of Chicago Press.

WHITEHEAD H. 2009. SOCPROG programs: analysing animal social structures. Behavioral Ecology and Sociobiology, 63(5), 765-778.

WITTENBERGER JF & TILSON RL. 1980. The evolution of monogamy: hypotheses and evidence. Annual Review of Ecology and Systematics, 11(1), 197-232.

WRANGHAM RW. 1980. An ecological model of female-bonded primate groups. Behaviour, 75, 262-299.

WRIGHT PC. 1986. Ecological correlates of monogamy in *Aotus* and *Callicebus*. Primate ecology and conservation, 2, 159-167.

ZHANG P & WATANABE K. 2007. Extra-large cluster formation by Japanese macaques (*Macaca fuscata*) on Shodoshima Island, central Japan, and related factors. American Journal of Primatology, 69(10), 1119-1130.

ZUCKER EL & CLARKE MR. 1998. Agonistic and affiliative relationships of adult female howlers (*Alouatta palliata*) in Costa Rica over a 4-year period. International Journal of Primatology, 19(3), 433-449.

CAPÍTULO III

ANALISANDO DIFERENÇAS INDIVIDUAIS NO CUIDADO MATERNO: PODEMOS APLICAR AS CATEGORIAS DE CATARRHINI EM BUGIOS-RUIVOS (*Alouatta clamitans*)?

RESUMO

O cuidado materno dos mamíferos compreende um conjunto de comportamentos vital para o desenvolvimento dos filhotes. Contudo, apesar de sua importância, há drásticas diferenças individuais intraespecíficas. Entre os primatas Catarrhini, a variação individual no cuidado materno é classificada de acordo com um gradiente, sendo um extremo "rejeitador" e o outro "protetor". Visto que tal categorização depende da observação frequente de interações e que esses grupos interagem mais do que outras populações, o objetivo do presente trabalho é investigar a adequação das categoriais de estilo materno a uma espécie de primata Neotropical que pouco interage, o bugio-ruivo (*Alouatta clamitans*). Também se comparou outras fontes de informação comportamental para detecção de variação individual. Quatro díades foram acompanhadas assiduamente por um ano (2018), onde se coletaram dados comportamentais pelo método de animal focal para análise do estilo materno, varredura para cálculo da associação espacial e índice de Hinde. A maioria das categorias foi extremamente rara e apenas o tempo em contato físico foi altamente variável entre as fêmeas, sendo esta a única variável significativa. Apesar disso, os índices de associação espacial foram iguais entre as mães, assim como a análise do estilo materno não foi capaz de detectar diferenças individuais. A categoria mais adequada para detecção de diferenças individuais no cuidado materno em bugios é o percentual em contato com o filhote, analisado a partir do focal, um padrão recorrente para a família Atelidae. Como direções futuras, sugere-se o estudo das consequências para a sobrevivência e o desenvolvimento dos filhotes, além dos possíveis efeitos de hormônios proteicos nas mães e os diferentes padrões individuais.

Palavras-chave: Cuidado parental; estilo materno; personalidade; associação espacial; interação mãe-filhote

INTRODUÇÃO

Diferenças individuais consistentes no comportamento têm recebido atenção dos pesquisadores há mais de 20 anos, quando se documentaram "personalidades" em mamíferos, aves, lagartos, sapos, peixes, moluscos e artrópodes (GOSLING, 2001). O termo personalidade, entretanto, ainda é utilizado com cautela por alguns pesquisadores, que preferem chamar de temperamento (RÉALE *et al.,* 2007) ou de "síndromes comportamentais" (SIH *et al.,* 2003). Síndromes comportamentais são definidas como um conjunto de comportamentos correlacionados, porém o nível analisado não é necessariamente um indivíduo, podendo ser designado para um grupo, população ou espécie.

O estudo das variações individuais mostra que os comportamentos não são infinitamente plásticos, tampouco engessados. Determinados comportamentos, sejam eles designados síndromes, personalidades ou estereotipias, podem alterar a trajetória de um indivíduo em um determinado contexto. Apesar da importância do cuidado materno para os mamíferos, o comportamento não é inalterável e existe ampla variação intraespecífica, com diferentes fêmeas apresentando variações individuais. Por exemplo, trabalhos tradicionais demonstraram que mães primíparas tendiam a fornecer um cuidado materno menos adequado do que mães multíparas (ver trabalho de SEAY, 1966 e as referências ali inclusas). Mães também podem ajustar seu cuidado materno dependendo do sexo da prole (ALLEVA *et al.,* 1989; HINDE, 2009), posição hierárquica (LEE, 1984; ALTMANN & SAMUELS, 1992), ou até mesmo ordem de nascimento (JACOBS & MOSS, 1976).

Especificamente no que tange o cuidado materno, diferenças individuais geralmente resultam em distintas trajetórias de vida do filhote. No caso do icônico estudo de BARDI & HUFFMAN (2002), filhotes de mães rejeitadoras iniciam contato mais frequentemente com outros membros do grupo, embora também chorassem mais que filhotes de mães protetoras mesmo em idade avançada. Os efeitos no desenvolvimento dos filhotes podem ser duradouros, como no caso dos chimpanzés e bonobos (DE LATHOUWERS & VAN ELSACKER, 2004), ou aparentemente breve, como no caso dos *Macaca* (BARDI & HUFFMAN, 2002).

Algumas personalidades podem ser herdáveis e apresentarem consequências para a sobrevivência do indivíduo (e.g. SZYF *et al.,* 2008). Porém, as alterações no programa

epigenético estão limitadas ao período inicial pós-natal (MEANEY & SZUF, 2005). Apesar de um período restrito, as influências podem ser duradouras. Em um estudo com ratos de laboratório, mães mais "cuidadoras" (*high lick-groom*) alteraram a expressão dos receptores de glicocorticoides, de modo que seus filhotes eram menos reativos à ação do cortisol e, portanto, mais tranquilos, se comparados aos filhotes das ratas menos cuidadoras (*low lick-groom*) (MOORE, 2017).

Diferenças individuais podem ter implicações amplas, como a nível populacional. Em geral, filhotes de mães rejeitadoras tornam-se independentes mais cedo e são mais engenhosos e "empreendedores", iniciando contato e mantendo-se próximos a outros indivíduos. Em outras palavras, são mais sociais. Por outro lado, esses mesmos filhotes podem ser mais petulantes, ansiosos e estressados, e uma mãe altamente rejeitadora pode resultar em um cuidado materno inadequado, levando o filhote à morte (ver revisão de FAIRBANKS, 1996). Já os filhotes de mães protetoras são cautelosos com relação a novidades e situações desafiadoras, desenvolvendo-se mais lentamente e mantendo-se próximos às mães até idade tardia, porém vivos. Em determinados contextos, como reação a predadores, filhotes ousados ou cautelosos podem ter sua benesse, de modo que haja compensações (*trade-offs*) em um ou em outro (SIH *et al.,* 2003). O entendimento da influência que o cuidado materno pode ter na história de vida dos filhotes mostra profundas consequências populacionais, haja vista que determinados comportamentos maternos podem atuar na sobrevivência dos indivíduos.

O termo "estilo materno" tem sido, então, utilizado para descrever o padrão de cuidado materno que seja consistente ao longo do tempo e entre filhotes de uma mesma fêmea (FAIRBANKS, 1989; BERMAN, 1990). O termo abrange dois extremos categorizados como "protetora" e "rejeitadora", e um padrão intermediário chamado "*laissez-faire*" (FAIRBANKS, 1996). Mães protetoras mantêm contato de maior duração com os filhotes, restringem seus movimentos com maior frequência e, quando afastados, ficam de vigília durante mais tempo. Em contrapartida, mães rejeitadoras interrompem e impedem contato mais frequentemente, e também permanecem distantes de seus filhotes por mais tempo. Entre esses extremos, as mães "*laissez-faire"* são mais tolerantes ao contato, mas não restringem o movimento dos filhotes tanto quanto as mães protetoras (ALTMANN, 1980; FAIRBANKS & MCGUIRE, 1988; MAESTRIPIERI, 1994).

Animais com longos períodos de cuidado materno são excelentes modelos para esse tipo de estudo, como os elefantes *Loxodonta africana* (LEE & MOSS 1986) e cetáceos

Tursiops sp. (HILL *et al*. 2007). Os primatas apresentam não apenas extenso período de cuidado, mas também rico repertório comportamental e, em geral, mais intuitivamente interpretados, de modo que o cuidado materno tenha sido estudado em diversos gêneros (FAIRBANKS & MCGUIRE, 1988; BERMAN, 1990; MAESTRIPIERI, 2001; DE LATHOUWERS & VAN ELSACKER, 2004). Os comportamentos categorizados para os primatas Catarrhini (PC) são refinados e complexos. FAIRBANKS (1996) e BARDI & HUFFMAN (2002), por exemplo, descrevem cerca de oito categorias de interações mãe-filhote em Catarrhini cercopithecídeos. Contudo, os primatas Platyrrhini (PP) diferem com relação às interações sociais. Tomemos como exemplo um comportamento clássico, a catação. Os PP catam-se menos (em algumas espécies sequer é registrada), ao passo que as sessões de catação do PC podem durar horas (DUNKEL, 2019).

Entre os PP, o cuidado materno foi estudado em poucas espécies, geralmente indivíduos cativos de *Callithrix jacchus* (SAITO & NAKAMURA, 2011; TAYLOR & FRENCH, 2015). A análise do cuidado inclui, fundamentalmente, a duração e a frequência do transporte e da amamentação (FRAGASZY *et al.,* 1991; VAN ELSACKER *et al.,* 1992; ROSS *et al.,* 2010). A proximidade espacial também tem sido um aspecto relevante no estudo de interações entre mães e filhotes de PP (e.g. SEKULIC, 1983; MILTON *et al.,* 2016). Contudo, até o momento não há trabalhos que tenham aplicado as categoriais tradicionais de FAIRBANKS (1996), propostas para PC, às espécies de PP.

Os bugios (gênero *Alouatta*) são notórios por sua natureza letárgica e algumas espécies, como *A. pigra*, podem passar até 80% de seu tempo descansando e apresentam baixas taxas de interação (HORWICH *et al.,* 1993), de modo que o tempo destinado para interações social seja restrito. É possível, portanto, que isso explique o porquê de poucos trabalhos terem analisado o cuidado materno esmiuçadamente para o gênero. Um desses trabalhos apresentou uma abordagem engenhosa para contornar as baixas taxas de interação, utilizando a vigilância materna pelo olhar (TREVES *et al*. 2003), enquanto outros utilizaram a abordagem da associação espacial, como dito acima (e.g. MILTON *et al.,* 2016). Nenhum dos trabalhos encontrou – ou avaliou – diferenças individuais consistentes entre mães.

O bugio-ruivo (*Alouatta guariba*) é uma espécie comum, distribuída por boa parte do leste brasileiro (CORTÉS-ORTIZ *et al*., 2003). Ao longo dos últimos três anos, a espécie se tornou uma das mais ameaçadas do mundo por conta de uma severa redução nas populações após um surto de febre amarela (BUSS *et al.,* 2019), enfatizando a

necessidade de se entender comportamentos essenciais para a manutenção de populações na natureza. O período de lactação e desenvolvimento são razoavelmente curtos para um primata desse tamanho (6.5kg, ROBINSON & REDFORD, 1986), na qual as mães dão à luz filhos únicos após uma gestão de cerca de seis meses, desmamando-os por volta dos 10-18 meses de idade (RAGUET-SCHOFIELD & PAVÉ, 2015). Durante as primeiras semanas pós-natais, a mãe carrega o filhote exclusivamente no ventre e ele raramente interage com outros indivíduos. Com poucos meses de vida, os filhotes complementam sua rede de interações com outros membros do grupo (CLARKE *et al*., 1998; MIRANDA *et al*., 2005; RAGUET-SCHOFIELD & PAVÉ, 2015). Estudos sobre comportamento e variação no cuidado materno permanecem escassos para esta espécie.

Portanto, o objetivo do presente trabalho é testar as categoriais tradicionalmente descritas para os Catarrhini a um Platyrrhini de vida livre, o bugio-ruivo (*Alouatta guariba*). Também se comparou com índices de associação espacial na expectativa de entender qual o melhor preditor de variação individual para este primata que pouco interagi, apesar de a população interagir mais que a média (SOBRAL, 2020). Nossos resultados podem auxiliar no entendimento do cuidado materno e evidenciar as diferenças das interações sociais entre primatas Platyrrhini e Catarrhini.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo

O estudo foi realizado no Parque Estadual Carlos Botelho (PECB), São Paulo, Brasil, um fragmento com cerca de 38.000 ha. O índice pluviométrico é de 1.700mm a 2.400mm distribuídos em períodos de chuva bem definidos no verão (dezembro a março), alternando-se com períodos de menor pluviosidade no inverno, e temperatura variando entre 4 (inverno) e 35°C (verão). A altitude da região variou entre 700 e 850 m anm. A vegetação é composta por Floresta Ombrófila Denso-Montana e Sub-Montana, majoritariamente primária (PLANO DE MANEJO, 2015).

Grupos de Interesse

Na região de estudo, há seis grupos vizinhos de bugios, sendo que dois deles (G3 e G4) foram acompanhados assiduamente entre novembro de 2017 e dezembro de 2018. Os animais podem ser identificados individualmente por características singulares, como formato do rosto, marcas naturais, cicatrizes e despigmentação. Cada grupo era composto

por sete indivíduos, sendo dois deles fêmeas adultas e seus filhotes dependentes. Além dessa díade (mãe e seu filhote), o parentesco entre os demais indivíduos é desconhecido.

Coleta de Dados Comportamentais

Cada díade foi observada por cerca de nove horas por dia, durante cinco dias por mês (ca. 1.200h de contato, sendo 640h para o G3 e 570h para o G4). Dados comportamentais consistiram em dois métodos distintos e excludentes, sendo eles o animal focal e a varredura (ALTMANN, 1974).

A duração de cada díade focal foi de 10 minutos gravados em vídeo. As sessões de observação foram distribuídas aleatoriamente entre 6h e 19h, concentradas durante os períodos de descanso quando os animais interagiam mais, sendo esse um viés do estudo. O orçamento de atividades por hora está apresentado na Figura 1.

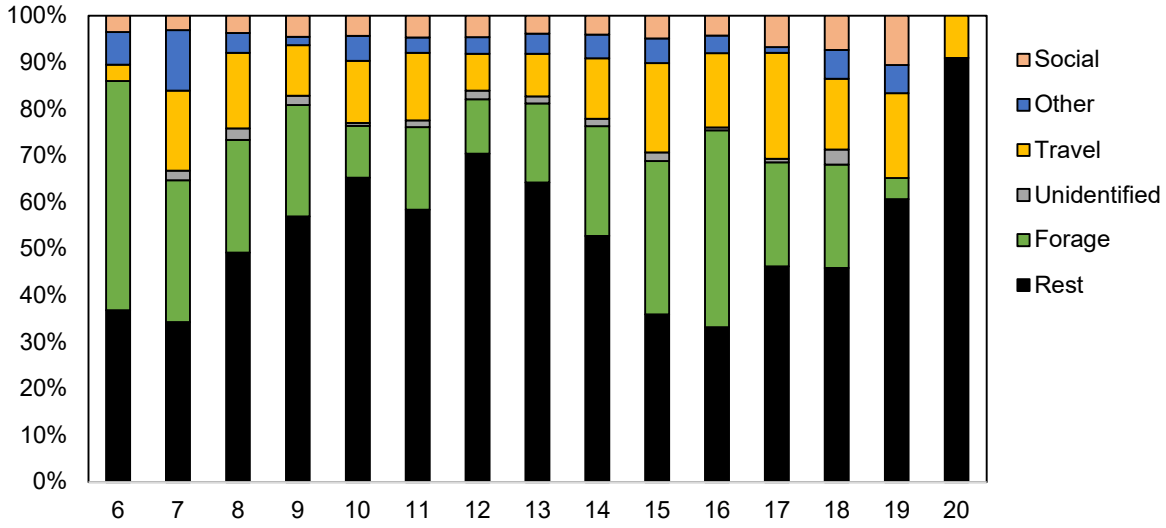


Figura 1: Orçamento de atividade por hora nos dois grupos de bugios-ruivos *(Alouatta clamitans*) conjuntamente. Um dia completo compreendeu a duração das 6 às 20h (verão), porém um maior número de observações ocorreu entre 7 e 19h.

A gravação acompanhou os indivíduos mesmo quando apenas um dos membros da díade se encontrava no quadrante. A preferência era de manter a mãe no quadrante, embora isso nem sempre fosse possível. Por vezes, o bloqueio da vegetação ou o deslocamento dos animais impedia a observação. Esse tempo foi considerado como "fora de visão" e desconsiderado do tempo total de 10 minutos do focal. O método animal focal foi aplicado a todas às mães com filhotes dos grupos G3 e G4. Essas díades consistiram na fêmea Reco-Reco e seu filhote Cuíca (díade RRC), que pertenciam ao G3; a mãe Lolô

e seu filhote Manu (LM) e a mãe Teresa e seu filhote Tiê (TTi), sendo esses membros do G4. O total de horas de observação para cada foi 217 horas para LM; 123 horas para RRC e 183 horas para TTi.

Já os dados para associação espacial consistiram em varredura instantânea a cada 20 minutos (*scan sampling*, ALTMANN, 1974), onde o vizinho mais próximo foi registrado. As varreduras foram conduzidas em 40 dias distintos no G3 e 52 dias no G4, com uma média de 95 varreduras por dia (mínimo 4 e máximo 190), totalizando 3.655 registros para o G3 e 3.659 para o G4. Todos os indivíduos apresentaram igual probabilidade de serem observados durante as varreduras. Estes dados foram coletados para as três díades anteriores, assim como para a díade Reco-Reco e seu filhote mais velho, Naldo (RRN), entre novembro de 2017 e dezembro de 2018.

Comportamento Materno

Seguindo-se os parâmetros de FAIRBANKS (1996) e BARDI & HUFFMAN (2002), as seguintes categoriais comportamentais foram registradas no focal:

i) Tempo em contato físico. Calculado pelo percentual de tempo em que a díade passa em contato;
ii) Contatos físicos iniciados pela mãe. Contagem de eventos;
iii) Contatos físicos rompidos pela mãe. Contagem de eventos;
iv) Afastamentos realizados pela mãe, aumentando a distância entre a díade para mais de 1m. Contagem de eventos;
v) Aproximações realizadas pela mãe, diminuindo a distância da díade para menos de 1m. Contagem de eventos;
vi) Tempo catando o filhote. Calculado pelo percentual de tempo em que a mãe passa catando o seu filhote;
vii) Restrição. Número de tentativas do filhote de romper contato que foram prevenidas pela mãe;
viii) Rejeição. Número de tentativas de contato do filhote que foram rejeitados pela mãe.

Adicionalmente, também foram incluídas as seguintes categorias:

ix) Agressão. Número de comportamentos agressivos direcionados ao filhote (e qual comportamento);

x) Amistoso. Número de comportamentos amistosos direcionados ao filhote (e qual comportamento);
xi) Latência. Tempo de reação quando seu filhote se afasta mais de 1m.

Adequação das Categorias de Cuidado Materno

Com relação aos comportamentos analisados pela varredura, houve a necessidade de adaptar as categorias propostas para Catarrhini. Para tanto, foram realizadas as seguintes adequações:

Tempo em contato. Foi computado o tempo total de contato entre a díade estava em contato físico, mesmo que o contato fosse sutil, como apenas a ponta dos dedos ou a cauda. Exemplos incluem contato cauda-cauda, filhote presos à mãe pela própria cauda ou em contato com a cauda da mãe;

Contatos físicos iniciados/interrompidos pela mãe;

Tempo catando o filhote. Eventos de catação foram identificadas quando um indivíduo (emissor) passava uma mão ou duas pela pelagem do receptor em qualquer parte do corpo, podendo ser acompanhado ou não pela boca;

Restrição. Foi considerado como restrição quando o filhote tentava se afastar, porém a mãe o impedia. O comportamento restritivo foi interpretado quando a mãe se curvava, enrolando o próprio corpo como uma bola e mantendo o filhote na região ventral, impedindo que o filhote se afastasse;

Rejeição. A rejeição podia ser sutil, como a mãe se afastar do filhote enquanto este tenta contato físico. Outros comportamentos de rejeição incluíram bloqueio com os ombros, mãos ou braços quando o filhote tentava montar na mãe ou acessar o mamilo.

As categorias foram transformadas em frequência (comportamentos/segundo) para cada sessão de observação. Entretanto, uma análise preliminar mostrou que não apenas havia muitos zeros (85% dos dados), mas também uma taxa extremamente baixa. Dessa forma, decidiu-se agrupar as categoriais em “negativo” (os itens iii, iv, viii e ix) ou “positivo” (itens ii, v, vii e x). As categoriais i e vi foram analisadas separadamente.

Índice de Hinde

Também foi calculado o índice de proximidade de HINDE & ATKINSON (1970), que informa qual dos indivíduos de uma díade é responsável por manter a proximidade, calculada pela seguinte fórmula: $\frac{ApA}{ApA+A} - \frac{LA}{LB+}$ sendo ApA a aproximação do indivíduo A ao indivíduo B, *ApB* a aproximação de B ao indivíduo A, *LA* o afastamento de A em relação a B, e *LB* o afastamento de B em relação a A. O valor positivo significa que A é responsável por manter a proximidade, ao passo que valor negativo indica B como o responsável. É importante ressaltar que o sinal negativo demonstra apenas a responsabilidade de manutenção de proximidade e que, quanto mais afastado de zero, mais alto o índice. O índice de Hinde foi calculado para as díades RRC, LM e TTi.

Associação Espacial

Para espécies que interagem pouco, as relações entre indivíduos são mais bem expressas por índices de associação, em oposição a medidas de interação. A análise de redes sociais (ARS) mede diretamente a relação entre membros de um grupo, sendo uma forma refinada de entender a dinâmica social dentro do mesmo. Tal análise é particularmente importante, sendo por vezes uma das únicas formas de se analisar a natureza e a intensidade dos laços sociais (CROCKETT & EISENBERG, 1987). Nesse sentido, os dados de associação espacial foram analisados no programa SOCPROG (WHITEHEAD, 2008). O índice de associação simples (*simple ratio*) foi utilizado em uma matriz de associação simétrica.

Para testar a acurácia dos resultados, foi gerada uma segunda matriz de associação. Para que os valores sejam considerados precisos, os valores alcançados pelo *Bootstrap* devem ser ≤ 0,005. O índice de associação espacial foi calculado para as quatro díades (RRC, RRN, LM e TTi).

Análise Estatística

Os índices de associação espacial, as taxas de comportamentos negativos e as taxas de comportamentos positivos foram testados para normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, onde apenas a associação espacial apresentou distribuição normal. Para detecção de diferenças individuais, cada mãe foi considerada como um grupo e diferença entre elas

foram feitas pela ANOVA seguida do teste Tukey. Já as taxas comportamentais foram testadas pelo teste pareado de Wilcoxon. Uma vez que a idade do filhote pode ser um fator influenciador do comportamento materno (*e.g.* ALTMANN, 1980), também foi levada em consideração a idade do filhote. O limiar de significância foi de p=0.05.

Devido à quantidade de comportamentos analisados, as categorias comportamentais foram analisadas conjuntamente pela Análise de Componentes Principais (PCA) com base em uma matriz de correlação (BARDI & HUFFMAN, 2002). Para a PCA, foi removida a categoria "tempo em contato físico" por ser a categoria mais frequente e mais variável entre as observações, enquanto as demais observações eram quase sempre zero. Dessa forma, ao realizar uma PCA, o primeiro componente foi responsável por 99% da variação, explicada principalmente por essa categoria. Em seguida, foi realizada a Análise Fatorial com um modelo estimando dois fatores com rotação "varimax" da PCA, pacote *psych* do R.

RESULTADOS

Diferenças Individuais

A frequência de expressão de comportamentos maternos foi muito baixa para a maioria das categorias. Ainda assim, o teste de Wilcoxon detectou diferenças entre os comportamentos agrupados como negativos e positivos entre as três díades analisadas (RRC, LM e TTi). Combinando-se todos os comportamentos, a fêmea Lolô apresentou taxas de comportamento mais altas que Teresa, e ambas mais ativas que Reco-Reco (Tabela 1). Em um único episódio, o filhote Manu foi visto posicionado axialmente na fêmea Teresa, possivelmente um evento de alolactação.

Apenas a catação e o tempo em contato com filhote apresentaram ocorrências suficientes para serem testadas entre as díades. Encontrou-se que as taxas de catação foram estatisticamente iguais entre as mães. Já o tempo em contato foi estatisticamente diferente para a mãe Lolô em relação às demais, viso que ela passou 74% do tempo com seu filhote, Reco-Reco 47% e Teresa 43%.

Tabela 1: Identidade da Mãe (ID Mãe), comportamentos positivos e a contagem, comportamentos negativos e a contagem, total de cada categoria e taxas de emissão dessas categorias comportamentais (número total de comportamentos emitidos por segundo).

ID Mãe	Positivo		Negativo		Total Geral
Lolô (L)	Amistoso	16	Afastar	10	
	Aproximar	10	Agredir	1	
	Fazer Contato	13	Rejeitar	3	
	Restringir	13	Romper Contato	8	
Total		52		22	74
Taxa		0,158		0,066	0,217
Reco-Reco (RR)	Amistoso	2	Afastar	4	
	Aproximar	4	Agredir	2	
	Fazer Contato	4	Rejeitar	1	
	Restringir	5	Romper Contato	4	
Total		15		11	26
Taxa		0,043		0,031	0,075
Teresa (T)	Amistoso	0	Afastar	17	
	Aproximar	1	Agredir	14	
	Fazer Contato	2	Rejeitar	3	
	Restringir	0	Romper Contato	15	
Total		3		49	52
Taxa		0,008		0,135	0,144

Associação Espacial

A ANOVA da associação espacial detectou diferença entre as quatro díades (RRC, RRN, LM e TTi). As díades RRC e LM eram comparáveis entre si em termos de idade do filhote, assim como RRN e TTi. Entretanto, a ANOVA não detectou diferenças relacionadas com a idade do filhote (Fig. 2). Apesar da ausência de significância estatística, há um padrão visual. As fêmeas com filhotes jovens (L e RR) destoaram entre si, porém, a partir do sétimo mês de idade, todas as díades apresentaram uma média de associação espacial de 0,48. Esse valor é mais alto que a média dos grupos estudados, como visto no capítulo II (0,36 de média total).

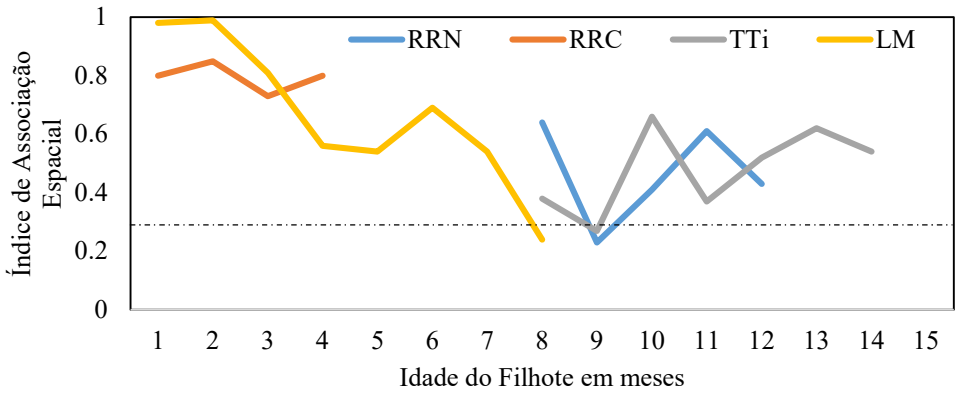


Figura 2: Média dos índices de associação espacial de cada díade ao longo da idade do filhote em meses. RRN: Reco-Reco e Naldo, RRC: Reco-Reco e Cuíca, TTi: Teresa e Tiê, LM: Lolô e Manu. A barra tracejada demonstra a média total dos dois grupos de *Alouatta clamitans* estudados (0,36).

Índice de Hinde

O índice de Hinde foi negativo para as três díades analisadas, de forma que o responsável por fazer e manter o contato entre a díade foram os filhotes. Para as mães Lolô e Reco-Reco, seus índices foram próximos a zero (-0.01 e -0.06, respectivamente), enquanto a mãe Teresa teve índice mais distante de zero (-0.33).

Latência

Latência de reação ao afastamento do filhote foi altamente rara de ser observada (n=21), porém em 15 vezes, ela foi vista na fêmea Lolô, ao passo que as demais seis observações foram para a fêmea Reco-Reco (Fig. 3). Nos demais casos em que o filhote se afastava, as mães não reagiram ao seu afastamento e mantiveram-se imóveis ou alheias à movimentação do filhote. A fêmea Lolô apresenta latência breve quanto mais jovem o seu filhote, ao passo que a fêmea Reco-Reco apresenta longa reação com filhote de mesma idade. Ela só foi observada reagindo ao afastamento do seu filhote novamente na idade de cinco meses.

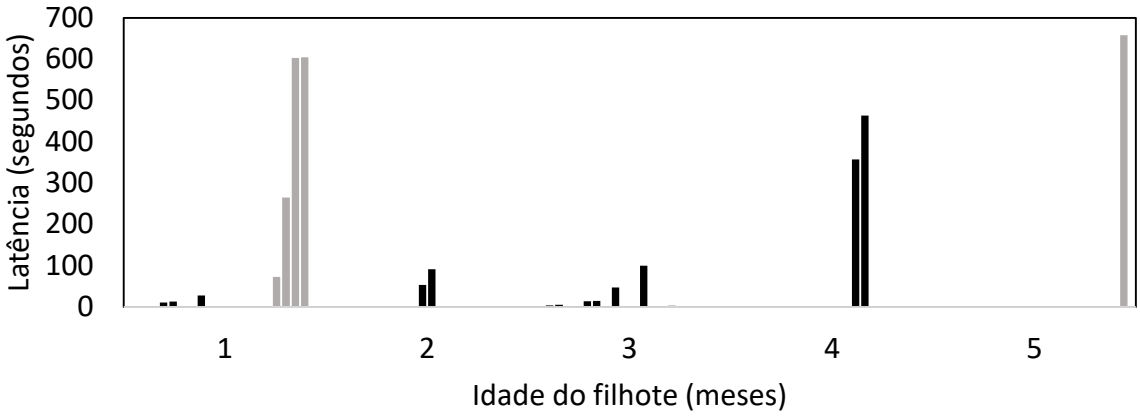


Figura 3: Latência em segundos para cada uma das mães (Lolô em preto, Reco-Reco em cinza) de bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*) ao longo da idade dos filhotes.

Estilo Materno

A PCA com todos os comportamentos mostrou que o primeiro componente explicava 99% da variação, e o comportamento "percentual em contato" era o mais variável e, consequentemente, mais importante. Para se entender os efeitos das demais variáveis, esta categoria foi removida e o resultado mostrou-se diferente. O primeiro e o segundo componentes explicavam, juntos, 66% da variação (Tabela 2).

Tabela 2: Valores de *eigenvector* da PCA realizada com as variáveis colapsadas e excluindo-se percentual em contato. Aqui são apresentados os valores para o primeiro componente principal (PC1) e o segundo componente principal (PC2). Os demais componentes principais foram suprimidos. Os valores estão em ordem decrescente e os valores negativos em cinza.

Categorias Comportamentais	PC1	PC2
Romper contato	0.7009	0.0052
Afastar	0.6858	0.0141
Agressão	0.1919	-0.0116
Rejeitar	0.0242	-0.0032
Fazer Contato	0.0239	0.0239
Catação	0.0138	-0.0715
Aproximar	-0.0070	0.9620
Restringir	-0.0091	-0.0112
Amistoso	-0.0151	0.2614
Explicação	**49%**	**17%**

Já a análise fatorial não se mostrou significativa (p=0.74). Ainda assim, o fator 1 explicou 64%, enquanto o fator 2 explicou 36%. Além disso, os comportamentos com maiores valores em um fator não eram os mesmos no outro, além da mudança no sinal (Tabela 3). As categorias comportamentais mais altas e positivas para o fator 1 foram afastar, agressão e romper contato, ao passo que para o fator 2, os maiores valores e positivos foram para amistoso e aproximar. Dessa forma, as medidas correlacionadas positivamente com o fator 1 referem-se a comportamentos maternos contrários à proximidade e, portanto, foi considerado como o eixo rejeitador, enquanto o fator 2 indica o eixo protetor.

Tabela 3: Valores de correlação (*loadings*) entre as categoriais comportamentais e os fatores extraídos da PCA ajustada (análise fatorial). Os valores negativos estão marcados em cinza. Coeficientes altos (marcados em negrito, maiores que 0,50), independentes do sinal, indicam forte relação entre a variável e o fator.

Categorias Comportamentais	Fator 1 (Rejeitador)	Fator 2 (Protetor)
Afastar	**0.9**	0.08
Agressão	**0.65**	-0.02
Amistoso	-0.11	**0.72**
Aproximar	-0.07	**0.77**
Catação	0.03	-0.09
Fazer contato	0.18	0.33
Rejeitar	0.27	-0.06
Restringir	-0.06	-0.12
Romper contato	**0.93**	0.1
Explicação	**64%**	**36%**

Ao se dividir os dois fatores no ponto 0,0, tem-se quatro estilos maternos: BR-AP (baixa rejeição-alta proteção); AR-AP (alta rejeição-alta proteção); BR-BP (baixa rejeição-baixa proteção) e AR-BP (alta rejeição-baixa proteção). A posição do centroide de cada mãe nos quadrantes demonstra o estilo materno adotado por cada uma (Fig. 4). Nenhum centroide foi encontrado além dos limites +1 ou -2 de forma que eles fossem estatisticamente iguais.

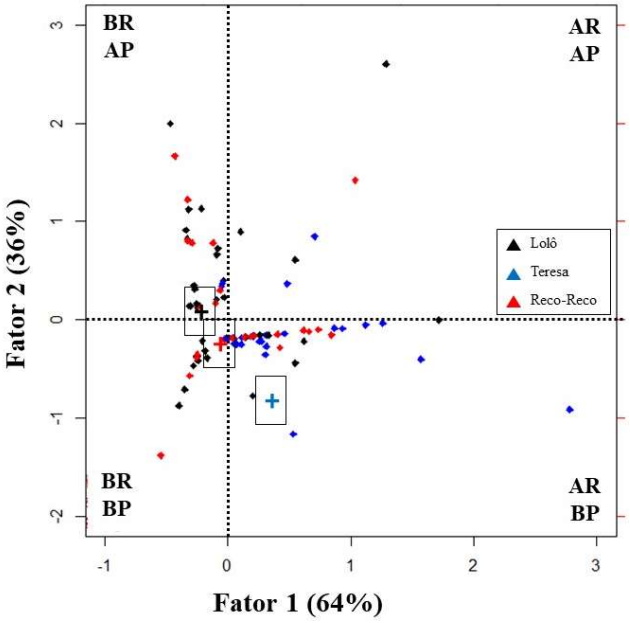


Figura 4: Os quatro estilos maternos encontrados em fêmeas de bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*) separados por quadrantes. Os quadrantes foram definidos de acordo com a análise fatorial, onde o fator 1 refere-se ao eixo rejeitador, ao passo que o fator 2 refere-se ao eixo protetor. BR-AP: baixa rejeição-alta proteção. AR-AP: alta rejeição-alta proteção. BR-BP: baixa rejeição-baixa proteção. AR-BP: alta rejeição-baixa proteção. Marcadores pretos: Lolô; marcadores azuis: Teresa; marcadores vermelhos: Reco-Reco. Marcador triangular: observações comportamentais. Marcador em cruz: centroide da elipse de cada mãe.

Embora a análise do estilo materno não tenha conseguido detectar diferenças significativas entre as mães, as três fêmeas analisadas apresentaram diferenças em vários comportamentos analisados (Tabela 4). As fêmeas Lolô e Teresa apresentaram valores diametralmente opostos, ao passo que, com valores intermediários, temos a fêmea Reco-Reco. Nos parâmetros analisados a partir dos focais e, portanto, envolvendo apenas três díades (RRN, LM e TTi), as taxas de comportamento "positivos" foi mais alto para Lolô, seguido de Reco-Reco e Teresa (essa com o filhote quase desmamado). Já as taxas de comportamentos "negativos" foi mais alta em Teresa, seguida de Reco-Reco e Lolô, sendo essas duas últimas próximas entre si. No total, a fêmea Lolô foi a mais ativa, seguida de Teresa (metade da taxa de Lolô) e Reco-Reco (metade da taxa de Teresa). Além disso, a fêmea Lolô passou mais tempo com seu filhote, seguida de Reco-Reco e depois Teresa. O índice de Hinde de Lolô e Reco-Reco foram similares e próximos a zero, enquanto foi mais alto para Teresa. Por fim, a latência foi frequente e curta na mãe Lolô, rara na mãe Reco-Reco e ausente na mãe Teresa.

Tabela 4: Sumário dos valores obtidos para cada uma das análises e cada uma das fêmeas de bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*) com filhote.

Fêmea	Lolô	Reco-Reco	Teresa
Estilo	NS	NS	NS
Latência	Comum	Rara	Ausente
Taxa Pos	0,16	0,04	0,08
Taxa Neg	0,06	0,03	0,14
Taxa Total	0,22	0,08	0,14
Percent Contato	74%	47%	46%
Assoc Espacial	0,67	0,60	0,48
Hinde	-0,01	-0,06	-0,33

NS: diferenças não significativas.

DISCUSSÃO

No presente estudo, foi possível detectar diferenças individuais no cuidado materno em bugios apenas quando as categorias propostas para PC foram ajustadas e combinadas. Vale ressaltar que para designar tais diferenças como estilos, uma mesma fêmea deve ser seguida ao longo do tempo e ao longo de várias crias para que sejam detectadas diferenças consistentes (FAIRBANKS, 1996), uma restrição do presente estudo. Dentre as quatro díades, RRC serviu de comparação para LM, ao passo que RRN serviu de comparação para TTi.

Em geral, as interações observadas para as díades RRC, LM e TTi foram raras. A exemplo da fêmea Lolô, ela foi o indivíduo com maiores graus de entrada e saída nas redes de catação (SOBRAL 2020, presente tese, Cap II). Entretanto, ela não dirigiu suas catações para seu filhote, e sim outros indivíduos adultos. O seu percentual de catação para com o filhote não foi estatisticamente diferente da fêmea Teresa. A inclusão da catação nos estilos maternos clássicos para primatas neotropicais já foi questionada por VERDERANE & IZAR (2019). Segundo as autoras, embora a catação não pertença a nenhum dos dois extremos de rejeição e catação, podendo ser incluída em uma terceira categoria ou até mesmo ser empregado por mães permissivas e rejeitadoras. A catação é um foco de ampla discussão para os PP visto que não apresentam a mesma motivação que os PC para realizá-la (e.g. DUNBAR, 1991). Em macacos-prego, a catação é utilizada como *comodity* para obter tolerância aos recursos alimentares ou apoio em interações agonísticas (TIDDI *et al.,* 2011), e em *Ateles,* indivíduos familiares que trocavam catação

também compartilhavam acesso a recursos (PASTOR-NIETO, 2001). Esses trabalhos não analisaram especificamente a catação da mãe em seus filhotes.

Já com relação a aproximar-se ou fazer contato (bem como afastar-se e romper contato), também foram bastante infrequentes, e a mãe mais "protetora", Lolô, foi a que realizou os comportamentos em igual proporção. Já as demais fêmeas, Teresa e Reco-Reco não só se afastavam com mais frequência, mas também rompiam o contato mais frequentemente. Essas duas categorias se diferenciam em que uma requer o contato físico (realizado por qualquer membro do corpo), ao passo que a aproximação não resulta, necessariamente, em toque. Entretanto, o resultado disso, o percentual do tempo em contato físico, foi a variável mais relevante para a análise do presente capítulo. Além disso, o índice de Hinde, que evidencia a responsabilidade em manter proximidade para um dos indivíduos, foi próximo a zero, mostrando que ambos – mãe e filhote – são igualmente responsáveis por manterem-se próximos um do outro. O tempo em proximidade é algo já visto em espécies próximas, como *Alouatta palliata* (ARROYO-RODRIGUEZ *et al.,* 2007), *Lagothrix* (SHANEE, 2014); *Ateles* (HIDALGO-AGUIRRE *et al.,* 2020) e *Brachyteles* (TOLENTINO *et al.,* 2008). No caso do estudo com *Brachyteles,* mães permaneceram próximas de seus filhotes mais velhos, ainda que desmamados. Esse padrão de *continued bonding* até a idade avançada de 5 anos foi descrito para espécies próximas (SYMINGTON, 1987; STEVENSON, 1998; SHANEE, 2014).

Comportamentos típicos dos PC, como a restrição, foram tão raros quanto os afastamentos, embora novamente a mãe Lolô tenha expressado esse comportamento mais do que as outras duas fêmeas. Aqui vale a ressalva que a descrição da restrição precisou ser ajustada para os bugios. Este comportamento não foi detectado em *Sapajus* em estudo similar, um primata notoriamente capaz de manusear objetos, altas taxas de catação e interação (VERDERANE & IZAR, 2019). Contudo, o filhote da fêmea Teresa já estava em época de desmame, sendo mais velho que os filhotes das fêmeas Reco-Reco e Lolô. A rejeição, o afastamento e o rompimento de contato, conjuntamente, são essenciais para a independência do filhote (SCHINO *et al.,* 2001). Tendo em vista que a idade do filhote impõe um importante fator de variação (e.g. MIRANDA *et al.,* 2005), seria interessante analisar tais dados ao longo do tempo.

Além destas categorias propostas para PC no trabalho de FAIRBANKS (1996) e BARDI & HUFFMAN (2002), três categorias foram adicionadas, sendo elas

comportamentos agonísticos e afiliativos direcionados ao filhote, e a latência ao afastamento dele. Comportamentos agonísticos foram virtualmente ausentes, enquanto comportamentos afiliativos foram baixos. Quando os comportamentos foram agrupados em “negativo” e “positivo”, a diferença entre as fêmeas ficou mais evidente. A fêmea Lolô apresentou maiores taxas de comportamentos positivos, contrariamente à fêmea Teresa, com maiores taxas negativas, enquanto a fêmea Reco-Reco apresentou valores intermediários para ambos.

Já com relação à latência, também foi possível observar um gradiente, onde a mãe Teresa não foi observada reagindo ao afastamento de seu filhote, enquanto a mãe Lolô foi bastante e rapidamente responsiva ao afastamento de seu filhote. Dificilmente seu filhote recém-nascido permanecia longe dela. Finalmente, a fêmea Reco-Reco reagia, porém raramente e mais lentamente. Essas informações puderam ser correlacionadas com observações a campo. Ela deixava seu filhote frequentemente com outros membros do grupo enquanto comia. O filhote passou parte do seu tempo com o macho dominante e também foi visto com outros indivíduos, inclusive o mais jovem (filhote mais velho de Reco-Reco). Ademais, quando o grupo já estava posto para dormir, o filhote também não era necessariamente posicionado no centro do aninhamento (*huddle*), estratégia que provê proteção e calor (PATERSON, 1981; FAN & JIANG, 2008; LI *et al.,* 2010). Esse comportamento pode ser ainda mais necessário durante o inverno, quando as temperaturas do parque chegam perto do congelamento, período em que o filhote de RR nasceu. Além disso, as vocalizações de choro eram frequentes quando o filhote estava longe da mãe, embora isso não tenha sido contabilizado sistematicamente. No trabalho de VERDERANE & IZAR (2019) com *Sapajus*, a categoria “recuperar filhote”, aqui chamada de latência ao afastamento, foi bastante rara.

Com relação à associação espacial, avaliada ao longo do tempo para quatro díades, não foram detectadas diferenças estatísticas entre elas. Embora os índices fossem diferentes entre as fêmeas nos primeiros dois meses, eles diminuíram conforme o filhote crescia, atingindo uma média similar entre as mães a partir dos sete meses. Esses índices eram mais altos que qualquer outra díade analisada (SOBRAL, 2020, presente tese), demonstrando que, espacialmente, a díade que mais se associa são os filhotes e suas mães, e esse padrão foi ubíquo entre os grupos. Conforme dito acima, o *continued bonding* (SYMINGTON, 1987; STEVENSON, 1998; SHANEE, 2014) parece ser uma realidade para os bugios, embora isso não seja variável entre as mães.

Quando colocadas no contexto de grupo, as diferenças individuais não parecem condizer com o ambiente social experimentado pela mãe e pelo filhote. As métricas de associação espacial (SOBRAL, 2020, presente tese) como valores de força, centralidade, graus médio e ponderado médio, não foram diferentes entre os grupos analisados. Além disso, o grupo G3 (ao qual a fêmea RR pertence), apresentou maiores taxas de agressão e menores taxas de catação, o que poderia ser interpretado como um grupo menos "amistoso" e, portanto, inesperado para um cuidado materno mais "rejeitador", visto que o filhote estaria mais exposto às altas taxas de agressão.

CONCLUSÕES

Um obstáculo na detecção de diferenças individuais é a baixa taxa de interação observada entre os bugios. Embora o G4 apresente altas taxas de interação (SOBRAL, 2020, presente tese), o G3 apresentou taxas semelhantes ao descrito para o gênero na literatura. Portanto, as categorias propostas para PC são adequadas para serem aplicadas aos bugios apenas quando combinadas. Dessa forma, ao se aumentar o tamanho da amostra, é possível detectar diferenças estatísticas entre indivíduos. O tempo dispendido em contato físico mostrou-se a categoria mais adequada para detecção de diferenças individuais, embora esse contato físico não fosse iniciado ou mantido pela mãe, e sim pelo filhote. Frequentemente a associação espacial é posta como uma resolução adequada para responder perguntas em espécies com baixas taxas de interação. Entretanto, isso não corresponde aos resultados do presente estudo, visto que os índices foram indistintos entre mães. Portanto, diferenças individuais foram encontradas em mães de bugios-ruivos principalmente a partir das categorias comportamentais coletadas pelos focais. Ademais, embora os índices de associação espacial entre mães e seus filhotes fossem maiores que os observados entre outras díades, estes não puderam ser diferenciados individualmente.

REFERÊNCIAS

ALLEVA E, CAPRIOLI A & LAVIOLA G. 1989. Litter gender composition affects maternal behavior of the primiparous mouse dam (*Mus musculus*). Journal of Comparative Psychology, 103(1), 83.

ALTMANN J & SAMUELS A. 1992. Costs of maternal care: infant-carrying in baboons. Behavioral Ecology and Sociobiology, 29(6), 391-398.

ALTMANN J. 1974. Observational study of behaviour: sampling methods. Behaviour, 49, 227-267.

ALTMANN J. 1980. Baboons mothers and infants. Harvard University Press, Cambridge, UK.

ARROYO-RODRÍGUEZ V, SERIO-SILVA JC, ÁLAMO-GARCÍA J & ORDANO M. 2007. Exploring immature-to-mother social distances in Mexican mantled howler monkeys at Los Tuxtlas, Mexico. American Journal of Primatology, 69(2), 173-181.

BARDI M & HUFFMAN MA. 2002. Effects of maternal style on infant behavior in Japanese macaques (*Macaca fuscata*). Developmental Psychobiology, 41(4), 364-372.

BERMAN CM. 1990. Consistency in maternal behavior within families of free-ranging rhesus monkeys: An extension of the concept of maternal style. American Journal of Primatology, 22, 159–169.

BUSS G, OKLANDER LI, BICCA MARQUES JC, HIRANO ZB, CHAVES OM, MENDES SL et al. 2019. Brown howler monkey: *Alouatta guariba* Humboldt, 1812. *In* Primates in Peril. The world's 25 most endangered primates 2018-2020 (SCHWITZER C, MITTERMEIER RA, RYLANDS AB, CHIOZZA F, WILLIAMSON EA, BYLER D, WICH S, HUMLE T, JOHNSON C, MYNOTT H AND MCCABE G, eds.).

CLARKE MR, GLANDER KE & ZUCKER E. 1998. Infant-nonmother interactions of free-ranging mantled howlers (*Alouatta palliata*) in Costa Rica. International Journal of Primatology, 19, 451–472.

CORTÉS-ORTIZ L, BERMINGHAM E, RICO C, RODRIGUEZ-LUNA E, SAMPAIO I & RUIZ-GARCIA M. 2003. Molecular systematics and biogeography of the Neotropical monkey genus, *Alouatta*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 26(1), 64-81.

CROCKETT CM & EISENBERG JF. 1987. Howlers: variations in group size and demography. Primate Societies, 54-68.

DE LATHOUWERS M & VAN ELSACKER L. 2004. Comparing maternal styles in bonobos (*Pan paniscus*) and chimpanzees (*Pan troglodytes*). American Journal of Primatology, 64(4), 411-423.

DUNBAR RI. 1991. Functional significance of social grooming in primates. Folia Primatologica, *57*(3), 121-131.

DUNKEL A. 2019. The Evolution of Grooming and Hand Use in Primates: An Interdisciplinary Perspective. Preprint.

FAIRBANKS LA & MCGUIRE MT. 1988. Long-term effects of early mothering behavior on the responsiveness to the environment in vervet monkeys. Developmental Psychobiology, 21, 711–724.

FAIRBANKS LA. 1989. Early experience and crossgenerational continuity of mother–infant contact in vervet monkeys. Developmental Psychobiology, 22, 669–681.

FAIRBANKS LA. 1996. Individual differences in maternal style: causes and consequences for mothers and offspring, p579-561. In Advances in the Study of Behavior. Academic Press.

FAN PF & JIANG XL. 2008. Sleeping sites, sleeping trees, and sleep-related behaviors of black crested gibbons (*Nomascus concolor jingdongensis*) at Mt. Wuliang, Central Yunnan, China. American Journal of Primatology, 70(2), 153-160.

FRAGASZY D.M, BAER J & ADAMS-CURTIS L. 1991. Behavioral development and maternal care in tufted capuchins (*Cebus apella*) and squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) from birth through seven months. Developmental Psychobiology, 24(6), 375-393.

GOSLING SD. 2001. From mice to men: what can we learn about personality from animal research? Psychological Bulletin, 127, 45–86.

HIDALGO-AGUIRRE RM, CRUZ-AGUILAR MA, HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ M, GUEVARA MA & ROVIROSA-HERNÁNDEZ MDJ. 2020. Nocturnal mother–juvenile offspring interaction at the beginning of the juvenile period in free-ranging spider monkeys (*Ateles geoffroyi*): a report on two cases. Ethology Ecology & Evolution, 32(4), 374-388.

HILL HM, GREER T, SOLANGI M & KUCZAJ II SA. 2007. All mothers are not the same: Maternal styles in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). International Journal of Comparative Psychology, 20(1), 35-54.

HINDE K. 2009. Richer milk for sons but more milk for daughters: Sex-biased investment during lactation varies with maternal life history in rhesus macaques. American Journal of Human Biology, 21(4), 512-519.

HINDE RA & ATKINSON S. 1970. Assessing the roles of social partners in maintaining mutual proximity, as exemplified by mother-infant relations in rhesus monkeys. Animal Behaviour, 18, 169-176.

HORWICH RH, KOONTZ F, SAQUL E, SAQUL H & GLANDER K. 1993. A reintroduction program for the conservation of the black howler monkey in Belize. Endangered Species Update 10, 1-6.

JACOBS BS & MOSS HA. 1976. Birth order and sex of sibling as determinants of mother-infant interaction. Child Development, 315-322.

LEE PC & MOSS CJ. 1986. Early maternal investment in male and female African elephant calves. Behavioral Ecology and Sociobiology, 18(5), 353-361.

LEE PC. 1984. Early infant development and maternal care in free-ranging vervet monkeys. Primates, 25(1), 36-47.

LI D, REN B, GRUETER CC, LI B & LI M. 2010. Nocturnal sleeping habits of the Yunnan snub-nosed monkey in Xiangguqing, China. American Journal of Primatology, 72(12), 1092-1099.

MAESTRIPIERI D. 1994) Mother–infant relationships in three species of macaques (*Macaca mulatta, M. nemestrina, M. arctoides*): I. Development of the mother–infant relationship in the first three months. Behaviour, 131, 75–96.

MAESTRIPIERI D. 2001. Biological bases of maternal attachment. Current Directions in Psychological Science, 10(3), 79-83.

MEANEY MJ & SZYF M. 2005. Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. Dialogues in Clinical Neuroscience, 7(2), 103.

MILTON K., NOLIN DA, ELLIS K, LOZIER J, SANDEL B & LACEY EA. 2016. Genetic, spatial, and social relationships among adults in a group of howler monkeys (*Alouatta palliata*) from Barro Colorado Island, Panama. Primates, 57(2), 253-265.

MIRANDA J, AGUIAR LM, LUDWIG G, MORO-RIOS RF & PASSOS FC. 2005. The first seven months of an infant of *Alouatta guariba* (Humboldt) (Primates, Atelidae): interactions and the development of behavioral patterns. Revista Brasileira de Zoologia, 22(4), 1191-1195.

MOORE DS. 2017. Behavioral epigenetics. Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine, 9(1), e1333.

PASTOR-NIETO R. 2001. Grooming, kinship, and co-feeding in captive spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). Zoo Biology, 20(4), 293-303.

PATERSON JD. 1981: Postural-positional thermoregulatory behaviour and ecological factors in primates. Canadian Review of Physical Anthropology, 3, 3-11.

PLANO DE MANEJO, 2015. Título: Plano de Manejo Parque Estadual Carlos Botelho. Unidades de Terreno do Parque. Disponível em < http://observatorio.wwf.org.br/site_media/upload/gestao/planoManejo/PM_PECarlosBotelho_parte_002.pdf> . Último acesso em agosto de 2020.

RAGUET-SCHOFIELD M & PAVÉ R. 2015. An ontogenetic framework for *Alouatta*: infant development and evaluating models of life history, p289-317. *In* Howler Monkeys: adaptive radiation, systematics, and morphology (KOWALEWSKI MM, GARBER PA, CORTÉS-ROTIZ L., URBANI B & YOULATOS D., eds.). Springer, New York, USA.

RÉALE D, READER SM, SOL D, MCDOUGALL PT & DINGEMANSE NJ. 2007. Integrating animal temperament within ecology and evolution. Biological Reviews, 82(2), 291-318.

ROBINSON JG & REDFORD KH. 1986. Body size, diet and population density of neotropical forest mammals. American Naturalist, 128, 665–680.

ROSS AC, PORTER LM, POWER ML & SODARO V. 2010. Maternal care and infant development in *Callimico goeldii* and *Callithrix jacchus*. Primates, 51(4), 315-325.

SAITO A & NAKAMURA K. 2011. Oxytocin changes primate paternal tolerance to offspring in food transfer. Journal of Comparative Physiology A, 197(4), 329-337.

SCHINO G, SPERANZA L & TROISI A. 2001. Early maternal rejection and later social anxiety in juvenile and adult Japanese macaques. Developmental Psychobiology, 38, 186-190.

SEAY B. 1966. Maternal behavior in primiparous and multiparous rhesus monkeys. Folia Primatologica, 4, 146-168.

SEKULIC R. 1983. Spatial relationships between recent mothers and other troop members in red howler monkeys (*Alouatta seniculus*). *Primates*, *24*(4), 475-485.

SHANEE S. 2014. Yellow-tailed woolly monkey (*Lagothrix flavicauda*) proximal spacing and forest strata use in La Esperanza, Peru. Primates, 55(4), 515-523.

SIH A, KATS LB, MAURER EF. 2003. Behavioural correlations across situations and the evolution of antipredator behaviour in a sunfish-salamander system. Animal Behavior, 65, 29-44.

SIMPSON EA, MILLER GM, FERRARI PF, SUOMI SJ & PAUKNER A. 2016. Neonatal imitation and early social experience predict gaze following abilities in infant monkeys. Scientific Reports, 6, 20233.

STEVENSON PR. 1998. Proximal spacing between individuals in a group of woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha*) in Tinigua National Park, Colombia. International Journal of Primatology, 19, 299–311.

SYMINGTON MM. 1987. Sex ratio and maternal rank in wild spider monkeys: when daughters disperse. Behavioral Ecology and Sociobiology, 20, 421–425

SZYF M, MCGOWAN P & MEANEY MJ. 2008. The social environment and the epigenome. Environmental and Molecular Mutagenesis 49, 46–60.

TAYLOR JH & FRENCH JA. 2015. Oxytocin and vasopressin enhance responsiveness to infant stimuli in adult marmosets. Hormones and Behavior, 75, 154-159.

TIDDI B, AURELI F, POLIZZI DI SORRENTINO E, JANSON CH & SCHINO G. 2011. Grooming for tolerance? Two mechanisms of exchange in wild tufted capuchin monkeys. Behavioral Ecology, 22(3), 663-669.

TOLENTINO K, ROPER JJ, PASSOS FC & STRIER KB. 2008. Mother–offspring associations in Northern muriquis, *Brachyteles hypoxanthus*. American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists, 70(3), 301-305.

TREVES A, DRESCHER A & SNOWDON CT. 2003. Maternal watchfulness in black howler monkeys (*Alouatta pigra*). Ethology, 109(2), 135-146.

VAN ELSACKER L, DE MEURICHY W, VERHEYEN RF & WALRAVEN V. 1992. Maternal differences in infant carriage in golden-headed lion tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*). Folia Primatologica, 59(3), 121-126.

VERDERANE MP & IZAR P. 2019. Estilos de cuidado materno em primatas: considerações a partir de uma espécie do Novo Mundo. Psicologia USP, 30, e190055.

WHITEHEAD H. 2008. Analyzing animal societies: quantitative methods for vertebrate social analysis. Chicago: The University of Chicago Press.

CAPÍTULO IV

EVOLUÇÃO, AÇÃO E MENSURAÇÃO DE HORMÔNIOS PROTEICOS E ESTEROIDES ENVOLVIDOS NAS INTERAÇÕES SOCIAIS DE BUGIOS-RUIVOS

RESUMO

A atuação hormonal sobre os mais diversos sistemas orgânicos é sabida há mais de um século e destacam-se a atuação dos hormônios esteroides e proteicos no comportamento social. Hormônios esteroides como a testosterona, a progesterona e o estrogênio, estão majoritariamente envolvidos no comportamento sexual, ao passo que a ocitocina, um hormônio proteico, está principalmente envolvida nas relações sociais duradouras, enquanto os glicocorticoides estão envolvidos em diversos ramos da socialidade animal. Devido à importância, sobretudo dos esteroides, há estabilidade e similaridade nos receptores e nas moléculas de esteroides ao longo da evolução dos mamíferos. Já com relação à ocitocina, foram encontradas algumas variações na molécula dentro do clado dos primatas. Nesta revisão, são apresentadas a evolução, a ação e a mensuração desses hormônios, apresentando, inclusive, novos protocolos de dosagem hormonal. Esses protocolos de dosagem envolveram técnicas utilizadas em poucos primatas até o momento, como o ensaio de ocitocina urinária e o ensaio multiesteroide por LC-MS. Não foi possível detectar a razão pela qual o ensaio não foi validado, e estes resultados mostram que embora se baseassem em métodos descritos para espécies próximas, espécies-irmãs podem divergir quanto à produção, metabolização e sucesso na mensuração hormonal não-invasiva, de modo que uma espécie não sirva, necessariamente, de modelo para todas as demais.

Palavras-chave: Ensaio de ocitocina urinária; ensaio multiesteroide; LC-MS; Platyrrhini; não-invasivo; urina; fezes.

INTRODUÇÃO

O Ciclo Reprodutivo dos Mamíferos

A atuação hormonal sobre os mais diversos sistemas orgânicos é sabida há mais de um século, quando STARLING (1905) definiu hormônios como "mensageiros químicos que corriam pelo sangue, desde o local onde eram produzidos até os órgãos-alvo, coordenando atividades de diferentes partes do corpo". A definição de hormônios sofreu alterações, mas mesmo passados mais de 100 anos, sua essência permanece virtualmente inalterada. Uma das atividades mais amplamente estudadas dessas moléculas é seu papel nas gônadas, coordenando a função reprodutiva dos organismos (e.g. NEWERLA, 1944), e tal popularidade provavelmente deve-se ao fato de que a reprodução é um mecanismo vital para a permanência e a evolução das espécies.

A reprodução dos mamíferos é dioica e sexuada, dependendo de dois indivíduos – o macho e a fêmea – e seus gametas para que seja bem-sucedida. Entretanto, é intrinsicamente dependente do organismo feminino, pois as fêmeas são responsáveis por gestarem e cuidarem dos filhotes, enquanto os machos, em geral, contribuem apenas com o esperma (KOKKO & JENNIONS, 2012). A reprodução feminina é regida por diversos hormônios, porém dois merecem destaque, sendo eles a progesterona e o estrogênio (DIZEREGA & HODGEN, 1981; SENGER, 2005). A produção e a secreção desses hormônios dependem de outros dois, o hormônio folículo-estimulante (FSH) e o luteinizante (LH), ambos regulados, por sua vez, pelo hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (MOLINA, 2014). Essa cascata hormonal traduz-se em mudanças morfológicas no sistema reprodutivo – referidas como ciclo ovariano –, bem como mudanças comportamentais e outras alterações sistêmicas (BONELLO *et al*., 2004; STOCCO *et al*., 2007).

Cada ciclo pode ser dividido entre fases folicular e lútea. Na fase folicular, o FSH é responsável pelo recrutamento e maturação dos folículos, além da síntese de estrogênio. Os folículos em desenvolvimento apresentam dois conjuntos de células: a granulosa – células epiteliais diferenciadas, camada mais interna – e a teca – células do estroma ovariano, uma camada mais externa (SENGER, 2005; MOLINA, 2014). Durante a fase folicular, as células da granulosa são responsivas apenas ao FSH, enquanto na fase lútea há um aumento dos receptores de LH. A partir daqui, o LH substitui o FSH nas células

da granulosa, culminando com a ovulação e consequente formação do corpo lúteo, que produz progesterona e estrogênio (SENGER, 2005; MOLINA, 2014).

Caso não haja uma fertilização bem-sucedida, os níveis hormonais diminuem e um novo ciclo se inicia (ROBECK *et al.,* 2001). Na eventualidade de uma fertilização bem-sucedida, a gestação, o nascimento de filhotes e a lactação geram novas alterações hormonais nas fêmeas. Durante a gestação, o principal hormônio é a progesterona, responsável pela manutenção da gravidez (SPENCER & BAZER, 2002). Entretanto, outros hormônios ganham importância, como a ocitocina e a prolactina, hormônios proteicos essenciais para as contrações do parto, produção e ejeção de leite e ligação entre mãe e filhote (KENDRICK *et al*., 1987; UVNÄS-MOBERG, 1998; LUPOLI *et al*., 2001; SPENCER & BAZER, 2002). Suas produções dependem de estímulos como o alongamento do cérvix e do útero durante o parto e também da estimulação dos mamilos durante a lactação (RUSSEL & LENG, 1998), além de outras pistas providas pelos filhotes, como choro e cheiro. Em algumas espécies, esses hormônios proteicos podem inibir a ciclicidade ovariana ao inibirem a produção de GnRH, de modo que a mãe seja menos capaz de conceber novos filhotes enquanto estiver cuidando da prole atual (DORRINGTON & GORE-LANGTON, 1981, DÍAZ *et al.,* 1989; CAMPINO *et al.,* 1994; MOLINA, 2014).

Embora a contribuição com a prole seja desproporcional à fêmea, os machos de mamíferos também apresentam ampla variação hormonal ao longo de suas vidas reprodutivas. Um exemplo é a ciclicidade espermática, também regida pelo GnRH que, assim como nas fêmeas, coordena a secreção de FSH e LH (BONELLO *et al*., 2004; STOCCO *et al*., 2007). A espermatogênese, um mecanismo complexo e ainda não completamente compreendido, depende majoritariamente da testosterona (MCLACHLAN *et al.,* 2002). Nos testículos, há receptores para este hormônio tanto nas células de Leydig – localizadas no espaço intersticial do testículo – quanto nas de Sertoli – situadas dentro dos túbulos seminíferos (JOSEPH, 1994). As células de Leydig, estimuladas pelo LH, secretam testosterona fora dos túbulos. Já as células de Sertoli, reguladas pelo FSH, secretam a proteína ligadora de andrógenos (*androgen binding protein, ABP*). A testosterona, estimulada pelo ambiente rico em ABP, entra na célula de Sertoli que, curiosamente, é estimulada pela própria testosterona. Assim como nas fêmeas, a ação orquestrada desses hormônios é essencial para o bom funcionamento da espermatogênese, acarretando alterações comportamentais e sistêmicas nos machos.

Animais sazonais apresentam variação na concentração hormonal quando dentro ou fora da estação reprodutiva. O padrão fora da estação é caracterizado por uma diminuição dos níveis de GnRH e, consequentemente, há decréscimo da liberação do LH e do FSH para ambos os sexos. No caso dos machos, essa alteração gera redução dos níveis de testosterona, resultando na atrofia dos testículos e redução do tecido testicular e, nas fêmeas, por vezes há completa interrupção do ciclo ovariano (ROBECK *et al.,* 2001). Espécies poliéstricas exibirão diversos ciclos ovarianos em sequência, podendo ou não estarem limitados a uma época do ano (e, portanto, serem poliéstricas sazonais), ao passo que espécies monoéstricas apresentam apenas um único ciclo no ano e, em casos extremos de semelparidade, um único ciclo reprodutivo em toda a sua vida (e.g. KRAAIJEVELD *et al.,* 2003).

Síntese e Cascata de Sinalização de Hormônios Esteroides e Proteicos

O sistema endócrino é uma rede intrincada de órgãos, hormônios e células-alvo e, atualmente, a importância do sistema nervoso na regulação dessa rede fez com que muitos autores adotassem a nomenclatura de "sistema neuroendócrino" (MOLINA, 2014). Com base na estrutura química, os hormônios podem ser categorizados como proteicos (ou peptídicos), esteroides e aminas (MOLINA, 2014). As duas principais classes hormonais preponderantes na função reprodutiva são os esteroides (e.g. andrógenos, estrógenos, progestágenos e glicocorticoides) e os proteicos (e.g. ocitocina, prolactina, FSH, LH e GnRH). Os órgãos-alvo incluem os órgãos reprodutivos e o cérebro, por exemplo. Essas duas classes de hormônio divergem em vários aspectos, desde sua síntese, sua "comunicação" com a célula e até sua via de excreção.

Os hormônios esteroides são assim chamados por se tratar de esteroides (i.e., lipídios com estrutura básica de 17 átomos de carbono dispostos em quatro anéis ligados entre si, sem ácidos graxos em sua estrutura) que atuam como hormônios (LEDNICER, 2011). Os esteroides são sintetizados a partir do colesterol e sua metabolização se inicia nas células esteroidogênicas. Após diversas conversões bioquímicas, o esteroide pode, então, atuar como hormônio na célula-alvo. Quando um hormônio encontra sua célula-alvo (Fig. 1), por sua natureza hidrofóbica, os hormônios esteroides (nessa situação também chamados de primeiros mensageiros ou ligantes) são capazes de se difundir para dentro da célula por intermédio de seu receptor, não requerendo a ação de outras moléculas sinalizadoras, os segundos mensageiros (HEIDEMANN, 2004; LEDNICER, 2011). A entidade fisiologicamente ativa dos hormônios esteroides é pela interação do

hormônio com seus receptores intracelulares, ou receptores nucleares (KUMAR *et al.,* 1987). Esses receptores regulam a expressão dos genes-alvo ao se ligarem a determinadas porções da sequência de DNA (EVANS, 1988; OLEFSKY, 2001).

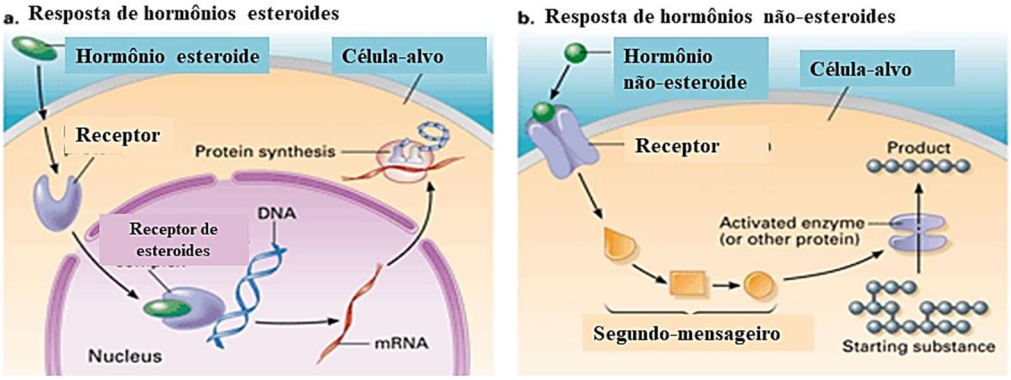


Figura 1: Esquema de sinalização por hormônios esteroides e não-esteroides e seus respectivos mecanismos. Adaptado de: CAMPBELL *et al.* (2003).

Já os hormônios proteicos dizem respeito a proteínas sintetizadas nas células a partir da transcrição do mRNA em aminoácidos dentro de seu próprio retículo endoplasmático (BROWNSTEIN, 1983). Após a sua produção, são empacotados e transportados para fora da célula via vesículas secretoras frente a um estímulo específico. Ao navegarem pela corrente sanguínea, essas proteínas interagirão com um receptor na superfície da célula-alvo. Diferentemente do que ocorre com os hormônios esteroides, a maioria dos peptídeos são moléculas hidrofílicas que não podem cruzar a bicamada fosfolipídica (Fig. 1) das células para iniciar a cascata fisiológica (SCALLY, 2018). Nesses casos, a sinalização celular se dá por receptores de membrana (receptores extracelulares, no caso acoplados às proteínas G) e requerem o segundo mensageiro, gerando uma resposta celular e por vezes, resulta em uma amplificação do sinal (NIAL, 1982; MOHR *et al.,* 1995; MOLINA, 2014). Em ambas as classes hormonais, os hormônios são chamados de primeiros mensageiros (ou ligantes) por se tratar de fatores extracelulares. A ligação entre o ligante e seu receptor desencadeia etapas primordiais para a transdução intracelular correta, chamada cascata fisiológica.

Evolução dos Hormônios Esteroides

A designação de "receptores nucleares" refere-se ao nome da superfamília homônima, da qual outros receptores esteroides evolutivamente relacionados também

fazem parte. Dentro dessa superfamília, há quatro subfamílias nomeadas de 1 a 4. Os receptores de hormônios esteroides são parte da subfamília 3, designados de NR3 – *nuclear receptor subfamily 3*, composta por três subgrupos: 3A, 3B e 3C. O subgrupo 3A inclui os receptores de estrógenos em suas duas formas ERα (*estrogen receptor alpha*) e ERβ (*estrogen receptor beta*), também chamados NR3A1 e NR3A2 (*nuclear receptor subfamily 3 subgroup A member 1* e *2*) respectivamente. Já o subgrupo 3C inclui os receptores de glicocorticoides (GR), de mineralocorticoides (MR), de progesterona (PR) e de diidrotestosterona (AR). E, por fim, a subfamília 3B são receptores "órfãos", i.e., sem ligantes naturais conhecidos (ESCRIVA *et al.,* 2004; THORNTON *et al.,* 2003; PROSSNITZ *et al.,* 2007).

A comparação entre a sequência de aminoácidos dos receptores em diferentes espécies mostrou conservação quase surpreendente, com uma organização estrutural comum entre os receptores e entre espécies (Fig. 2). A partir de estudos evolutivos, verificou-se que os receptores nucleares surgiram no início da evolução dos metazoários e as mais de 50 moléculas que compõem essa superfamília derivam de um ancestral comum (ESCRIVA *et al.,* 1997; OWEN & ZELENT, 2000).

A conservação não diz respeito apenas aos receptores, mas também às moléculas. Os esteroides diferem entre si com relação ao que, especificamente, está conectado aos carbonos dos anéis aromáticos e ao número de dupla ligações (ADKINS-REGAN, 2005, Fig. 3). Os estrógenos, por exemplo, apresentam três duplas ligações, que difere de outros hormônios esteroides. Analisemos cada categoria em detalhe.

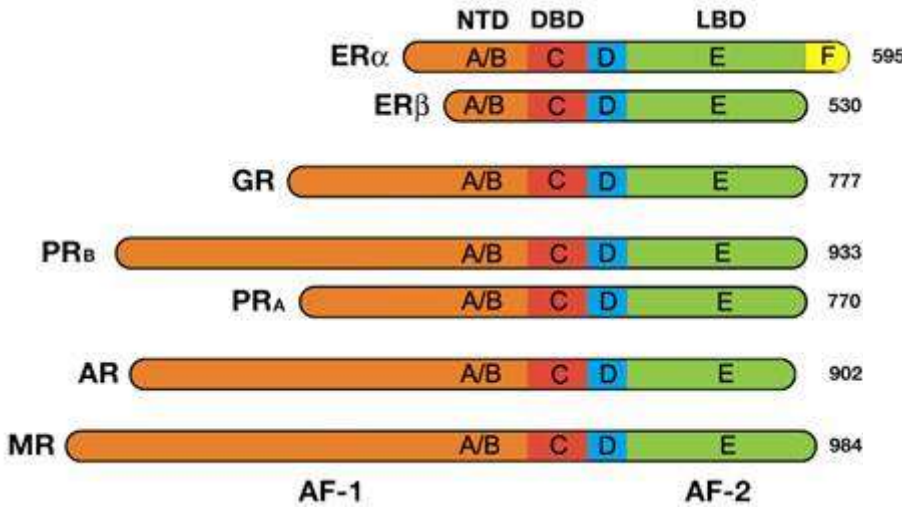


Figura 2: Domínios compartilhados entre os hormônios esteroides, sendo ER para receptor de estrogênio; GR receptor de glicocorticoide; PR receptor de progesterona; AR receptor de andrógeno e MR receptor de mineralocorticoide. Adaptado de: SCALLY (2018).

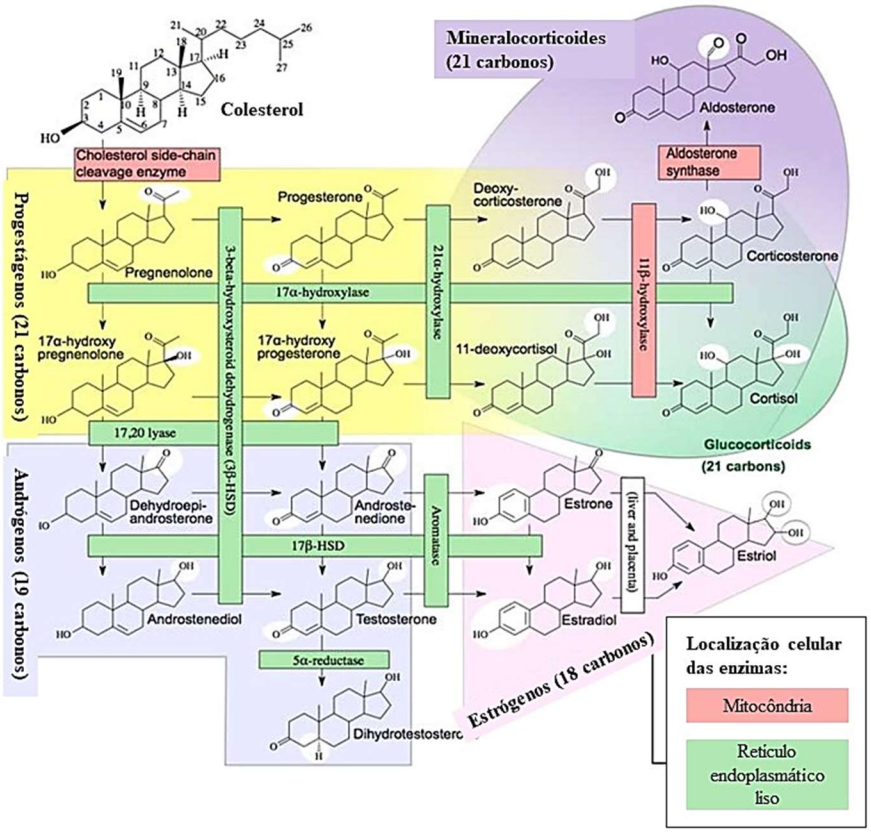


Figura 3: Biosíntese completa dos hormônios esteroides. Adaptado de: HÄGGSTRÖM & RICHFIELD (2014).

O termo "estrogênio", na realidade, é uma designação genérica para hormônios estrógenos. Os estrógenos são produzidos a partir de três fontes principais, sendo elas as células da granulosa dos ovários, a placenta e o córtex adrenal fetal (FAIRBROTHER, 2000). Os principais estrógenos são a estrona (E_1), derivada da progesterona; o estradiol (E_2), derivada da testosterona; e o estriol (E_3), derivada da androstenediona, essa última proveniente também da testosterona (FAIRBROTHER, 2000; GRUBER *et al.,* 2002). A estrona (E_1) é produzida pelo ovário e foi descrita em mamíferos (importante durante a menopausa de primatas), possivelmente répteis e seguramente em anfíbios, peixes teleósteos e na espécie de condricte *Scyliorhinus caniculus*. Já o estradiol (E_2) é o principal hormônio sexual feminino, produzido pelo folículo em desenvolvimento (pelas células da granulosa em mamíferos; células da teca externa em répteis) (GUILLETTE *et al.,* 2007), sendo importante para regulação do ciclo estral. O estradiol está presente em

mamíferos, aves, répteis, anfíbios, peixes teleósteos e a mesma espécie de condricte citada anteriormente. Por fim, o estriol (E_3) é crucial durante a gravidez, sendo produzido principalmente pela placenta e com participação do córtex adrenal fetal (GRECCO & STABENFELDT, 2004). Até o momento, foi descrito apenas para mamíferos (FAIRBROTHER, 2000).

Tanto a testosterona quanto a progesterona são intermediários na síntese de estrógenos, os hormônios finais (Fig. 3). O mecanismo de síntese desses hormônios está presente tanto em vertebrados quanto em cefalocordados, tendo evoluído antes mesmo da separação desses grupos (MIZUTA & KUBOKAWA, 2007; MIZUTA *et al.,* 2008). Além disso, há também trabalhos que mostram que os moluscos são capazes de sintetizar diversos esteroides dos vertebrados, porém se é pelo mesmo mecanismo ou não, ainda é inconclusivo (EICK & THORNTON, 2011). É interessante ressaltar que, embora a síntese de andrógenos e progestágenos seja anterior à síntese de estrógenos no tempo evolutivo, seus receptores surgiram mais tardiamente na evolução (EICK & THORNTON, 2011). Contudo, o papel da progesterona também está intimamente ligado à evolução dos vertebrados. Em animais não-vivíparos (e.g. testudines e aves), existe um surto pré-ovulatório, ao passo que em animais vivíparos (e.g. alguns tubarões, cobras e mamíferos), o surto é pós-ovulatório (ver revisão de CALLARD *et al.,* 1992).

Dessa forma, as categoriais de "estrógenos", "andrógenos" e "progestinas" se referem às variações na estrutura básica das moléculas de esteroides. Contudo, esteroides específicos são idênticos entre espécies. As similaridades estruturais (i.e. conservação) entre os receptores e a homologia entre os hormônios dos táxons estudados até o momento demonstram a importância de sua função fisiológica (EICK & THORNTHTON, 2011). Todas as espécies de vertebrados apresentam, portanto, respostas semelhantes à estimulação desses hormônios nas funções reprodutivas (BRANDENBERGER *et al.,* 1997; COUSE *et al.,* 1997; SHUGHRUE *et al.,* 1997). Uma vez que a reprodução sexuada é um mecanismo longevo, existente desde os primeiros organismos procariontes (SCHOPF, 1978), então é esperado que exista a conservação dessas estruturas.

Evolução dos Hormônios Proteicos

O surgimento no tempo evolutivo dos hormônios peptídeos é mais antigo. Há moléculas que se assemelham, por exemplo, à insulina em organismos unicelulares e bactérias (LE ROITH *et al.,* 1980), à calcitonina em invertebrados (CHAN *et al.,* 1981), e à gonadotrofina coriônica em bactérias (COHEN & STRAMPP, 1976; MARUO *et al.,*

1979), demonstrando um surgimento muito cedo na história evolutiva e pouca mutação desde então (NIALL, 1982). Tomemos como exemplo a família dos nonapeptídeos (nove aminoácidos peptídicos), uma família que inclui hormônios notáveis como a ocitocina e a vasopressina (ou arginina-vasopressina). O pequeno tamanho faz com que sejam pouco tolerantes a mutações (HOYLE, 1999; WALLIS, 2012), embora variações em apenas um aminoácido seja suficiente para alterar completamente a função desses hormônios, diferentemente do que acontece com os hormônios esteroides.

Vertebrados basais (peixes, anfíbios e agnatos) secretam homólogos da ocitocina, chamados mesotocina, isotocina, glumitocina, valitocina, aspargtocina e vasotocina (ACHER, 1978; DONALDSON & YOUNG, 2008). Embora considerados originalmente como hormônios dos vertebrados, homólogos da ocitocina e vasopressina existem há mais de 700 milhões de anos, e tanto vertebrados quanto invertebrados apresentam peptídeos estruturalmente semelhantes (KEVERNE & CURLEY, 2004). Alguns exemplos são a annetocina e a conopressina, nonapeptídeos atuantes na função reprodutiva de anelídeos e caramujos (VAN KESTEREN *et al.,* 1995; SATAKE *et al.,* 1999).

Com relação especificamente à linhagem da vasopressina/ocitocina, ainda não é possível definir qual dos dois hormônios surgiu primeiro na evolução (Fig. 4). Tal conflito deve-se ao fato de que nos agnatos foi identificado um peptídeo similar tanto à ocitocina (Cys-Tyr-**Ile**-Gln-Asn-Cys-**Pro**-Leu-Gly) quanto à vasopressina (Cys-Tyr-**Phe**-Gln-Asn-Cys-Pro-**Arg**-Gly), a vasotocina (Cys-Tyr-**Ile**-Gln-Asn-Cys-**Pro**-**Arg**-Gly). A semelhança entre os três peptídeos não permite definir se a substituição mais provável de ocorrer foi da vasotocina para a vasopressina ou para a ocitocina (MOHR *et al.,* 1995; HOYLE, 1999). A análise da fisiologia evolutiva dessa linhagem aponta para um ancestral comum com gene codificante para vasotocina que, após duplicação, originou a ocitocina e a vasopressina, presentes já nos elasmobrânquios, em vez de se tratar de origens independentes (SAWYER, 1977; VAN KESTEREN *et al.,* 1992; MOHR *et al.,* 1995; HOYLE, 1999). Ambos os hormônios compartilham 80% de homologia e, apesar da pouca diferença, isso é suficiente para resultar em funções fisiológicas bem distintas: enquanto a ocitocina está relacionada à reprodução, a vasopressina está ligada à homeostase – balanço hídrico e eletrolítico (BENTLEY, 1980; HOYLE, 1999; INSEL & YOUNG, 2000), e devido a isso, a vasopressina também é chamada de hormônio antidiurético (MOLINA, 2014).

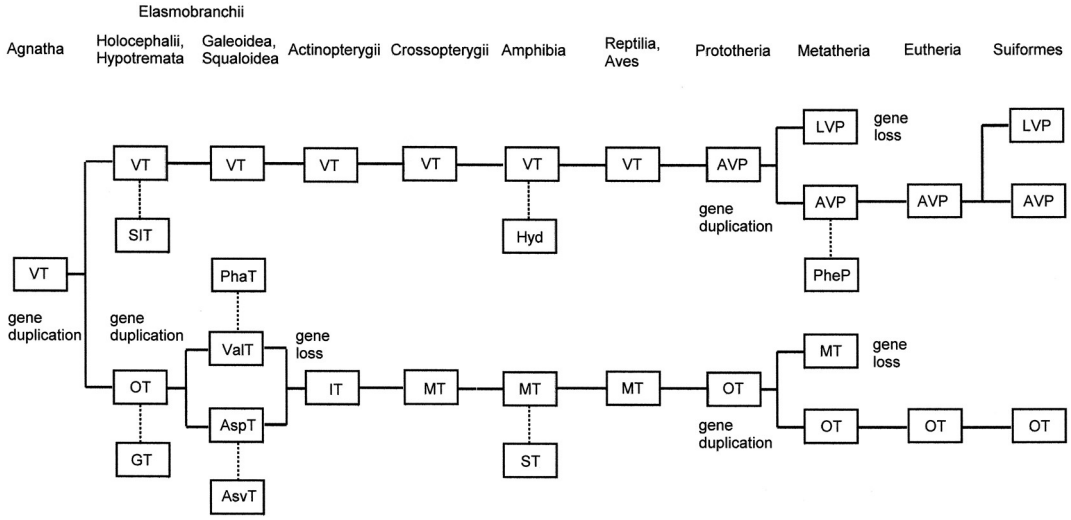


Figura 4: Diagrama esquemático da evolução da família da ocitocina/vasopressina. Adaptado de: HOYLE (1999). Nota: não indica evolução filogenética das linhagens animais.

À exemplo da ocitocina (OT), esta é produzida no hipotálamo, secretada pela neurohipófise e atua em região próxima, no cérebro e na amígdala. Ela é composta por nove aminoácidos, onde as posições 1, 6, 7 e 9 são as mais conservadas, se comparadas às posições menos estáveis 2-5 e 8. Apesar de conservada, foram descritas recentemente variantes da molécula de ocitocina em primatas neotropicais, com substituição da leucina por prolina (LEE *et al.,* 2011), alanina, fenilalanina ou treonina, Leu^8, Pro^8 e Fe^2 (REN *et al.,* 2015). Admiravelmente, a diversificação das moléculas de OT nos primatas Neotropicais foi associada a maior frequência de cuidado biparental (FRENCH *et al.,* 2016), enfatizando o papel primordial desse hormônio entre os primatas, sobretudo o cuidado parental. O estímulo para sua produção é referente ao alongamento do cérvix e útero durante o parto e também pela estimulação dos mamilos durante a lactação (RUSSEL & LENG, 1998). Porém, apesar de ser geralmente associada às fêmeas, os machos podem produzir ocitocina tanto no sistema hipotálamo-hipófise quanto nos testículos (IVELL *et al.,* 1997). O estímulo pode advir da ejaculação, por exemplo, atuando tanto no cérebro quanto no sistema reprodutivo, com profunda conexão com o comportamento sexual (e.g. ARGIOLAS & MELIS, 2004). Há diversos desdobramentos para o funcionamento da reprodução dos machos, mas esse tópico ainda é pouco conhecido (IVELL *et al.,* 1997).

Hormônios e Comportamento

Além de regularem a função reprodutiva, os hormônios são capazes de alterar o comportamento dos animais. Tanto os esteroides quanto a família dos nonapeptídeos influenciam o comportamento social. Tal influência deve-se ao fato de haver receptores para estes hormônios distribuídos em diversas regiões do cérebro, o órgão-alvo responsável por alterar o comportamento dos indivíduos. Apesar de tradicionalmente dizer-se que os hormônios são o mecanismo fisiológico regulador e causador das alterações comportamentais, atualmente reconhece-se a possibilidade da direção contrária, a de o comportamento causar mudanças hormonais (BEACH, 1975; 1976). Nesse sentido, determinados comportamentos podem incrementar tanto a produção hormonal quanto a expressão de receptores hormonais (e.g. SWANEY *et al.,* 2012).

O comportamento animal, portanto, é resultado da atividade conjunta dos sistemas nervoso e endócrino, permitindo que um organismo responda ao ambiente no qual ele está inserido (ALCOCK, 2001). Contudo, o comportamento é mais do que apenas os movimentos exercidos pelo corpo de um animal, requerendo a iniciação, a coordenação e o encerramento de padrões controlados tanto por fatores endógenos (sistema nervoso central), quanto pelo ambiente exógeno (TINBERGEN, 1963). É interessante pensar que o comportamento, sobretudo o comportamento sexual, evoluiu como uma forma de comunicação entre indivíduos. Nesse contexto, há interação entre o emissor e o receptor do sinal, um macho e uma fêmea, por exemplo. Os movimentos do emissor, que antes serviam uma função, sofrem mudanças evolutivas e alteram a resposta do receptor, nesse caso referindo-se a quem recebe o sinal comportamental (HUXLEY, 1914; CULLEN, 1966). Essa comunicação foi tão eficiente em reduzir a ambiguidade do sinal que talvez seja a razão pela qual alguns padrões de comportamentos sexuais sejam amplamente distribuídos entre táxons tão diferentes, tornando-se, então, a chamada ritualização, em que a estereotipia de determinados movimentos ajuda no seu reconhecimento (CULLEN, 1966; HINDE, 1966). Destacam-se os comportamentos de corte, lordose e monta, observados em roedores, grandes felinos, primatas e aves (HUXLEY, 1914; CULLEN, 1966; BEACH, 1967; PFAFF, 1973; STANTON *et al.,* 2015).

Há diversos hormônios envolvidos nas interações sociais, sobretudo os hormônios esteroides, especificamente andrógenos, progestágenos, estrógenos e glicocorticoides, e também hormônios não-esteroides, como a prolactina e a ocitocina (BLAUSTEIN & OLSTER, 1989). Deve-se ressaltar, contudo, que um hormônio não é responsável por um

comportamento específico, e sim que existe interação entre diversos hormônios e comportamentos (ADKINS-REGAN, 2005). Além disso, parece haver certa hierarquia, pois a atuação de hormônios peptídicos depende de uma preparação prévia por esteroides.

Exemplos relacionados às fêmeas ajudam a elucidar essa questão. Durante o ciclo ovariano de fêmeas adultas, ocorre a flutuação de importantes hormônios, especialmente a progesterona e o estrogênio (DIZEREGA & HODGEN, 1981; SENGER, 2005). Essa cascata hormonal traduz-se em mudanças morfológicas no sistema reprodutivo – referidas como ciclo ovariano –, bem como mudanças comportamentais e outras alterações sistêmicas, geralmente resultando na ovulação em meados do ciclo (período periovulatório ou estro) (BONELLO *et al*., 2004; STOCCO *et al*., 2007). Durante o período periovulatório, os altos níveis de estrogênio tornam as fêmeas mais atraentes aos machos, mais proceptivas em buscá-los e mais receptivas à intromissão peniana (BEACH, 1976). Portanto, os hormônios regulam o comportamento sexual de forma que o interesse de ambos os sexos convirja para a cópula no período periovulatório (e.g. ZIEGLER *et al*., 2005; VAN BELLE & BICCA-MARQUES, 2015).

Ademais, muitas mães lactantes estão sob efeito do anestro lactacional, definido como a inibição da ciclicidade ovariana por conta da lactação já que, durante esse período, há a atuação da ocitocina e da prolactina, hormônios proteicos inibidores da produção de hormônios sexuais e, consequentemente, da ciclicidade ovariana (ALTMANN *et al*., 1978; STEWART, 1988; GORDON *et al*., 1992). Esses hormônios proteicos também apresentam papel crucial na ligação entre mãe e filhote e na expressão do comportamento materno (KENDRICK *et al*., 1987; UVNÄS-MOBERG, 1998; LUPOLI *et al*., 2001). Com o avançar da idade do filhote, a amamentação ocorre com duração reduzida e intervalos maiores, de forma que os níveis de prolactina na mãe reduzam. Dessa forma, ela retoma sua ciclicidade ovariana e o interesse da díade passa a ser oposto, com a mãe rejeitando o acesso à teta cada vez mais frequentemente, enquanto o filhote prossegue com sua demanda contínua pelo leite (BERMAN *et al*., 1993; JOHNSON, 2003; FAIRBANKS & HINDE, 2013). O período de desmame, então, é caracterizado por conflito entre mães e filhotes, podendo ser detectado a partir da inversão dos valores desses hormônios, pois quando os níveis dos hormônios proteicos caem, consequentemente os níveis dos hormônios sexuais aumentam (MANECKJEE *et al*., 1976; MCNEILLY *et al*., 1982). O filhote, por sua vez, responde com chamados típicos

de distresse durante os momentos de rejeição, aumentando seus níveis de cortisol ao longo do processo de desmame (MANDALAYWALA *et al*., 2014).

Alguns mamíferos vivem em grupos estáveis ao longo de suas vidas, diversificando as interações sociais entre indivíduos adultos não necessariamente com cunho sexual (EISENBERG, 1981). Por exemplo, algumas sociedades são majoritariamente matrilineares, com interações mais frequentes entre fêmeas adultas (e.g. hiena *Crocuta crocuta* HOLEKAMP *et al*., 1997); enquanto outras apresentam interações mais frequentes entre machos (e.g. esquilo-de-chão *Xerus inauris* WATERMAN, 1997). Primatas são animais notoriamente sociais e há diversos estudos que apontam outro fator de influência na interação entre comportamento e hormônios: o ambiente social (ABBOTT *et al.,* 2003). Em espécies com hierarquias bem-definidas, primatas de baixo ranking social estão sujeitos a estresse social e, consequentemente, apresentam altos níveis de cortisol. Outras espécies, entretanto, o padrão é contrário: indivíduos de níveis hierárquicos mais altos apresentam níveis de cortisol proporcionalmente mais altos. Outras, ainda, não apresentam diferenças nos níveis de cortisol relacionado ao status social. Há também os casos em que a variação nos níveis de cortisol é independente da hierarquia, porém estimulada pela presença de fêmeas no cio (*Macaca* sp. GLICK, 1984; *Miopithecus* sp. MARTENSZ *et al.,* 1987; *Sapajus* sp. LYNCH *et al.,* 2002 etc.). Dessa forma, indivíduos são flexíveis quanto ao ajuste de seu sistema endócrino e de seu comportamento (e.g. cuidado parental) em resposta ao contexto social – demografia, ecologia, dominância, e tal relação foi definida como socioendocrinologia (BERCOVITCH & ZIEGLER, 2002).

Mensuração Hormonal Não-Invasiva

Finalmente, após exercerem seus efeitos nas células-alvo, tanto os esteroides quanto os peptídeos são metabolizados pelo organismo, transformados nas suas formas biologicamente inativas antes de serem excretados (HEISTERMANN, 2010). Os hormônios podem ser metabolizados via trato gastrointestinal, entrando pela corrente sanguínea ou pela bile e serem excretados nas fezes, ou via rins e excretados na urina (Fig. 6). A metabolização pode resultar na conjugação (transformação) ou não dos hormônios e a proporção de conjugação é espécie-específico (ZIEGLER *et al.,* 1996), de modo que algumas espécies podem apresentar maiores concentrações de metabólitos de um determinado hormônio na urina se comparado às fezes. Na urina, há hormônios solúveis que, em geral, são os peptídeos, ou então formas solúveis conjugadas dos

esteroides (associados a glicuronídeos, por exemplo) (ADLERCREUTZ *et al.,* 1976). No caso das fezes, há predominância de formas não-conjugadas (livres) (ZIEGLER *et al.,* 1996). A extensão do processo metabólico também é espécie-específico, de forma que há diferentes metabólitos do mesmo hormônio-nativo mesmo entre espécies próximas (BAHR *et al.,* 2000; MÖHLE et al., 2000), além de a rota de metabolização ser preferencialmente pela urina ou pelas fezes também varia consideravelmente entre espécies e entre hormônios (ZIEGLER *et al.,* 1989).

É importante enfatizar que há uma diferença de tempo entre o estímulo hormonal (i.e. sua ligação com o receptor), sua resposta e seu aparecimento nas fezes/urina (LASLEY & KIRKPATRICK, 1991; WHITTEN *et al.,* 1998). Em geral, esse atraso é de alguns minutos na urina e de algumas horas nas fezes. Uma questão com relação às fezes é que a presença de bactérias intestinais pode alterar e quebrar os hormônios que ali se encontram, alterando a concentração e forma dos metabólitos (WASSER *et al.,* 1988; HEISTERMANN, 2010).

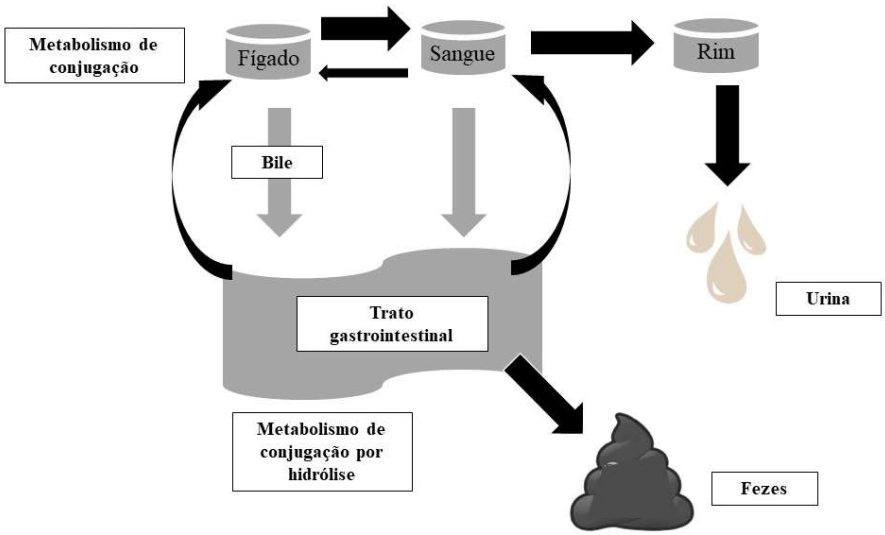


Figura 6: As duas vias de metabolização dos hormônios, resultando na presença concentrada de metabólitos nas fezes e/ou urina. Adaptado de: WHITTEN *et al.* (1998).

Tradicionalmente, hormônios são aferidos a partir da corrente sanguínea, exigindo que o indivíduo seja capturado, anestesiado e confinado para a coleta de sangue (SHIMIZU, 2005). Além de causar estresse ao animal, tal procedimento é inviável de ser aplicado de modo rotineiro para espécies selvagens. O advento das técnicas não-invasivas para mensuração hormonal por meio de urina e fezes aprimorou o estudo da relação entre comportamento e hormônios (VAN BELLE, 2014), além de permitir o acompanhamento

da variação hormonal diária concomitante às observações comportamentais. A popularização dos métodos não-invasivos foi mais pronunciada entre os primatas Catarrhini, como os gorilas, chimpanzés, babuínos e o gênero *Macaca*, porém permanece incipiente nos primatas Neotropicais.

Para a mensuração hormonal, é necessária a aplicação de protocolos específicos correlacionados à espécie, ao hormônio alvo, à matriz biológica e ao método analítico (HEISTERMANN, 2010). As amostras não-invasivas geralmente não apresentam a molécula biologicamente ativa do hormônio, mas sim seus metabólitos. Esses metabólitos são resultantes dos processos de excreção e de metabolização e, portanto, qualquer componente que atue sobre a taxa metabólica irá afetar sua excreção (TAYLOR, 1971; PALME, 2005). Ademais, os metabólitos são cumulativos ao longo do tempo, sendo importante demonstrar que as medidas obtidas a partir de amostras não-invasivas refletem de fato os eventos biológicos, classicamente conceituado como "validação biológica" ou fisiológica (NARAYAN, 2013; VIAU & SOILA, 2014). O protocolo mais difundido para validação é a prova de função ou desafio hormonal (*hormonal challenge*). Esse teste consiste na injeção do hormônio exógeno conhecido de interesse (alvo), ou de seu agonista, no animal de estudo. Para que o teste seja validado, o aumento hormonal decorrente dessa estimulação exógena deve ser detectado nas amostras não-invasivas subsequentes à estimulação (VIAU & SOILA, 2014; BEHRINGER & DESCHNER, 2017). Outros testes menos invasivos dizem respeito à comparação de níveis de metabólitos hormonais entre indivíduos em situações fisiológicas distintas como, por exemplo, indivíduos imaturos *versus* indivíduos maduros sexualmente; fêmeas prenhes *versus* não prenhes, além de outros estados fisiológicos passíveis de comparação.

Além desta etapa da validação biológica, é necessário que os processos laboratoriais escolhidos tenham sido validados, chamados de "validação laboratorial". Para tanto, pressupõe-se que já constem como publicados na literatura, ou que sejam previamente validados, garantindo a coerência dos dados gerados. A validação laboratorial consiste em determinar se o ensaio está medindo efetivamente os metabólitos de interesse (VIAU & SOILA, 2014). Para tal, há diversos testes de validação, dos quais os mais amplamente utilizados são o de precisão, o paralelismo e o de recuperação (ANDREASSON *et al.,* 2015). No teste de paralelismo, por exemplo, determina-se a correlação entre a curva produzida na matriz biológica em estudo e a curva-padrão do "kit" utilizado para o ensaio.

Considera-se o teste validado quando o coeficiente de regressão linear for próximo de 1 e a inclinação da curva estiver entre 0,80 e 1,20.

Os ensaios hormonais mais amplamente empregados são os ensaios imunoenzimáticos como o radioimunoensaio (RIE) e o enzimaimunoensaio (EIE). Os ensaios imunoenzimáticos são assim chamados por serem métodos bioanalíticos que depende da reação de um antígeno (o analito) e um anticorpo (FINDLAY *et al.,* 2000). No RIE, o método baseia-se no uso de um agente ligante específico e de hormônios radioativos como elementos traçadores. Esses hormônios radioativos competem com o hormônio a ser medido (idêntico ao radioativo) por um número limitado de ligações com agente ligante (anticorpos de alta afinidade). Os antígenos marcados livres e os ligados aos anticorpos são então separados em fase sólida ou líquida, em geral com o uso de um segundo anticorpo e posterior centrifugação e/ou decantação antes de se mensurar a radioatividade remanescente na fase ligada. A concentração de antígenos (hormônios) nas amostras testadas é inversamente proporcional à quantidade de radioatividade da fração ligada. Já no segundo método (EIE), enzimas são utilizadas como elementos traçadores. A principal vantagem refere-se ao fato de se evitar possíveis contaminações radioativas, da possibilidade de amplificação catalítica e associação a marcadores quimio ou fluorescentes.

A especificidade de um ensaio é feita com base na exclusividade da ligação entre anticorpo e antígeno (RAEM & RAUCH, 2007). Reações cruzadas ocorrem quando o anticorpo do ensaio também se liga a outras substâncias que são estruturalmente similares e geralmente são incluídas já no manual do fabricante. No caso da OT, há possível reação cruzada com a vasopressina (7,5%) e mesotocina (7%) para determinados kits, e até 100% com a mesotocina em outros kits. A maioria dos ensaios é a partir de sangue ou soro, onde os metabólitos estão em baixas concentrações. Entretanto, amostras não-invasivas, conforme explicitado anteriormente, apresentam metabólitos e, portanto, apresentam efeitos complicadores já que a reação cruzada é mais provável (PREIS *et al.,* 2011; WELTRING *et al.,* 2012), necessitando validações específicas.

Apenas recentemente alguns poucos trabalhos mensuraram ocitocina urinária em primatas não-humanos, sendo eles em chimpanzés *Pan troglodytes* (CROCKFORD *et al.,* 2013; WITTIG *et al.,* 2014); gorilas *Gorilla gorilla* (LEEDS *et al.,* 2018); saguins-cabeça-de-algodão *Saguinus oedipus* (SNOWDON *et al.,* 2010); saguis *Callithrix* spp. (FINKENWIRTH *et al.,* 2015); macacos Rhesus *Macaca mulata* (LEE *et al.,* 2018);

babuínos *Papio hamadryas* (MOSCOVICE & ZIEGLER, 2012) e macacos-prego *Sapajus apella* (BENÍTEZ *et al.,* 2018). É possível que a escassez de trabalhos se deva à dificuldade de se obter urina dos animais. Ainda assim, os trabalhos têm confirmado o papel da OT no comportamento social e outros comportamentos afiliativos (e.g. CROCKFORD *et al.,* 2013; BENÍTEZ *et al.,* 2018). Já com relação às diferenças, a OT nos primatas Catarrhini aumenta após sessões de catação (CROCKFORD *et al.,* 2013). Contudo, os primatas Neotropicais apresentam baixas taxas de interação (e.g. DUNBAR, 1991), de modo que a OT se relaciona a outros comportamentos afiliativos, como o *fur-rubbing* (BENÍTEZ *et al.,* 2018), evidenciando que os primatas Neotropicais estreitam seus vínculos sociais de outras formas.

Com relação à mensuração de hormônios fecais, esta é amplamente empregada nas mais variadas espécies. Ao contrário da urina, as fezes são mais facilmente coletadas e, portanto, a mensuração não-invasiva por fezes vem se popularizando desde a década de 1970 SCHWARZENBERGER *et al.*, 1996). Apesar do longo histórico, tecnologias recentes têm possibilitado a mensuração simultânea de vários hormônios, como a técnica de Cromatografia Líquida Acoplada ao Espectrômetro de Massas (LC-MS). O LC-MS é um método que combina a alta performance da cromatografia líquida (HPLC) com o espectrômetro de massas em tandem. Sua utilização em humanos data desde a década de 1990 (MATTERN *et al.,* 1991), porém a aplicabilidade em animais foi apenas a partir dos anos 2000 e paulatinamente vem sendo incorporada aos estudos com animais selvagens.

Sucintamente, o LC-MS é uma técnica de separação usada para identificar metabólitos específicos em uma dada amostra. O equipamento separa a amostra em frações, e cada fração é analisada por reação cruzada. A separação é realizada pelo HPLC, quando duas fases são colocadas em contato, uma fase estacionária (a coluna) e outra móvel (líquido). As amostras são forçadas através da coluna por pressão e passam por uma série de interações entre as fases estacionária e móvel. As interações exploram as diferenças nas propriedades químicas ou físicas dos componentes com a amostra. Essas diferenças governam a taxa de migração dos componentes individuais sob a influência da fase móvel se deslocando pela coluna. Componentes separados aumentam a interação com a fase estacionária. Os componentes com menor resistência saem primeiro, enquanto o material mais fortemente retido sai por último. Um exemplo é o uso de coluna de sílica na qual os compostos apolares saem primeiro (MURTAGH *et al.,* 2013). É possível

adicionar ao sistema uma segunda fase móvel de polaridade oposta, chamado sistema isocrático. Dessa forma, os compostos polares e apolares sairão de acordo com sua afinidade, alterada pela mudança da fase móvel. Essa técnica melhora a performance e diminui o tempo de eluição. Em seguida, os compostos são transferidos para o MS, separados e lidos de acordo com a razão carga/massa do composto (DE HOFFMANN, 2005). A leitura pelo equipamento MS é complexa, levando em consideração a ionização dos analitos. Essa é uma técnica altamente sensível (até 4 ordens de magnitude).

Os hormônios esteroides são metabolizados pelo fígado e rins, excretados via urina e fezes nas formas conjugadas ou não, como glicuronídeos e sulfatos. Embora o LC-MS seja capaz de mensurar formas conjugadas e não-conjugadas, é preferível mensurar as formas não-conjugadas devido ao alto de número de possibilidades das formas conjugadas. Entretanto, é necessário não alterar/degradar o analito após a desconjungação (HAUSER *et al.,* 2008a).

O LC-MS não necessita de validação laboratorial porque não sofre dos efeitos de reação cruzada, embora ainda dependa de validação biológica (PALME, 2005). Apesar de ainda ser uma metodologia cara, o LC-MS permite a mensuração simultânea de diversos hormônios, com uma quantidade reduzida de amostra (0,1g) se comparada aos imunoensaios (0,5g) embora os imunoensaios continuem sendo mais rápidos e mais baratos. Além disso, como a utilização dos imunoensaios é amplamente difundida, não há a necessidade de desenvolver métodos do zero, o que não é verdade para o LC-MS. Uma vantagem é que, uma vez que o LC-MS permite a mensuração de diferentes hormônios e seus metabólitos simultaneamente, ele é preferido nos estudos interessados em uma multitude de efeitos, com o caso da endocrinologia comportamental.

O tratamento das amostras não-invasivas, i.e., extração, continua sendo um processo inerente à mensuração hormonal por LC-MS. Em geral, emprega-se a extração de fase sólida e etapas de hidrólise ou solvólise dependendo do interesse em formas conjugadas e não conjugadas (HAUSER *et al.,* 2008b). Portanto, os métodos de extração para leitura ainda demandam muito tempo se comparados aos imunoensaios, especialmente porque ainda é um método pouco utilizado nesse quesito. Até o momento, apenas três trabalhos empregaram essa metodologia para amostras não-invasivas em animais selvagens (WELTRING *et al.,* 2012; GESQUIERE *et al.,* 2014; HABUMUREMYI *et al.,* 2014), realizados em dois laboratórios no mundo, o Wisconsin

National Primate Research Center (WNPRC), nos EUA e o Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology, na Alemanha.

Além do preço e do tempo para extração, os efeitos de matriz e problemas com ionização são duas das principais desvantagens do LC-MS. Os efeitos de matriz – o aumento ou a supressão da resposta do analito – impactam a precisão e a robustez dos ensaios (GUO & LANKMAYR, 2011). Finalmente, além do custo do equipamento, há também a necessidade de pessoal especializado para o manuseio deste e um profundo conhecimento bioquímico para o desenvolvimento de métodos e protocolos.

Portanto, o objetivo do presente trabalho é aplicar e validar dois métodos de mensuração hormonal ainda pouco difundidos: o ensaio imunoenzimático de ocitocina urinária e a mensuração multiesteroide fecal pelo LC-MS para amostras de bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*) selvagens. Dessa forma, espera-se não apenas obter resultados inovadores quanto também validar a técnica para estudos futuros.

MATERIAL E MÉTODOS

Área e Animais de Estudo

As amostras foram coletadas de bugios-ruivos (*Alouatta clamitans*) selvagens que habitam o Parque Estadual Carlos Botelho (PECB), São Paulo. O regime pluviométrico consiste em períodos de chuva bem definidos no verão alternados com períodos de menor pluviosidade no inverno, embora sem estação seca definida A vegetação local é composta por Floresta Ombrófila Denso-Montana e Sub-Montana, majoritariamente primária, embora haja lugares onde a vegetação é secundária (PLANO DE MANEJO, 2015).

Na região de estudo, há cinco grupos de bugios vizinhos, sendo que dois grupos foram acompanhados assiduamente entre novembro de 2017 e setembro de 2019. Os animais podem ser identificados individualmente por características singulares, como formato do rosto, marcas naturais, cicatrizes e despigmentação. Em cada grupo há entre 6 e 7 indivíduos, sendo um macho dominante, duas fêmeas adultas e seus filhotes, e um a dois machos subadultos de parentesco indefinido com os demais membros do grupo.

Coleta e Armazenamento de Amostras

Para relacionar os níveis hormonais ao comportamento social, foram coletadas amostras frescas de fezes e urina que pudessem ser associadas a um indivíduo sem equívoco e sem contaminação por outros indivíduos ou entre matrizes (*e.g.*

HEISTERMANN, 2010). As fezes foram coletadas diretamente do chão e às vezes foram coletadas mais de uma vez no dia para um mesmo indivíduo. Essa repetição permite avaliar como os hormônios flutuam ao longo do dia, uma característica relevante sobretudo para os glicocorticoides e andrógenos, que apresentam grande variação diária (PARIKH *et al.,* 2018).

No caso da urina, utilizou-se dois métodos: i) interceptação com um funil antes de a urina atingir o chão; ou ii) aspiração com pipeta a urina de uma superfície (folha, folhiço). As fezes foram coletadas diariamente de todos os indivíduos, enquanto a urina foi pelo menos uma vez ao mês. Em geral é necessário cerca de 0,5g de amostra fecal por hormônio. Já com relação à matriz urina, pode ser necessário até 1mL de amostra para que o ensaio seja de boa qualidade.

Cada amostra foi identificada e armazenada *in natura* em freezer (-20°C) no laboratório de apoio do PECB e, em seguida, transferida para as dependências do Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP. As amostras fecais foram liofilizadas, onde é eliminada a umidade e o material inerte. Para tanto, os tubos pernoitaram (24h) em freezer a -30°C antes de permanecerem no liofilizador LIOTOP L108 até total secagem das amostras (geralmente em torno de 24h). Já as amostras de urina seguiram mantidas congeladas *in natura* até análise.

Nessa etapa, as amostras foram enviadas ao WNPRC para análise, laboratório que dispõe de toda a infraestrutura e pessoal necessários para as análises em questão. As amostras fecais foram maceradas e peneiradas manualmente até pulverização, de modo a retornar um pó sem sementes, gravetos e outros materiais inertes de menor escala.

Extração e Ensaio de Ocitocina e Creatinina

As amostras urinárias foram descongeladas em banho de gelo uma vez que a OT é um hormônio extremamente lábil. Após seu descongelamento, as amostras foram passadas no vórtex e centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos. O método de extração utilizado foi por fase sólida (SPE), utilizando-se o cartucho Supelco (Sigma-Aldrich). As amostras foram extraídas por pressão positiva no equipamento CEREX 48 SPE ware. A primeira etapa consiste em condicionar os cartuchos enviando 1mL de 100% metanol, seguido de 1mL de água duplamente destilada. Em seguida, injeta-se 1mL da amostra (que, caso disponha de menos de 1mL de volume, este deverá ser completado com água

duplamente destilada). Nessa etapa, espera-se que o componente de interesse, no caso as moléculas de ocitocina, prenda-se à coluna devido a sua afinidade. Após essa etapa, os cartuchos são lavados com 1mL de solução de 10% acetonitrila (ACN)/0.1% de ácido trifluoroacético (TFA). Finalmente, adiciona-se 1mL de 80% ACN, amostras essas que serão coletadas para serem utilizadas no imunoensaio.

Em seguida os tubos são secados em uma centrífuga (concentrador) à vácuo (*SpeedVac*) por pelo menos 1 hora, a uma temperatura de 50°C e pressão de 6.5 Hpr (pressões atmosféricas). Após secas, as amostras foram ressuspensas com 300µL de 100% etanol, onde foram posteriormente passadas no vórtex por 30 segundos à velocidade máxima. O ensaio de ocitocina seguiu as instruções do fabricante (ENZO Life Science Oxytocin ELISA kit). Os resultados da concentração de ocitocina urinária são relativos e devem ser interpretados em relação ao volume e à concentração da urina. A relação mais comum é a de OT em relação à creatinina urinária, que depende de uma extração e análises à parte. Para mensuração de creatinina, precisa-se apenas de 6.3µL de urina adicionada à 500µL de água destilada. As amostras devem ser mantidas congeladas até análise. O ensaio de creatinina seguiu as instruções do fabricante (ENZO Life Science Creatinine Colorimetric Detection kit).

Extração e Ensaio Multiesteroide no LC-MS

Para o ensaio multiesteroide, foram testados sete diferentes protocolos diferentes, embora as diferenças entre alguns deles sejam em maior ou menor escala. Os protocolos 2 a 7 incluíram sempre duas amostras em separado, sendo uma de um macho e uma de uma fêmea. O protocolo 1 utilizou um *pool* de amostras fecais, onde adicionou-se 5mL de etanol 50% a 0,1g de fezes secas pulverizadas. Em seguida, a amostra passou no vortex por 8 minutos e depois na centrífuga por 10 min a 3000 rpm. Transferiu-se 3mL do sobrenadante em um novo tubo de ensaio limpo. O sobrenadante foi novamente passado no vórtex e 1mL foi transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 500µL de água duplamente destilada. Nessa etapa também foi adicionada 100µL do controle interno (ISTD) – de uma concentração original de 200pg/µL de soro humano – para leitura multiesteroide. Em seguida, realizou-se uma extração com éter metil terciário butílico (MTBE), adicionando-se 2mL de MTBE, misturando por 5 minutos, centrifugando a 1500 rpm por 3 minutos e, em seguida, extraindo a camada de éter (superior) e transferindo para outro tubo antes de ser secado em fluxo com banho-maria a 60ºC. Após completa secagem, as amostras foram ressuspensas com 200µL de etanol a 100% e

passadas no vórtex. Em seguida, foram adicionados 500µL de água duplamente destilada, seguido da extração com diclorometano (1mL de diclorometano, vortex por 5 minutos, centrifugação a 1500 rpm por 3minutos e extração da camada inferior de dicloronometano para ser transferido a um novo tubo de ensaio). O passo seguinte foi a derivatização com cloreto de dansilo (DC). O DC é diluído por ACN (150µL DC:500µL ACN), onde 25µL de DC diluído são associados a 25µL de bicarbonato de sódio, gentilmente chacoalhados e incubados a 40ºC por 4 minutos.

No protocolo 2, adicionou-se uma etapa de extração líquida-líquida (LLE) após a extração por MTBE. A extração líquida consistiu em adicionar 2mL de buffer de bicarbonato de amônio com pH 8,0 em um tubo contendo 2mL de fezes homogeneizadas. Em seguida, adiciona-se 2mL de 70:30 hexanos etil-acetato, onde são vortexados por 8 minutos e centrifugados a 1500rpm por 3 minutos. Pipeta-se a fase orgânica (camada superior) em um novo tubo, secando seu conteúdo em banho-maria a 60ºC e seguindo-se com etapa de derivatização. Uma testagem paralela deste protocolo consistiu em utilizar, inicialmente, 2mL de sobrenadante e também alterar o pH para 10.

Já no protocolo 3, adicionou-se duas etapas: uma de solvólise e uma SPE, além do aumento do volume de ISTD para 200 µL (durante a solvólise). O tratamento inicial das amostras de fezes secas também foi alterado. Em vez de 50% etanol, optou-se por adicionar 3mL de 80% metanol, passando-as no vórtex por 15 minutos na sequência e também uma centrifugação de 1500rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e alocados no *speedvac* até secagem total das amostras (pelo menos duas horas). Em seguida, as amostras foram reconstituídas com 500µL água ultradestilada, 200µL de controle interno foram adicionados e também 100 µL de solução de cloreto de sódio saturada. A esse tubo também foram adicionados 50µL de ácido sulfúrico e 4mL de acetato de etila. Esse tubo foi passado em vórtex por 5minutos e incubado em banho maria a 55ºC por 2 horas. Após incubação, foram adicionados 2mL de água ultradestilada, passados novamente no vórtex e centriguados a 1000 rpm por 3 minutos. A camada orgânica foi transferida para um novo tubo e seca em banho maria a 60ºC. A camada orgânica foi transferida para um novo tubo e seca em fluxo com banho-maria a 60ºC. O cartucho da SPE foi condicionado da mesma forma, porém após passagem das amostras, os cartuchos foram lavados com 1mL de água e 1mL de metanol a 5%. Em seguida, os cartuchos foram eluídos com 1mL de metanol 100% em duas vezes, de modo que o volume final fosse 2mL e essa fração foi coletada para ser seca em banho

maria a 60ºC. O passo seguinte consistiu em uma LLE onde as amostras foram ressuspensas com 200µL de etanol 100% e 500µL de água ultra destilada, 1mL de diclorometano, passadas no vortex e centrifugadas a 1500rpm por 3 minutos. A camada inferior foi transferida para outro tubo e seca em fluxo com banho-maria a 60ºC (que durou cerca de 10 minutos). A etapa final foi a derivatização.

O protocolo 4 incluiu uma etapa de remoção de lipídios e o volume de ISTD voltou para 100µL (durante a solvólise). A preparação das amostras com 3mL de 80% metanol se manteve, bem como a solvólise realizada na sequência. Contudo, após ser seca em fluxo com banho-maria a 60ºC, as amostras foram reconsitutídas com 1mL de ácido fórmico em metanol (1%). Para remoção dos lipídios, foi utilizado um outro cartucho (Hybrid SPE 30mg/1mL), o qual foi condicionado com 1mL de ácido fórmico em metanol (1%). As amostras foram passadas pelos cartuchos, e em seguida os mesmos foram eluídos com 1mL de ácido fórmico em metanol duas vezes, coletando-se essas frações conjuntamente, de modo que o volume final fosse 1mL. Essas amostras foram secas em banho-maria a 60ºC, etapa essa que durou cerca de 20 minutos. As etapas seguintes de SPE, LLE e derivatização foram iguais ao protocolo 3.

O protocolo 5 acrescentou mudanças na etapa de SPE e uma sonicação, além do aumento do volume de ISTD para 300µL (durante a solvólise). Diferentemente dos protocolos anteriores, após a secagem das amostras em banho-maria na etapa de remoção de lipídios, as amostras foram reconstituídas com 1mL de PBS e sonicadas por 5 minutos para garantir total reconstituição. Em seguida, o cartucho de SPE foi condicionado com 1mL de metanol 100%, 1mL de água duplamente destilada e 1mL de PBS. Em seguida, a amostra foi passada pela coluna, e a mesma foi lavada com 1mL de água duas vezes. A última etapa consistiu em eluir os cartuchos com 1mL de metanol 100% e coletar essas frações. Também eluiu-se os cartuchos com 1mL de acetato de etila 100%, combinando-se as duas frações no mesmo tubo. Após serem secas em banho-maria 60ºC, as etapas seguintes foram de LLE e derivatização.

Já o protocolo 6 alterou a preparação inicial das amostras e a SPE, e o volume de ISTD foi alterado para 200µL (adicionado durante a solvólise). Após adicionar 3mL de metanol a 80% às amostras pulverizadas, as mesmas foram vortexadas e centrifugadas por 3minutos a 1500rpm. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, e repetiu-se a lavagem com 3mL de metanol a 80%, de modo que o volume final foi próximo de 6mL. As amostras foram secas (cerca de 5horas para secagem total) e

reconstituídas com 200µL de etanol 100%. A etapa seguinte foi de solvólise, remoção lipídica e SPE. Nesse caso, após a secagem das amostras em banho maria, elas foram reconstituídas com 1mL de metanol 5% e sonicadas. Os cartuchos, dessa vez maiores (3mL/100mg), foram condicionadas com 3mL de 100% metanol e 3mL de água duplamente destilada. Em seguida, as amostras foram passadas pela coluna, seguida pela lavagem dos cartuchos com 3mL de água e 3mL de metanol 5% novamente. Os cartuchos foram eluídos com 1mL de metanol 100% em duas vezes, de modo que o volume final fosse próximo a 2mL. As amostras foram secas em banho-maria 60ºC, seguidas pelo LLE e derivatização. Uma variante desse protocolo foi incluir os 200 µL de ISTD durante a remoção lipídica, reconstituir as amostras com 3mL de metanol 5% antes da SPE e, além disso, a lavagem dos mesmos consistiu em 3mL de hexanos (diferentemente da lavagem com água e metanol 5%). Ademais, os cartuchos foram eluídos com 1mL de 70% acetato de etila/30% hexanos em três vezes, de forma que o volume final também deveria ser próximo a 3mL. As amostras foram secas e reconstituídas em 400µL 70% acetato de etila/30% hexano, onde foram secas novamente em banho-maria e derivatizadas.

Finalmente, o protocolo 7 suprimiu a etapa de remoção lipídica, alterou tanto o cartucho da SPE quanto seus reagentes e aumentou o tempo de leitura pelo equipamento (48 minutos). Nesse protocolo, o tempo de eluição deve ser quadruplicado, de forma que os metabólitos devem, então, aparecer em um momento quatro vezes mais tarde. O volume de ISTD permaneceu 200µL (adicionados durante a solvólise). Após a secagem em banho-maria do último passo da solvólise, as amostras foram reconstituídas com 1mL de metanol 5% e sonicadas. Os cartuchos (60mg Oasis HLB SPE) foram condicionados com 1mL de metanol 100% e 1mL de água duplamente destilada. As amostras foram passadas pelas colunas e estas foram lavadas com 1mL de hexano em duas vezes. Os cartuchos foram eluídos com 1mL de 70% acetato de etila/30% hexano em duas vezes, de modo que o volume final fosse próximo a 2mL. As amostras eluídas foram secas em banho-maria 60ºC e reconstituídas com 400µL 70% acetato de etila/30% hexano, onde foram secas novamente em banho-maria e derivatizadas.

As amostras foram lidas no espectrômetro de massa com armadilha de íons ("*ion trap*") linear quadripolar QTRAP 5500 (Sciex) equipado com uma fonte de ionização química à pressão atmosférica. O sistema incluiu duas bombas Shimadzu LC20ADXR e um amostrador automático Shimadzu SIL20ACXR. Detalhes sobre as especificações de leitura do equipamento podem ser acessadas em KENEALY *et al.* (2013). O tempo de

retenção para cada analitos é de 2,71min para cortisol, 2,75min para cortisona, 3,94 para testosterona, 4,50 para androstenediona, 7,60 para progesterona, 18,85 para estradiol e 20,29 para estrona. Esses valores não são universais e variam, por exemplo, de acordo com o gradiente da coluna da fase móvel do LC-MS utilizado em cada equipamento/laboratório. O tempo de leitura padrão é de 12 minutos por amostra.

RESULTADOS

Imunoensaio para Ocitocina

Para a validação, é necessário eleger amostras de alta e baixa concentração. Para tanto, amostras que sabidamente devem apresentar níveis hormonais distintos. No caso, escolheu-se machos e fêmeas, fêmeas sem filhote e fêmeas com filhotes jovens. Os resultados do ensaio de ocitocina estão dispostos na Tabela 1. A curva padrão mostra que o limite mínimo de detecção é de 1,56 pg/mL e o limite máximo é de 100,00 pg/mL (Fig. 7). Uma curva padrão foi produzida para cada placa lida, porém aqui será apresentada uma curva modelo.

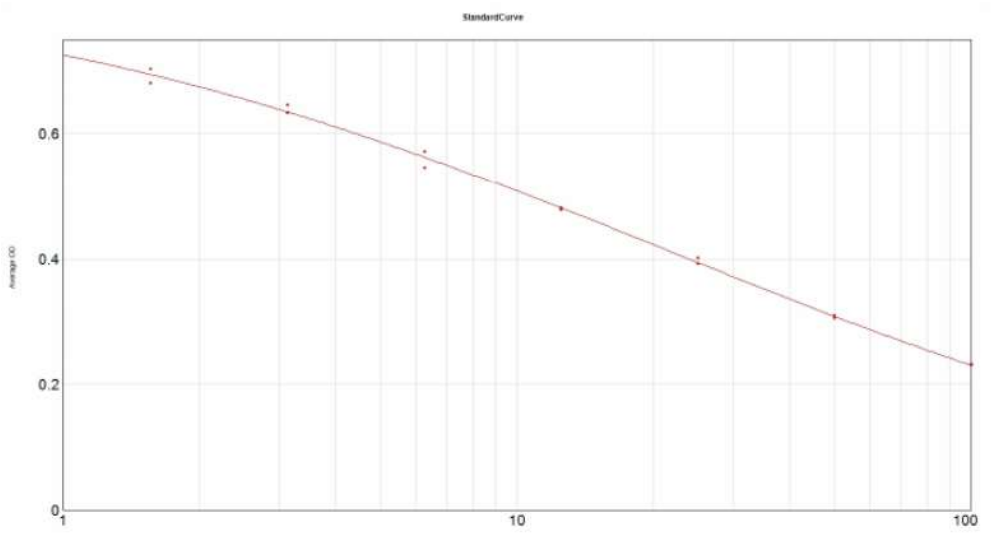


Figura 7: Curva padrão do ensaio imunoenzimático de ocitocina. A curva está em escala logarítmica.

Tabela 1: Listagem de amostras eleitas para o primeiro ensaio de ocitocina para serem utilizadas nas validações.

Amostra	Data de Coleta	Categoria Sexo-Etária	OT (pg/poço)	OT (pg/mL)	Cr	OT (mL)/Cr
GS312	3-Feb-2018	macho dominante	1121.396	2943.665	2.016	1460.15
GS420	17-May-2018	fêmea adulta	333.361	875.072	2.157	405.69
GS425	2-Jun-2018	fêmea com filhote	1203.677	3159.652	1.172	2695.95
GS624	29-Jul-2018	fêmea com filhote	167.843	440.589	2.146	205.31
GS627	26-Jul-2018	fêmea com filhote	1013.709	2660.985	0.996	2671.67
GS797	5-Oct-2018	fêmea com filhote	15.022	39.434	0.61	64.65
GS799	6-Oct-2018	fêmea com filhote	393.998	1034.244	0.557	1856.81
GS800	26-Sep-2018	fêmea com filhote	1025.87	2692.908	0.8	3366.14
GS802	13-Oct-2018	fêmea com filhote	8.727	22.907	0.554	41.35
GS844	23-Nov-2017	macho dominante	8.192	21.505	0.599	35.90

Validação dos Ensaios de Ocitocina

Uma vez que a mensuração de ocitocina nunca havia sido realizada com urina de bugio, os ensaios precisavam ser validados. Foram adotados três procedimentos de validação: i) o paralelismo, ii) a acurácia e iii) a recuperação. O teste de paralelismo consiste em diluir serialmente um *pool* de amostras de alta concentração (de 1 até 10 vezes). Já no caso da acurácia, é utilizado um *pool* de amostras de baixa concentração, porém, em vez de diluir como no caso do teste de paralelismo, são adicionadas concentrações conhecidas do hormônio em questão que, no caso, consistem nos padrões do kit comercial (estes sim, são serialmente diluídos). Finalmente, o teste de recuperação consiste em adicionar concentrações conhecidas da solução estoque contida no kit antes da extração e coletar as frações intermediárias do processo de extração de forma a detectar quanto e onde são perdidas as moléculas de ocitocina, caso ocorra perda. As amostras GS624 e GS799 foram consideradas amostras de alta concentração e as amostras GS802 e GS844 foram consideradas de baixa concentração.

Os resultados do paralelismo não foram satisfatórios, mostrando que as amostras diluídas serialmente não estavam correlacionadas com a curva padrão do kit. Os resultados do ensaio estão dispostos no Apêndice IV.A. Devido a esses resultados, era possível que as diluições tivessem sido muito abruptas e, portanto, decidimos por intervalos menores. Portanto, além de repetirmos algumas diluições, também testamos as seguintes diluições: 25%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%, considerando que a

diluição 1:2 equivale a 50%. Para este teste, elencamos quatro amostras (GS624, GS627, GS797 e GS844). Os resultados dessas diluições estão no Apêndice IV.B.

Já no teste de acurácia, idealmente deve mostrar em uma porcentagem de variação entre ± 15% (Apêndice IV.C). As dosagens foram realizadas em triplicata para verificar possíveis erros de pipetagem. Ainda assim, o terceiro poço da triplicata retornava valores destoantes e possivelmente referem-se à material inerte contido nas amostras.

Similarmente, para o teste de acurácia elegemos valores intermediários que fossem incluídos na curva padrão, sendo eles 0, 15, 20 e 80 pg/mL de concentração estoque de ocitocina, adicionados à concentração da amostra elencada para este teste. Os resultados estão dispostos na tabela 4, evidenciando inconsistências já que valores muito baixos e muito altos apresentam uma taxa de recuperação mais baixa, ao passo que valores intermediários geraram uma recuperação aceitável de 66%.

Finalmente, para o teste de recuperação, elencamos a amostra GS800. Os resultados foram inconsistentes, de forma que a recuperação variou de acordo com a concentração dos poços (Apêndice IV.D). Concentrações baixas e altas apresentaram valores de recuperação menores. As frações intermediárias foram coletadas e mensuradas em um ensaio à parte (Apêndice IV.E).

Devido à alta inconsistência, optamos por acrescentar etapas de purificação durante a extração. Foram utilizadas duas técnicas: i) passar as amostras por um filtro GD/X de 0,2µm (PDVF Filter media) de 25mm de diâmetro; e ii) adicionar outra segunda etapa de SPE. Para estas tentativas, foram elencadas as amostras GS627 e GS800 separadas e em duplicata.

Para a tentativa i, os tubos foram secos no *speedvac* e reconstituídos com isopropanol 20%, porém o volume final foi de 10mL. Com a ajuda de uma seringa, o volume total foi passado pelo filtro. Após a passagem, mais 3mL de isopropanol 80% foram enviados para recuperar moléculas de OT que possivelmente tivessem ficado retidas no filtro (utiliza-se o isopropanol pela sua alta afinidade com a OT). Mesmo enviando-se cerca de 13mL, o volume final foi de 11mL para as quatro amostras. As amostras foram secas e submetidas ao ensaio de ocitocina.

Já na tentativa ii, as amostras que estavam estocadas em 300µL de etanol 100%, foram secadas no *speedvac* e reconstituídas com 200µL de isopropanol 20% de forma que o volume final fosse 1mL. Durante a segunda SPE, a etapa de lavagem foi repetida três

vezes e, em vez de ACN/TFA, a lavagem consistiu em 0.1% TFA. As etapas seguintes foram seguindo o protocolo padrão de extração e ensaio (Apêndice IV.F).

Especialmente no que tange à amostra GS627 dessas duas tentativas, o resultado das duplicatas foi discrepante, onde uma apresentou valores de 29.182 pg/poço e a segunda de 15.360 pg/poço. Os resultados da tentativa ii (SPE) foram mais consistentes entre si, embora muito próximos do limite mínimo de detecção do ensaio.

Analisando-se as dosagens das amostras puras nos diferentes ensaios, é possível perceber que uma mesma amostra apresentou diferentes valores em diferentes ensaios. Por exemplo, a amostra GS624 apresentou valores distintos (167.843pg/poço em um ensaio e 476.801pg/poço em outro). Aliado a isso, uma vez que o teste de paralelismo falhou e o teste de recuperação mostrou uma percentagem baixa nos valores altos e baixos, então não se pode dizer que o ensaio foi validado, ainda que o teste de acurácia tenha mostrado um desvio satisfatório.

Ensaio Multiesteroide no LC-MS

Todos os protocolos de extração requereram dois dias para finalização, um processo bem mais longo se comparado aos protocolos de extração por EIE/RIE. Ademais, o controle interno (ISTD) não apareceu nas imagens geradas pelo LC-MS, motivo que nos levou a alterar tanto seu volume quanto o momento em que o mesmo era adicionado, de modo que nada fosse perdido em meio a tantas etapas de purificação. Os metabólitos do ISTD são quimicamente e estruturalmente semelhantes aos metabólitos encontrados nas amostras, de modo que devem eluir em tempo próximo ao seu respectivo analito, com os metabólitos do ISTD eluindo primeiro e os da amostra, cerca de 2 minutos após o pico do ISTD. É por conta da adição do ISTD que cada amostra tem seu próprio controle interno, ou sua própria "validação".

A progesterona será utilizada aqui como exemplo (Apêndice IV.G). A progesterona da amostra é quebrada em duas regiões que aceitam hidrogênio, de modo que seja possível rotular isotopicamente nove de seus hidrogênios (por isso designada como progesterone-d9). Essa rotulação ocorre no equipamento LC-MS. Além disso, são usados dois fragmentos ionizados do mesmo analito, sendo um para quantificação (linha azul na figura, massa 315/97) e outro para qualificação (linha vermelha na figura, massa 315/109), e o padrão de ambos no cromatograma deve ser o mesmo. A ausência de

correspondência entre os quantificadores e qualificadores também indicam problema de leitura.

No protocolo 1, não foi possível detectar os níveis de progesterona, o que nos levou a aumentar o volume inicial das amostras no protocolo 2. Além disso, os primeiros 3 protocolos apresentaram muito ruído e as amostras entupiram o equipamento, o que nos levou a incluir uma etapa de remoção lipídica no protocolo 4. Apenas no protocolo 6 observamos os níveis de progesterona, porém os demais hormônios não foram detectados. Os protocolos aqui empregados foram semelhantes aos utilizados na literatura para as mais variadas matrizes (pelo, fezes e células do cérebro, por exemplo), porém nenhum deles foi capaz de retornar todos os metabólitos de interesse, mesmo quando dobramos o tempo de leitura pelo equipamento.

DISCUSSÃO

Enzimaimunoensaio de Ocitocina

A mensuração de ocitocina (OT) é rodeada de muita controvérsia. Além da discussão acerca da correlação entre níveis sanguíneos periféricos e centrais, também se discute questões metodológicas como a necessidade ou não de extração desse hormônio das matrizes biológicas (MCCULLOUGH *et al.,* 2013; ZIEGLER, 2018). Ademais, um estudo de SELTZER & ZIEGLER (2007) mostrou que a ocitocina urinária corresponde não apenas à forma intacta, mas também à forma fracionada. Esse é um fator complicador já que dependendo de onde o anticorpo se conecta à molécula de OT, os resultados referentes aos níveis de OT podem variar, de modo que os ensaios necessitem reconhecer as diferentes frações desse hormônio. A OT urinária foi extraída com sucesso em primatas e roedores (CARTER *et al.,* 2008; SNOWDON *et al.,* 2010; MOSCOVICE & ZIEGLER, 2012; CROCKFORD *et al.,* 2013; REYES *et al.,* 2014; FINKENWIRTH *et al.,* 2015), com especificidade satisfatória e validados pelo paralelismo e pela acurácia.

Com relação à necessidade ou não de extração, os imunoensaios são sensíveis à interferência e geralmente requerem purificação por extração (KUKUCKA & MISRA, 1994). As interferências – às vezes chamadas de "efeito matriz" – são das mais variadas origens, desde ligações ao cálcio e ao magnésio, altas concentrações de sais, diferenças no pH e outras substâncias presentes na urina (BRIDGES & MARINO, 1987). O uso da extração de fase sólida (*"solid phase extraction", SPE*) é amplamente utilizado (e.g. SCHAMS, 1983; SNOWDON *et al.,* 2010). Nesse método, peptídeos e esteroides são

separados por sua polaridade. O estudo de GRAY *et al.* (2007) mostrou uma recuperação alta de OT, de forma que pouco seja perdido no procedimento de SPE. Já um outro trabalho mostrou que diluir amostras de plasma antes do ensaio retornou valores mais altos (CARTER *et al.,* 2008), enquanto outro mostrou que amostras purificadas com SPE retornaram valores mais baixos (KANG *et al.,* 2013).

Além de todas essas problemáticas, há também questões quanto ao armazenamento das amostras. A OT é um hormônio lábil e degrada rapidamente caso as amostras não sejam mantidas congeladas ou, preferencialmente, em ambientes ácidos (ZIEGLER, 2018). Idealmente, as amostras devem ser extraídas a campo ou mantidas acidificadas (CROCKFORD *et al.,* 2013).

No caso das amostras de bugio, não foi possível detectar a razão pela qual o ensaio não foi validado. Sabe-se que os bugios se alimentam de folhas, inclusive folhas velhas, essas de difícil digestão, ricas em minerais e compostos secundários (MCKEY, 1974; ROCKWOOD, 1974), hábito pouco comum entre os folívoros, já que, em geral, eles preferem folhas jovens e brotos de fácil digestão e maior valor energético (ver MILTON, 1979). Os minerais e compostos fenólicos encontrados nas folhas, sobretudo nas folhas maduras e velhas, são geralmente excretados na urina por meio de produtos desintoxicantes (como os glicuronídeos) de forma a manter a homeostase do animal (TAHVANAINEN *et al.,* 1991; ZHENG *et al.,* 2002). Em um estudo que visava mensurar minerais urinários em *Alouatta palliata*, o ensaio detectou interferência por íons e, portanto, não foi possível obter resultados satisfatórios (NAGY & MILTON, 1979). É possível que essa dieta única dos bugios, diferente das demais espécies nas quais o ensaio foi validado, tenha influenciado a concentração de sais ou compostos conjugados contidos na urina e, portanto, prejudicado o ensaio. Outra possibilidade é que o congelamento da urina *in natura* não tenha sido suficiente para manter a estabilidade da OT, porém por conta dos resultados dos ensaios, essa explicação é menos provável, embora não inteiramente descartada.

Outra hipótese para o insucesso dos ensaios seria por conta da baixa compatibilidade entre os anticorpos produzidos para o ensaio de ocitocina e os do gênero *Alouatta*. De acordo com dados e alinhamentos obtidos do GenBank, há uma compatibilidade de 95% entre os receptores de OT de humanos e saguis, um primata amplamente empregado nos estudos de OT urinário (SELTZER & ZIEGLER, 2007), e também entre cães e humanos, outro organismo cuja ocitocina urinária também já foi

mensurada (SCHAEBS *et al.,* 2019). Porém, a compatibilidade cai para 85% entre receptores de OT humanos e de bugios. Contudo, isso não necessariamente significa que a variação se encontra na região de ligação com o hormônio, porém pode indicar uma coevolução entre receptor e molécula, onde a variação observada no receptor pode refletir uma variação na molécula de ocitocina. De fato, conforme dito anteriormente, os primatas Neotropicais apresentam cinco formas distintas da molécula de OT, ao passo que gênero *Alouatta* apresenta uma forma única e exclusiva de ocitocina, com uma fenilalanina na posição dois (Phe^2), mas aparentemente essa variação não é suficiente para acarretar funções fisiológicas distintas (REN *et al.,* 2015). As diferentes moléculas de OT encontradas em primatas Neotropicais foram associadas ao padrão de cuidado biparental comum nesse grupo (FRENCH *et al.,* 2016). Os autores enfatizam que muitos estudos com ocitocina, especialmente os que envolvem anticorpos e antagonistas, são otimizados para OT-Leu^8. Portanto, diferenças na molécula e na expressão gênica dos receptores podem ter efeito negativo em ensaios hormonais do presente trabalho, embora isso ainda não tenha sido comprovado.

LC-MS

Para o LC-MS, o efeito de matriz mais comum é o dos fosfolipídios contidos nas amostras e, até o momento, não há consenso sobre como contornar esse problema (TRUFELLI *et al.,* 2011). Os fosfolipídios (FL) constituem as membranas celulares e são facilmente encontrados nas mais variadas matrizes, sendo o maior desafio para a análise. A dificuldade em se lidar com os FL deve-se ao fato de sua natureza distinta, suas diferentes propriedades químicas e distintos pesos moleculares (GUO & LANKMAYR, 2011), chegando a quase 500 tipos de FL (TAGUCHI *et al.,* 2000; HAN & GROSS, 2005). Os FL atuam como surfactantes, de modo que os procedimentos de purificação e extração sejam menos eficientes.

Para contornar tal problema, diferentemente do que é possível com os imunoensaios, adicionar hormônios sintéticos como padrões internos (ISTD) geralmente é suficiente (ALDER *et al.,* 2004; VAN EECKHAUT *et al.,* 2009). Entretanto, os efeitos dos FL podem ser tão intensos que mesmo a adição de padrões internos pode não ser o bastante. Há algumas estratégias para contornar o efeito dos FL, como alterar a ionização do equipamento. Contudo, a melhor solução é remover o efeito antes mesmo da injeção no equipamento, como adicionar etapas de SPE associadas à extração líquida-líquida (LLE) e, até mesmo, alterar o tempo de leitura durante a cromatografia (BHATT *et al.,*

2006; LITTLE *et al.,* 2006; CHAMBERS *et al.,* 2007; DU *et al.,* 2008; XIA *et al.,* 2009). No estudo de CHAMBERS e colaboradores (2007), a adição da etapa de LLE retornou extratos mais limpos, porém a recuperação foi baixa. Outros trabalhos relatam uma significativa melhora com uma coluna polimérica para SPE, além de outras formas mais caras e engenhosas de lidar com FL, embora nunca completamente removido (ISMAIEL *et al.,* 2010).

No caso dos bugios, além de sua dieta rica em folhas velhas, eles também são sabidamente frugívoros, e as sementes das frutas são ricas em lipídios (NAWAR, 1985). Além disso, os fosfolipídios (FL) são o material bruto do qual é produzido o ácido jasmônico, um composto de defesa das plantas contra patógenos (CANONNE *et al.,* 2011). Contudo, os FL são encontrados em todas as membranas celulares, não sendo exclusivos de plantas. Portanto, não se esperaria que uma dieta rica em plantas maduras e/ou frutas apresentasse mais FL do que uma dieta animalívora, embora um estudo comparativo ainda não tenha sido realizado. Um estudo sobre concentrações plasmáticas de lipoproteínas em *Alouatta palliata* não identificou valores muito diferentes das dos humanos, e aparentemente independia da dieta (CLARK *et al.,* 1987). Apesar do foco nos FL, é possível que a interferência tenha sido de outra natureza. Ainda assim, similar ao que ocorreu no ensaio de ocitocina, o metabolismo dos bugios pode ter influenciado os resultados e impossibilitado a leitura pelo equipamento. É possível que um aumento no tempo de leitura do equipamento pudesse prover tempo suficiente para separação dos fosfolipídios e outros compostos dos metabólitos hormonais. Como próximos passos, seria interessante verificar a influência da dieta na qualidade dos ensaios hormonais tanto imunoenzimáticos quanto pelo LC-MS.

CONCLUSÕES

Os métodos de extração e análise do presente trabalho não foram bem sucedidos, embora baseassem em métodos descritos para espécies próximas. Espécies próximas podem divergir quanto à produção, metabolização e sucesso na mensuração hormonal não-invasiva, de modo que uma espécie não sirva, necessariamente, de modelo para todas as demais espécies (ADKINS-REGAN, 2005). Essa situação pode ser um embargo nos estudos endocrinológicos de animais selvagens no contexto de crise da biodiversidade, pois as espécies estão desaparecendo antes mesmo de serem estudadas adequadamente.

O bugio-ruivo (*Alouatta clamitans*) sofreu forte declínio populacional nos últimos cinco anos devido ao surto de febre amarela, levando-o a constar na lista das 25 espécies de primatas mais ameaçadas do mundo em 2019 (BUSS *et al.,* 2019). Uma vez que os hormônios guiam tanto os processos reprodutivos quanto padrões comportamentais (reprodutivos ou não), o conhecimento da endocrinologia é fundamental para entender como as espécies se mantêm na natureza, esclarecendo os padrões de manutenção (i.e. sobrevivência), acréscimo (i.e. nascimento) e decréscimo (i.e. morte) de indivíduos na população, sendo esses os pilares da conservação (WIKELSKI & COOKE, 2006).

REFERÊNCIAS

ABBOTT DH, KEVERNE EB, BERCOVITCH FB, SHIVELY CA, MENDOZA SP, SALTZMAN W, SNOWDON CT, ZIEGLER TE, BANJEVIC M, GARLAND JR T & SAPOLSKY RM. 2003. Are subordinates always stressed? A comparative analysis of rank differences in cortisol levels among primates. Hormones and Behavior, 43(1), 67-82.

ACHER R. 1993. Neurohypophysial peptide systems: processing machinery, hydroosmotic regulation, adaptation and evolution. Regulatory Peptides, 45, 1–13.

ADKINS-REGAN E (ed). 2005. Hormonal mechanisms. Pp1-33. In Hormones and Animal Social Behavior. Princeton University Press, Princeton & Oxford, UK.

ADLERCREUTZ H, MARTIN F, PULKKINEN M, DENCKER H, RIMER U, SJOBERG NO & TIKKANEN MJ. 1976. Intestinal metabolism of estrogens. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 43(3), 497-505.

ALCOCK J. 2001. Animal behavior: an evolutionary approach, seventh edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA.

ALDER L, LÜDERITZ S, LINDTNER K & STAN HJ. 2004. The ECHO technique–the more effective way of data evaluation in liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis. Journal of Chromatography A, 1058(1-2), 67-79.

ALTMANN J, ALTMANN SA, & HAUSFATER G. 1978. Primate infant's effects on mother's future reproduction. Science, 201(4360), 1028-1030.

ANDREASSON U, PERRET-LIAUDET A, VAN WAALWIJK VAN DOORN LJ, BLENNOW K, CHIASSERINI D, ENGELBORGHS S, FLADBY T, GENC S, KRUSE N, KUIPERIJ HB, KULIC, LEWCZUK P, MOLLENHAUER B,

MROCZKO B, PARNETTI L, VANMECHELEN E, VERBEEK MM, WINDBLAD B, ZETTERBERG H, KOEL-SMMELINK M & TEUNISSEN CE. 2015. A practical guide to immunoassay method validation. Frontiers in Neurology, 6, 179.

ARGIOLAS A & MELIS MR. 2004. The role of oxytocin and the paraventricular nucleus in the sexual behaviour of male mammals. Physiology & Behavior, 83(2), 309-317.

BAHR NI., PALME R, MÖHLE U, HODGES JK & HEISTERMANN M. 2000. Comparative aspects of the metabolism and excretion of cortisol in three individual nonhuman primates. General and Comparative Endocrinology, 117(3), 427-438.

BEACH FA. 1967. Cerebral and hormonal control of reflexive mechanisms involved in copulatory behavior. Physiological Reviews, 47(2), 289-316.

BEACH FA. 1975. Behavioral Endocrinology: An Emerging Discipline: How hormones affect—and are affected by—behavior is a subject of increasing interest to students of human and animal behavior. American Scientist, 63(2), 178-187.

BEACH FA. 1976. Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. Hormones and Behavior, 7(1), 105-138.

BEHRINGER V & DESCHNER T. 2017. Non-invasive monitoring of physiological markers in primates. Hormones and Behavior, 91, 3-18.

BENÍTEZ ME, SOSNOWSKI MJ, TOMEO OB & BROSNAN SF. 2018. Urinary oxytocin in capuchin monkeys: Validation and the influence of social behavior. American Journal of Primatology, 80(10), e22877.

BENTLEY PJ. 1980. Evolution of neurohypophysial peptide functions, p95-106. *In* Evolution of Vertebrate Endocrine Systems (PANG PKT & EPPLE A, eds.). Graduate Studies Texas Tech University, USA.

BERCOVITCH FB & ZIEGLER TE. 2002. Current topics in primate socioendocrinology. Annual Review of Anthropology, 31(1), 45-67.

BERMAN CM, RASMUSSEN KLR & SUOMI SJ. 1993. Reproductive consequences of maternal care patterns during estrus among free-ranging rhesus monkeys. Behavioral Ecology and Sociobiology, 32(6), 391-399.

BHATT J, SUBBAIAH G & SINGH S. 2006. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of risperidone and its active metabolite 9-hydroxyrisperidone in human plasma. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 20(14), 2109-2114.

BLAUSTEIN JD & OLSTER DH. 1989. Gonadal steroid hormone receptors and social behaviors, p31-104. *In* Molecular and Cellular Basis of Social Behavior in Vertebrates (). Springer, Berlin, Germany.

BONELLO N, JASPER MJ & NORMAN RJ. 2004. Periovulatory expression of intercellular adhesion molecule-1 in the rat ovary. Biology of Reproduction, 71, 1384–1390.

BRANDENBERGER AW, TEE MK, LEE JY, CHAO V & JAFFE RB. 1997. Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-α) and beta (ER-β) mRNA in the midgestation human fetus. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 82, 3509–3512

BRIDGES TE & MARINO V. 1987) A rapid and sensitive method for the identification and quantitation of sub-picomolar amounts of neurohypophysial peptides. Life sciences, 41(26), 2815-2822.

BROWNSTEIN MJ. 1983. Biosynthesis of vasopressin and oxytocin. Annual Review of Physiology, 45(1), 129-135.

BUSS G, OKLANDER LI, BICCA MARQUES JC, HIRANO ZB, CHAVES OM, MENDES SL et al. 2019. Brown howler monkey: *Alouatta guariba* Humboldt, 1812. *In* Primates in Peril. The world's 25 most endangered primates 2018-2020 (SCHWITZER C, MITTERMEIER RA, RYLANDS AB, CHIOZZA F, WILLIAMSON EA, BYLER D, WICH S, HUMLE T, JOHNSON C, MYNOTT H AND MCCABE G, eds.).

CALLARD IP, FILETI LA, PEREZ LE, SORBERA LA, GIANNOUKOS G, KLOSTERMAN LL, KLOSTERMAN LL, TSAG P & MCCRACKEN JA. 1992. Role of the corpus luteum and progesterone in the evolution of vertebrate viviparity. American Zoologist, 32(2), 264-275.

CAMPINO C, AMPUERO S, DÍAZ S & SERÓN-FERRÉ M. 1994. Prolactin bioactivity and the duration of lactational amenorrhea. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 79, 970 –974.

CANONNE J, FROIDURE-NICOLAS S & RIVAS S. 2011. Phospholipases in action during plant defense signaling. Plant Signaling & Behavior, 6(1), 13-18.

CAMPBELL NA, WILLIAMSON B & HEYDEN RJ. 2003. Biology: Exploring Life. Disponível em: <https://bodell.mtchs.org/OnlineBio/BIOCD/text/>. Acessado pela última vez em setembro de 2020.

CARTER CS, GRIPPO AJ, POURNAJAFI-NAZARLOO H, RUSCIO MG & PORGES SW. 2008. Oxytocin, vasopressin and sociality. Progress in Brain Research, 170, 331-336.

CHAMBERS E, WAGROWSKI-DIEHL DM, LU Z & MAZZEO JR. 2007. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. Journal of Chromatography B, 852(1-2), 22-34.

CHAN SJ, KWOK SC & STEINER DF. 1981. The biosynthesis of insulin: some genetic and evolutionary aspects. Diabetes Care, 4(1), 4-10.

CLARK SB, TERCYAK A. M & GLANDER KE. 1987. Plasma lipoproteins of free-ranging howling monkeys (*Alouatta palliata*). Comparative Biochemistry and Physiology--Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 88(3), 729-735.

COHEN H & STRAMPP A. 1976. Bacterial synthesis of substance similar to human chorionic gonadotrophin. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 152(3), 408-410.

COUSE JF, LINDZEY J, GRANDIEN K, GUSTAFSSON J-A AND KORACH KS. 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-α (ERα) and estrogen receptor β (ER) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERα-knockout mouse. Endocrinology, 138, 4613–4621.

CROCKFORD C, WITTIG RM, LANGERGRABER K, ZIEGLER TE, ZUBERBÜHLER K & DESCHNER T. 2013. Urinary oxytocin and social bonding in related and unrelated wild chimpanzees. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 280(1755), 20122765.

CULLEN JM. 1966. E. Ritualization of animal activities in relation to phylogeny, speciation and ecology: Reduction of ambiguity through ritualization. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 251(772), 363-374.

DE HOFFMANN E. 2005: Mass spectrometry. Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, USA.

DÍAZ S, SERÓN-FERRÉ M, CÁRDENAS H, SCHIAPPACASSE V, BRANDEIS A & CROXATTO HB. 1989. Circadian variation of basal plasma prolactin, prolactin response to suckling, and length of amenorrhea in nursing women. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 68, 946 –955.

DIZEREGA GS & HODGEN GD. 1981. Folliculogenesis in the primate ovarian cycle. Endocrine Reviews, 2(1), 27-49.

DONALDSON ZR & YOUNG LJ. 2008. Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. Science, 322(5903), 900-904.

DORRINGTON J & GORE-LANGTON RE. 1981. Prolactin inhibits oestrogen synthesis in the ovary. Nature, 290, 600 – 602.

DU L, & WHITE RL. 2008. Reducing glycerophosphocholine lipid matrix interference effects in biological fluid assays by using high-turbulence liquid chromatography. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 22(21), 3362-3370.

DUNBAR RI. 1991. Functional significance of social grooming in primates. Folia Primatologica, 57(3), 121-131.

EICK GN & THORNTON JW. 2011. Evolution of steroid receptors from an estrogen-sensitive ancestral receptor. Molecular and Cellular Endocrinology, 334(1-2), 31-38.

EISENBERG JF. 1981. The mammalian radiations: An analysis of trends in evolution, adaptation and behavior. Chicago: University of Chicago Press.

ESCRIVA H, BERTRAND S & LAUDET V. 2004. The evolution of the nuclear receptor superfamily. Essays in Biochemistry, 40, 11-26.

ESCRIVA H, SAFI R, HANNI C, LANGLOIS MC, SAUMITOU-LAPRADE P, STEHELIN D, CAPRON C, PIERCE R & LAUDET V. 1997. Ligand binding was

acquired during evolution of nuclear receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94, 6803-6808.

EVANS RM. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science, 240(4854), 889-895.

FAIRBANKS LA & HINDE K. 2013. Behavioral response of mothers and infants to variation in maternal condition: adaptation, compensation, and resilience, p281-302. *In* Building babies. Springer, New York, USA.

FAIRBROTHER A. 2000. Comparative aspects of estrogen functions and measurements in oviparous and viviparous vertebrates. Human and Ecological Risk Assessment, 6(1), 73-102.

FINDLAY JWA, SMITH WC, LEE JW, NORDBLOM GD, DAS I, DESILVA BS, KHAN MN & BOWSHER RR. 2000. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 21(6), 1249-1273.

FINKENWIRTH C, VAN SCHAIK C, ZIEGLER TE & BURKART JM. 2015. Strongly bonded family members in common marmosets show synchronized fluctuations in oxytocin. Physiology & Behavior, 151, 246-251.

FRENCH JA, TAYLOR JH, MUSTOE AC & CAVANAUGH J. 2016. Neuropeptide diversity and the regulation of social behavior in New World primates. Frontiers in Neuroendocrinology, 42, 18-39.

GESQUIERE LR, ZIEGLER TE, CHEN PA, EPSTEIN KA, ALBERTS SC & ALTMANN J. 2014. Measuring fecal testosterone in females and fecal estrogens in males: comparison of RIA and LC/MS/MS methods for wild baboons (*Papio cynocephalus*). General and Comparative Endocrinology, 204, 141-149.

GLICK BB. 1984. Male endocrine responses to females: effects of social cues in cynomolgus macaques. American Journal of Primatology, 6(3), 229-239.

GORDO K, HODGEN GD & RICHARDSON DW. 1992. Postpartum lactational anovulation in a nonhuman primate (*Macaca fascicularis*): endogenous opiate mediation of suckling-induced hyperprolactinemia. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 75(1), 59-67.

GRAY PB, PARKIN JC & SAMMS-VAUGHAN ME. 2007. Hormonal correlates of human paternal interactions: A hospital-based investigation in urban Jamaica. Hormones and Behavior, 52(4), 499-507.

GRECCO D & STABENFELDT GH. 2004. Glândulas endócrinas e suas funções, p350-384. *In* Tratado de Fisiologia Veterinária 3ª edição (CUNNINGHAM JG, ed.). Editora Guanabara, Brasil.

GRUBER CJ, TSCHUGGUEL W, SCHNEEBERGER C & HUBER JC. 2002. Production and actions of estrogens. New England Journal of Medicine, 346(5), 340-352.

GUILLETTE JR LJ, EDWARDS TM & MOORE BC. 2007. Alligators, contaminants and steroid hormones. Environmental Science & Technology, 14(6), 331-347.

GUO X & LANKMAYR E. 2011. Phospholipid-based matrix effects in LC–MS bioanalysis. Bioanalysis, 3(4), 349-352.

HABUMUREMYI S, ROBBINS MM, FAWCETT KA & DESCHNER T. 2014. Monitoring ovarian cycle activity via progestagens in urine and feces of female mountain gorillas: a comparison of EIA and LC–MS measurements. American Journal of Primatology, 76(2), 180-191.

HÄGGSTRÖM M & RICHFIELD D. 2014. Diagram of the pathways of human steroidogenesis. WikiJournal of Medicine, 1(1).

HAN X & GROSS RW. 2005. Shotgun lipidomics: electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples. Mass Spectrometry Reviews, 24(3), 367-412.

HAUSER B, DESCHNER T & BOESCH C. 2008a. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 23 endogenous steroids in small quantities of primate urine. Journal of Chromatography B, 862, 100–112.

HAUSER B, SCHULZ D, BOESCH C & DESCHNER T. 2008b. Measuring urinary testosterone levels of the great apes - Problems with enzymatic hydrolysis using *Helix pomatia* juice. General and Comparative Endocrinology, 158, 77–86.

HEIDEMANN SR. 2004. As bases moleculares e celulares da regulação fisiológica, p3-22. *In* Tratado de Fisiologia Veterinária 3ª edição (CUNNINGHAM JG, ed.). Editora Guanabara, Brasil.

HEISTERMANN M. 2010. Non-invasive monitoring of endocrine status in laboratory primates: methods, guidelines and applications. Advances in Science and Research, *5*, 1.

HINDE RA. 1966. Animal behavior: a synthesis of ethology and comparative psychology. McGraw-Hill.

HOLEKAMP KE, COOPER SM, KATONA CI, BERRY NA, FRANK LG & SMALE L. 1997. Patterns of association among female spotted hyenas (*Crocuta crocuta*). Journal of Mammalogy, 78(1), 55-64.

HOYLE CH. 1999. Neuropeptide families and their receptors: evolutionary perspectives. Brain Research, 848(1-2), 1-25.

HUXLEY JS. 1914.The Courtship-habits of the Great Crested Grrebe (*Podiceps cristatus*) with an addition to the Theory of Sexual Selection, p491-562. *In* Proceedings of the Zoological Society of London (Vol. 84, No. 3). Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK:

INSEL T & YOUNG L. 2000. Neuropeptides and the evolution of social behavior. Current Opinion in Neurobiology, 10, 784-789.

ISMAIEL OA, ZHANG T, JENKINS RG & KARNES HT. 2010. Investigation of endogenous blood plasma phospholipids, cholesterol and glycerides that contribute to matrix effects in bioanalysis by liquid chromatography/mass spectrometry. Journal of Chromatography B, 878(31), 3303-3316.

IVELL R, BALVERS M, RUST W, BATHGATE R & EINSPANIER A. 1997. Oxytocin and male reproductive function, p253-264. *In* The fate of the male germ cell (). Springer, Boston, USA.

JOHNSON SE. 2003. Life history and the competitive environment: trajectories of growth, maturation, and reproductive output among chacma baboons. American Journal of Physical Anthropology, 120(1), 83-98.

JOSEPH DR. 1994. Structure, function, and regulation of androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin. Vitamins Hormones, 49, 197–280.

KANG JH. KORECKA M, TOLEDO JB, TROJANOWSKI JQ & SHAW LM. 2013. Clinical utility and analytical challenges in measurement of cerebrospinal fluid amyloid-β1–42 and τ proteins as alzheimer disease biomarkers. Clinical Chemistry, 59(6), 903–916.

KENDRICK KM, KEVERNE EB & BALDWIN BA. 1987. Intracerebroventricular oxytocin stimulates maternal behaviour in the sheep. Neuroendocrinology, 46(1), 56-61.

KENEALY BP, KAPOOR A, GUERRIERO KA, KEEN KL GARCIA JP, KURIAN JR, ZIEGLER TE & TERASAWA E. 2013. Neuroestradiol in the hypothalamus contributes to the regulation of gonadotropin releasing hormone release. Journal of Neuroscience, 33(49), 19051-19059.

KEVERNE EB & CURLEY JP. 2004. Vasopressin, oxytocin and social behaviour. Current Opinion in Neurobiology, 14(6), 777-783.

KOKKO H & JENNIONS MD. 2012. Sex differences in parental care. The evolution of parental care, 484.

KRAAIJEVELD K, KRAAIJEVELD-SMIT FJ & ADCOCK GJ. 2003. Does female mortality drive male semelparity in dasyurid marsupials?. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 270(suppl2), S251-S253.

KUKUCKA MA & MISRA HP. 1994. Determination of oxytocin in biological samples by isocratic high-performance liquid chromatography with coulometric detection using C18 solid-phase extraction and polyclonal antibody-based immunoaffinity column purification. Journal of Chromatography B, 653(2), 139-145.

KUMAR V, GREEN S, STACK G, BERRY M, JIN JR & CHAMBON P. 1987. Functional domains of the human estrogen receptor. Cell, 51(6), 941-951.

LASLEY BL & KIRKPATRICK JF. 1991. Monitoring ovarian function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 23-31.

LE ROITH D, SHILOACH J, ROTH J & LESNIAK MA. 1980. Evolutionary origins of vertebrate hormones: substances similar to mammalian insulins are native to unicellular eukaryotes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 77(10), 6184-6188.

LEDNICER D. 2011. Steroid Chemistry at a Glance. Hoboken: Wiley.

LEE AG, COOL DR, GRUNWALD JR WC, NEAL DE, BUCKMASTER CL, CHENG MY, HYDE SA, LYONS DM & PARKER KJ. 2011. A novel form of oxytocin in New World monkeys. Biology Letters, 7(4), 584-587.

LEE MR, SCHEIDWEILER KB, DIAO XX, AKHLAGHI F, CUMMINS A, HUESTIS MA., LEGGION L & AVERBECK BB. 2018. Oxytocin by intranasal and intravenous routes reaches the cerebrospinal fluid in rhesus macaques: determination using a novel oxytocin assay. Molecular Psychiatry, 23(1), 115-122.

LEEDS A, DENNIS PM, LUKAS KE, STOINSKI TS, WILLIS MA & SCHOOK MW. 2018. Validating the use of a commercial enzyme immunoassay to measure oxytocin in unextracted urine and saliva of the western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). Primates, 59(6), 499-515.

LITTLE JL, WEMPE MF & BUCHANAN CM. 2006. Liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry method development for drug metabolism studies: examining lipid matrix ionization effects in plasma. Journal of Chromatography B, 833(2), 219-230.

LUPOLI B, JOHANSSON B, UVNÄS-MOBERG K & SVENNERSTEN-SJAUNJA K. 2001. Effect of suckling on the release of oxytocin, prolactin, cortisol, gastrin, cholecystokinin, somatostatin and insulin in dairy cows and their calves. Journal of Dairy Research, 68(2), 175-187.

LYNCH JW, ZIEGLER TE & STRIER KB. 2002. Individual and seasonal variation in fecal testosterone and cortisol levels of wild male tufted capuchin monkeys, *Cebus apella nigritus*. Hormones and Behavior, 41(3), 275-287.

MANDALAYWALA TM, HIGHAM JP, HEISTERMANN M, PARKER KJ & MAESTRIPIERI D. 2014. Physiological and behavioural responses to weaning conflict in free-ranging primate infants. Animal Behaviour, 97, 241-247.

MANECKJEE R, SRINATH BR & MOUDGAL NR. 1976. Prolactin suppresses release of luteinising hormone during lactation in the monkey. Nature, 262(5568), 507-508.

MARTENSZ ND, VELLUCCI SV, FULLER LM, EVERITT BJ, KEVERNE EB & HERBERT J. 1987. Relation between aggressive behaviour and circadian rhythms

in cortisol and testosterone in social groups of talapoin monkeys. Journal of Endocrinology, 115(1), 107-120.

MARUO T, COHEN H, SEGAL SJ & KOIDE SS. 1979. Production of choriogonadotropin-like factor by a microorganism. Proceedings of the National Academy of Sciences, 76(12), 6622-6626.

MATTERN G, LIU CH, LOUIS JB, ROSEN JD. 1991: GC/MS and LC/MS determination of 20 pesticides for which dietary oncogenic risk has been estimated. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39, 700–704.

MCCULLOUGH ME, CHURCHLAND PS & MENDEZ AJ. 2013. Problems with measuring peripheral oxytocin: can the data on oxytocin and human behavior be trusted?. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 37(8), 1485-1492.

MCKEY D. 1974. Adaptive patterns in alkaloid physiology. The American Naturalist, 108(961), 305-320.

MCLACHLAN RI, O'DONNELL L, MEACHEM SJ, STANTON PG, DE KRETSER DM, PRATIS K & ROBERTSON DM. 2002. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. Recent Progress in Hormone Research, 57, 149-179.

MCNEILLY AS, GLASIER A, JONASSEN J & HOWIE PW. 1982. Evidence for direct inhibition of ovarian function by prolactin. Journal of Reproduction and Fertility, 65(2), 559-569.

MILTON K. 1979. Factors influencing leaf choice by howler monkeys: a test of some hypotheses of food selection by generalist herbivores. The American Naturalist, 114(3), 362-378.

MIZUTA T & KUBOKAWA K. 2007. Presence of sex steroids and cytochrome P450 genes in amphioxus Endocrinology, 148, 3554-3565.

MIZUTA T, ASAHINA K, SUZUKI M & KUBOKAWA K. 2008. In vitro conversion of sex steroids and expression of sex steroidogenic enzyme genes in amphioxus ovary. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology, 309, 83-93

MÖHLE U, HEISTERMANN M, PALME R & HODGES JK. 2002. Characterization of urinary and fecal metabolites of testosterone and their measurement for assessing

gonadal endocrine function in male nonhuman primates. General and Comparative Endocrinology, 129, 135–145.

MOHR E, MEYERHOF W & RICHTER D. 1995. Vasopressin and oxytocin: molecular biology and evolution of the peptide hormones and their receptors, p235-266. *In* Vitamins & Hormones (Vol. 51). Academic Press.

MOLINA PE. (ed). 2014. Fisiologia endócrina. 4ª edição. São Paulo: AMGH.

MOSCOVICE LR & ZIEGLER TE. 2012. Peripheral oxytocin in female baboons relates to estrous state and maintenance of sexual consortships. Hormones and Behavior, 62(5), 592-597.

MURTAGH R, BEHRINGER V & DESCHNER T. 2013. LC-MS as a method for non-invasive measurement of steroid hormones and their metabolites in urine and faeces of animals. Wien Tierärztl Monat–Vet Med Austria, 100, 247-254.

NAGY KA & MILTON K. 1979. Aspects of dietary quality, nutrient assimilation and water balance in wild howler monkeys (*Alouatta palliata*). Oecologia, 39(3), 249-258.

NARAYAN EJ. 2013. Non-invasive reproductive and stress endocrinology in amphibian conservation physiology. Conservation Physiology, 1(1).

NAWAR WW. 1985. Lipids, p139-244. *In* Food chemistry (FENNEMA OR, ed.). Marcel Dekker Inc. Basel, Suíça.

NEWERLA GJ. 1944. The history of the discovery and isolation of the female sex hormones. New England Journal of Medicine, 230(20), 595-604.

NIALL HD. 1976. Peptide hormone homologies and evolution, p9-32. *In* Peptide hormones (). Palgrave, London, UK.

OLEFSKY JM. 2001. Nuclear receptor minireview series. Journal of Biological Chemistry, 276(40), 36863-36864.

OWEN GI & ZELENT A 2000. Origins and evolutionary diversification of the nuclear receptor superfamily. Cellular and Molecular Life Sciences, 57, 809-827.

PALME R. 2005. Measuring fecal steroids: guidelines for practical application. Annals of the New York Academy of Sciences, 1046, 75–80.

PARIKH TP, STOLZE B, OZARDA Y, JONKLAAS J, WELSH K, MASIKA L, HILL M, DECHERNEY A & SOLDIN SJ. 2018. Diurnal variation of steroid hormones and their reference intervals using mass spectrometric analysis. Endocrine connections, 7(12), 1354-1361.

PFAFF DW. 1973. Luteinizing hormone-releasing factor potentiates lordosis behavior in hypophysectomized ovariectomized female rats. Science, 182(4117), 1148-1149.

PLANO DE MANEJO, 2015. Título: Plano de Manejo Parque Estadual Carlos Botelho. Unidades de Terreno do Parque. Disponível em < http://observatorio.wwf.org.br/site_media/upload/gestao/planoManejo/PM_PECarlosBotelho_parte_002.pdf> . Último acesso em agosto de 2020.

PREIS A, MUGISHA L, HAUSER B, WELTRING A & DESCHNER, T. 201): Androgen and androgen metabolite levels in serum and urine of East African chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*): Comparison of EIA and LC-MS analyses. General and Comparative Endocrinology, 174, 335–343.

PROSSNITZ ER, ARTERBURN JB, SMITH HO, OPREA TI, SKLAR LA & HATHAWAY HJ. 2008. Estrogen signaling through the transmembrane G protein–coupled receptor GPR30. Annual Review of Physiology, 70, 165-190.

RAEM AM & RAUCH P. 2007. Immunoassays. Elsevier Spektrum, München, Heidelberg, Germany.

REN D, LU G, MORIYAMA H, MUSTOE AC, HARRISON EB & FRENCH JA. 2015. Genetic diversity in oxytocin ligands and receptors in New World monkeys. PLoS One, 10(5), e0125775.

REYES TL, GALINSKY AM, HOFFMANN JN, YOU HM, ZIEGLER TE & MCCLINTOCK MK. 2014. Social peptides: Measuring urinary oxytocin and vasopressin in a home field study of older adults at risk for dehydration. Journals of Gerontology Series B: Psychological Sciences and Social Sciences, 69(Suppl_2), S229-S237.

ROBECK TR, ATKINSON SKC & BROOK F. 2001. Reproduction, p193-236. *In* Handbook of Marine Mammal Medicine 2nd Editon (DIERALF LA & GULLAND FMD, eds.). Boca Ratton: CRC Press.

ROCKWOOD LL. 1974. Seasonal changes in the susceptibility of *Crescentia alata* leaves to the flea beetle, *Oedionychus* sp. Ecology, 55(1), 142-148.

RUSSELL JA & LENG G. 1998. Sex, parturition and motherhood without oxytocin?. The Journal of Endocrinology, 157(3), 343-359.

SATAKE H, TAKUWA K, MINAKATA H & MATSUSHIMA O. 1999. Evidence for conservation of the vasopressin/oxytocin superfamily in Annelida. The Journal of Biological Chemistry, 274, p5605-5611

SAWYER WH. 1977. Evolution of active neurohypophysial principles among the vertebrates. American Zoologist, 17, 727–737.

SCALLY MC. 2018. Steroid hormone receptors and nuclear receptors. Disponível em: <http://www.mesomorphosis.com/articles/scally/steroid-hormone-nuclear-receptors.htm> Último acesso em setembro de 2020.

SCHAEBS FS, MARSHALL-PESCINI S, RANGE F & DESCHNER T. 2019. Analytical validation of an enzyme immunoassay for the measurement of urinary oxytocin in dogs and wolves. General and Comparative Endocrinology, 281, 73-82.

SCHAMS D. 1983. Oxytocin determination by radioimmunoassay. European Journal of Endocrinology, 103(2), 180-183.

SCHOPF JW. 1978. The evolution of the earliest cells. Scientific American, 239, 110-139.

SCHWARZENBERGER F, MÖSTL E, PALME R & BAMBERG E. 1996. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. Animal Reproduction Science, 42(1), 515-526.

SELTZER LJ & ZIEGLER TE. 2007. Non-invasive measurement of small peptides in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): A radiolabeled clearance study and endogenous excretion under varying social conditions. Hormones and Behavior, 51(3), 436–442.

SENGER PL. (ed) 2005. Pathways to pregnancy and parturition. Pullman: Current Conceptions.

SHIMIZU K. 2005. Studies on reproductive endocrinology in non-human primates: application of non-invasive methods. Journal of Reproduction and Development, 51(1), 1-13.

SHUGHRUE PJ, LANE MV & MERCHENTHALER I. 1997. Comparative distribution of estrogen receptor-α and-β mRNA in the rat central nervous system. Journal of Comparative Neurology, 388(4), 507-525.

SNOWDON CT, PIEPER BA, BOE CY, CRONIN KA, KURIAN AV & ZIEGLER TE. 2010. Variation in oxytocin is related to variation in affiliative behavior in monogamous, pairbonded tamarins. Hormones and Behavior, 58(4), 614-618.

SPENCER TE & BAZER FW. 2002. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. Frontiers in Bioscience, 7(7), d1879-d1898.

STANTON LA, SULLIVAN MS & FAZIO JM. 2015. A standardized ethogram for the felidae: A tool for behavioral researchers. Applied Animal Behaviour Science, 173, 3-16.

STARLING EH. 1905. The Croonian Lectures. I. On the chemical correlation of the functions of the body. Lancet, 166, 339–341.

STEWART K. 1988. Suckling and lactational anoestrus in wild gorillas. Journal of Reproduction and Fertility, 83, 627-634.

STOCCO C, TELLERIA C & GIBORI G. 2007. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. Endocrine Reviews, 28, 117–149.

SWANEY WT, DUBOSE BN, CURLEY JP & CHAMPAGNE FA. 2012. Sexual experience affects reproductive behavior and preoptic androgen receptors in male mice. Hormones and Behavior, 61(4), 472-478.

TAGUCHI R, HAYAKAWA J, TAKEUCHI Y & ISHIDA M. 2000. Two-dimensional analysis of phospholipids by capillary liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry, 35(8), 953-966.

TAHVANAINEN J, NIEMELA P & HENTTONEN H. 1991. Chemical aspects of herbivory in boreal forest-feeding by small rodents, hares, and cervids, p115-126. *In* Plant Defenses against mammalian herbivory (PALO RT & ROBBINS CT, eds.). CRC Press, Inc. Florida, USA.

TAYLOR W. 1971. The excretion of steroid hormone metabolites in bile and feces, p201-285. *In* Vitamins & Hormones (Vol. 29). Academic Press.

THORNTON JW, NEED E & CREWS D. 2003. Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signaling. Science, 301, 1714 –1717.

TINBERGEN N. 1963. On aims and methods of ethology. Zeitschrift für tierpsychologie, 20(4), 410-433.

TRUFELLI H, PALMA P, FAMIGLINI G & CAPPIELLO A. 2011. An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry. Mass Spectrometry Reviews, 30(3), 491-509.

UVNÄS-MOBERG K. 1998. Oxytocin may mediate the benefits of positive social interaction and emotions. Psychoneuroendocrinology, 23(8), 819-83.

VAN BELLE S & BICCA-MARQUES JC. 2015. Insights into reproductive strategies and sexual selection in howler monkeys, p57-84. *In* Howler Monkeys: Adaptive radiation, systematics, and morphology (KOWALEWSKI, MM, GARBER PA, CORTÉS-ORTIZ L, URBANI B & YOULATOS D, eds). Springer: New York, USA.

VAN BELLE S. 2014. Endocrinology of howler monkeys: review and directions for future research. *In* Howler Monkeys: Adaptive radiation, systematics, and morphology (KOWALEWSKI, MM, GARBER PA, CORTÉS-ORTIZ L, URBANI B & YOULATOS D, eds). Springer, New York, USA.

VAN EECKHAUT A, LANCKMANS K, SARRE S, SMOLDERS I & MICHOTTE Y. 2009.Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. Journal of Chromatography B, 877, 2198–2207.

VAN KESTEREN RE, SMIT AB, DIRKS RW, GERAERTS WP & JOOSSE J. 1992. Evolution of the vasopressin/oxytocin superfamily: characterization of a cDNA encoding a vasopressin-related precursor, preproconopressin, from the mollusc *Lymnaea stagnalis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 89(10), 4593-4597.

VAN KESTEREN RE, SMIT AB, DE LANGE RP, KITS KS, VAN GOLEN FA, VAN DER SCHORS RC, DE WITH ND, BURKE F & GERAERTS WP. 1995. Structural and functional evolution of the vasopressin/oxytocin superfamily: vasopressin-

related conopressin is the only ember present in Lymnaea, and is involved in the control of sexual behavior. Journal of Neuroscience, 15, 5989-5998.

VIAU P & SOILA R. 2014. Avaliação laboratorial do sistema endócrino. Metodologias em dosagens hormonais e suas provas de função. *In* Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos (JERICÓ MM, ANDRADE-NETO JP & KOGIKA MM, eds.). Editora Rocca.

WALLIS M. 2012. Molecular evolution of the neurohypophysial hormone precursors in mammals: comparative genomics reveals novel mammalian oxytocin and vasopressin analogues. General and Comparative Endocrinology, 179, 313–318.

WASSER SK, RISLER L & STEINER RA. 1988. Excreted steroids in primate feces over the menstrual cycle and pregnancy. Biology of Reproduction 39(4), 862-872.

WATERMAN JM. 1997. Why do male Cape ground squirrels live in groups? Animal Behaviour, 53(4), 809-817.

WELTRING A, SCHAEBS FS, PERRY SE & DESCHNER T. 2012. Simultaneous measurement of endogenous steroid hormones and their metabolites with LC–MS/MS in faeces of a New World primate species, Cebus capucinus. Physiology & Behavior, 105(2), 510-521.

WHITTEN PL, BROCKMAN DK & STAVISKY RC. 1998. Recent advances in noninvasive techniques to monitor hormone-behavior interactions. American Journal of Physical Anthropology, 107(S27), 1-23.

WIKELSKI M & COOKE SJ. 2006. Conservation physiology. Trends in Ecology & Evolution, 21(1), 38-46.

WITTIG RM, CROCKFORD C, DESCHNER T, LANGERGRABER KE, ZIEGLER TE & ZUBERBÜHLER K. 2014. Food sharing is linked to urinary oxytocin levels and bonding in related and unrelated wild chimpanzees. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 281(1778), 20133096.

XIA YQ & JEMAL M. 2009. Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 23(14), 2125-2138.

ZHENG Z, FANG JL & LAZARUS P. 2002. Glucuronidation: an important mechanism for detoxification of benzo [a] pyrene metabolites in aerodigestive tract tissues. Drug Metabolism and Disposition, 30(4), 397-403.

ZIEGLER TE & WITTWER DJ. 2005. Fecal steroid research in the field and laboratory: improved methods for storage, transport, processing, and analysis. American Journal of Primatology, 67(1), 159-174.

ZIEGLER TE, SCHEFFLER G, WITTWER DJ, SCHULTZ-DARKEN N, SNOWDON CT & ABBOTT DH. 1996. Metabolism of reproductive steroids during the ovarian cycle in two species of callitrichids, *Saguinus oedipus* and *Callithrix jacchus*, and estimation of the ovulatory period from fecal steroids. Biology of Reproduction, 54(1), 91-99.

ZIEGLER TE, SHOLL SA, SCHEFFLER G, HAGGERTY MA & LASLEY BL. 198). Excretion of estrone, estradiol, and progesterone in the urine and feces of the female cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus oedipus*). American Journal of Primatology, 17(3), 185-195.

ZIEGLER TE. 2018. Measuring peripheral oxytocin and vasopressin in nonhuman primates. American Journal of Primatology, 80(10), e22871.

CONCLUSÕES GERAIS

Os primatas estão passando por um momento delicado de declínio populacional em escala global. As principais ameaças incluem a destruição do habitat, superexploração de recursos naturais, caça ilegal, invasão por espécies exóticas e, em alguns casos, alta suscetibilidade a doenças, como os bugios-ruivos *Alouatta clamitans*. Devido à essa crise da biodiversidade mundial, o número de espécies continuamente incluídas nas categorias ameaçadas da IUCN é crescente e os esforços de conservação são essenciais. Com relação a populações *ex situ*, o baixo sucesso reprodutivo geralmente resulta de conhecimento insuficiente sobre sua fisiologia reprodutiva ou manejo subótimo como consequência da falta de conhecimento sobre as necessidades naturais da espécie.

Os bugios são tidos como um primata altamente resiliente à ação antrópica e parte de seu sucesso se deve à flexibilidade ecológica, de modo que o tamanho do fragmento não altera seu padrão comportamental. Contudo, parte dos estudos está centrada em populações não-brasileiras, como *Alouatta pigra* e *A. palliata.* No que tange às espécies brasileiras, a quase totalidade dos trabalhos, sobretudo com a espécie *A. clamitans*, diz respeito a populações ao sul e em fragmentos pequenos. Portanto, o objetivo central dessa tese era entender os desdobramentos para o comportamento social de grupos que vivem em um ambiente grande e conectado, um dos maiores – e últimos – fragmentos de Mata Atlântica do mundo.

No **Capítulo I**, onde se abordou os parâmetros socioecológicos, viu-se que eles foram semelhantes a outras espécies do gênero e semelhantes a outras populações vivendo em fragmentos menores e de clima diferente, de modo que a área de estudo e os fatores abióticos do presente estudo não se traduziram em parâmetros diferenciados. Entretanto, ressalta-se a variação entre grupos com relação à área de vida, a ausência de sobreposição de territórios e a baixa competitividade entre grupos, entre indivíduos e entre espécies. Esses dados são altamente relevantes para mostrar que grandes fragmentos pristinos, embora não alterem o orçamento de atividades dos grupos, podem sim diminuir a competitividade e, possivelmente, diminuir o estresse, revertendo-se em uma saúde melhor da população local.

Já no **Capítulo II**, verificou-se que, apesar dos parâmetros ecológicos semelhantes ao encontrado em outros trabalhos, as sociedades de bugios do PECB apresentaram um padrão distinto e uma das mais altas taxas de interação entre indivíduos. Além da verificação que ambos os sexos dispersam, a composição dos grupos foi extremamente fixa. Já as redes sociais destacaram as fêmeas como agentes centrais na catação, um

padrão ubíquo aos primatas. A associação espacial salientou a centralidade dos imaturos, além de mães e seus filhotes serem as díades com maiores índices de associação. Outro resultado interessante foi a relação entre mudanças demográficas e comportamento social, onde o grupo com maiores mudanças também foi aquele com menores taxas de catação e maiores taxas de agressão.

Ao longo do **Capítulo III**, as questões que permeiam as diferenças individuais no cuidado materno foram abordadas. Embora tenha se verificado que essa população interage mais que outras, as interações mãe e filhote não foram frequentes o suficiente para aplicar as categorias propostas para estilo materno de Catarrhini em um primata Neotropical sem combiná-las em categorias mais abrangentes. Visto que as interações foram raras e às vezes ausentes, o tempo em contato físico entre mães e filhotes foi a categoria que melhor explicou a variação entre fêmeas. Contrariamente, a associação espacial não foi diferente entre as mães. Portanto, o contato físico, mas não a proximidade, é o principal indicativo de relações mãe-filhote.

Finalmente, o **Capítulo IV** mostrou que técnicas inovadoras, como o LC-MS, e técnicas pouco incorporadas, como a dosagem de ocitocina urinária, por serem ainda pouco difundidas, carecem de validação nos mais diferentes níveis. Os dados aqui providos serão de grande valia para que os futuros trabalhos economizem tentativas com amostras de difícil obtenção, como a urina.

Portanto, como **conclusão geral** tem-se que, embora o tamanho do fragmento do presente estudo não tenha se expressado em distintos parâmetros socioecológicos e orçamento de atividades para essa população, as interações sociais variaram amplamente do relatado na literatura, com maiores taxas de interação, maiores taxas de catação e menor competitividade entre os grupos. Além disso, grupos podem responder individualmente com relação à variações demográficas e área de vida, por exemplo. Ademais, comportamentos extremamente raros e novos foram detectados para essa população. Esses resultados evidenciam como estudos de história natural e do comportamento social fornecem conhecimento fundamental para nossa compreensão de como grupos individuais se comportam em ambientes pristinos, de modo que possamos entender as consequências da nossa atividade e da fragmentação nas populações selvagens.

APÊNDICES

APÊNDICE IV.A - Resultado das diluições seriadas do *pool* das amostras de alta concentração para o ensaio de ocitocina urinária.

Diluição	pg/poço	Diluição	pg/poço
1:1	726.707	1:6	0.254
1:1	725.521	1:6	0.421
1:1	720.800	1:6	0.434
1:2	3.015	1:7	0.592
1:2	2.360	1:7	0.319
1:2	2.838	1:7	0.365
1:3	0.481	1:8	0.229
1:3	0.515	1:8	0.174
1:3	0.527	1:8	0.187
1:4	0.694	1:9	0.537
1:4	0.763	1:9	0.231
1:4	0.515	1:9	0.264
1:5	0.387	1:10	0.554
1:5	0.324	1:10	0.344
1:5	0.238	1:10	0.268

APÊNDICE IV.B - Diluições menores de quatro amostras (GS624, GS627, GS797 e GS844). "Fora" indica fora do limite de detecção do teste. A sequência de diluição não foi a mesma para todas as amostras por conta do menor volume.

Diluição	pg/poço	Diluição	pg/poço	Diluição	pg/poço	Diluição	pg/poço
GS624-25%	15.348	GS627-25%	8.604	GS797-25%	3.588	GS844-25%	1.730
GS624-25%	15.705	GS627-25%	8.786	GS797-25%	3.407	GS844-25%	1.605
GS624-25%	22.044	GS627-25%	9.603	GS797-25%	2.961	GS844-25%	1.338
GS624-60%	1046.902	GS627-60%	29.758	GS797-40%	3.729	GS844-60%	4.391
GS624-60%	848.416	GS627-60%	28.846	GS797-40%	4.795	GS844-60%	3.872
GS624-60%	532.916	GS627-60%	29.320	GS797-60%	5.166	GS844-60%	3.251
GS624-70%	fora	GS627-70%	89.528	GS797-60%	4.846	GS844-70%	3.557
GS624-70%	fora	GS627-70%	68.224	GS797-60%	6.279	GS844-70%	3.272
GS624-70%	fora	GS627-70%	69.710			GS844-70%	9.905
GS624-80%	fora	GS627-80%	1183.026	GS797-80%	10.508	GS844-80%	4.760
GS624-80%	fora	GS627-80%	632.957	GS797-80%	10.710	GS844-80%	4.280
GS624-80%	fora	GS627-80%	809.765	GS797-80%	9.494	GS844-80%	4.968
GS624-90%	fora	GS627-90%	fora			GS844-90%	5.875
GS624-90%	fora	GS627-90%	fora			GS844-90%	3.706
GS624-90%	fora	GS627-90%	fora			GS844-90%	3.575
GS624-100%	967.678	GS627-100%	fora	GS797-100%	119.028	GS844-100%	5.395
GS624-100%	436.967	GS627-100%	fora	GS797-100%	102.672	GS844-100%	5.051
GS624-100%	476.801	GS627-100%	fora	GS797-100%	101.015	GS844-100%	5.595

APÊNDICE IV.C - Resultado do teste de acurácia. Primeira coluna indica as concentrações teóricas adicionadas de acordo com os valores do kit; a segunda coluna mostra o valor base mensurado do *pool* de amostras (hexaplicatas) e o valor mensurado no ensaio; a terceira coluna indica o valor esperado (valor médio do *pool* mais o valor adicionado); a quarta coluna mostra o valor observado; e a quinta coluna mostra a variação em porcentagem. Os valores marcados em vermelho foram discrepantes.

Concentração OT pipetada	Concentração OT calculada	Concentração total esperada	Concentração total observada	
0	5.687			
0	7.042			
0	5.842			
0	6.230			
0	5.674			
0	5.523	$\bar{x} = 6.000$		
1.56	1.242	7.242	33.082	**% variação**
1.56	1.242	7.242	6.08	83.96
1.56	1.242	7.242	6.412	88.54
3.12	4.698	9.120	17.588	
3.12	4.698	9.120	9.128	100.09
3.12	4.698	9.120	8.113	88.96
6.25	5.189	12.250	13.23	108.00
6.25	5.189	12.250	12.696	103.64
6.25	5.189	12.250	11.901	97.15
12.5	11.56	18.500	19.608	105.99
12.5	11.56	18.500	19.21	103.84
12.5	11.56	18.500	21.659	117.08
25	23.608	31.000	66.412	
25	23.608	31.000	39.356	126.96
25	23.608	31.000	37.236	120.12
50	60.516	56.000	86.151	153.84
50	60.516	56.000	88.679	158.36
50	60.516	56.000	84.049	150.09
100	91.701	106.000	90.441	85.32
100	91.701	106.000	92.339	87.11
100	91.701	106.000	84.831	80.03
			Média	108.84
			DP	19.27

APÊNDICE IV.D - Resultado do teste de recuperação. Primeira coluna indica as concentrações teóricas adicionadas de acordo com os valores do kit; a segunda coluna mostra o valor base mensurado das quadruplicatas da amostra GS800 e o valor mensurado no ensaio; a terceira coluna indica o valor esperado (valor médio das quadruplicatas mais o valor adicionado); a quarta coluna mostra o valor observado; e a quinta coluna mostra a variação em porcentagem. As concentrações estão em picograma por poço (pg/poço).

Concentração de OT pipetada	Concentração de OT calculada	Concentração total esperada	Concentração total observada	% recuperado
0	6.008			
0	4.561			
0	5.219			
0	5.663	$\bar{x}$ = 5.36275		
15		20.36275	7.025	34.50
15		20.36275	7.854	38.57
20		25.36275	16.939	66.79
20		25.36275	16.465	64.92
80		85.36275	48.209	56.48
80		85.36275	35.122	41.14

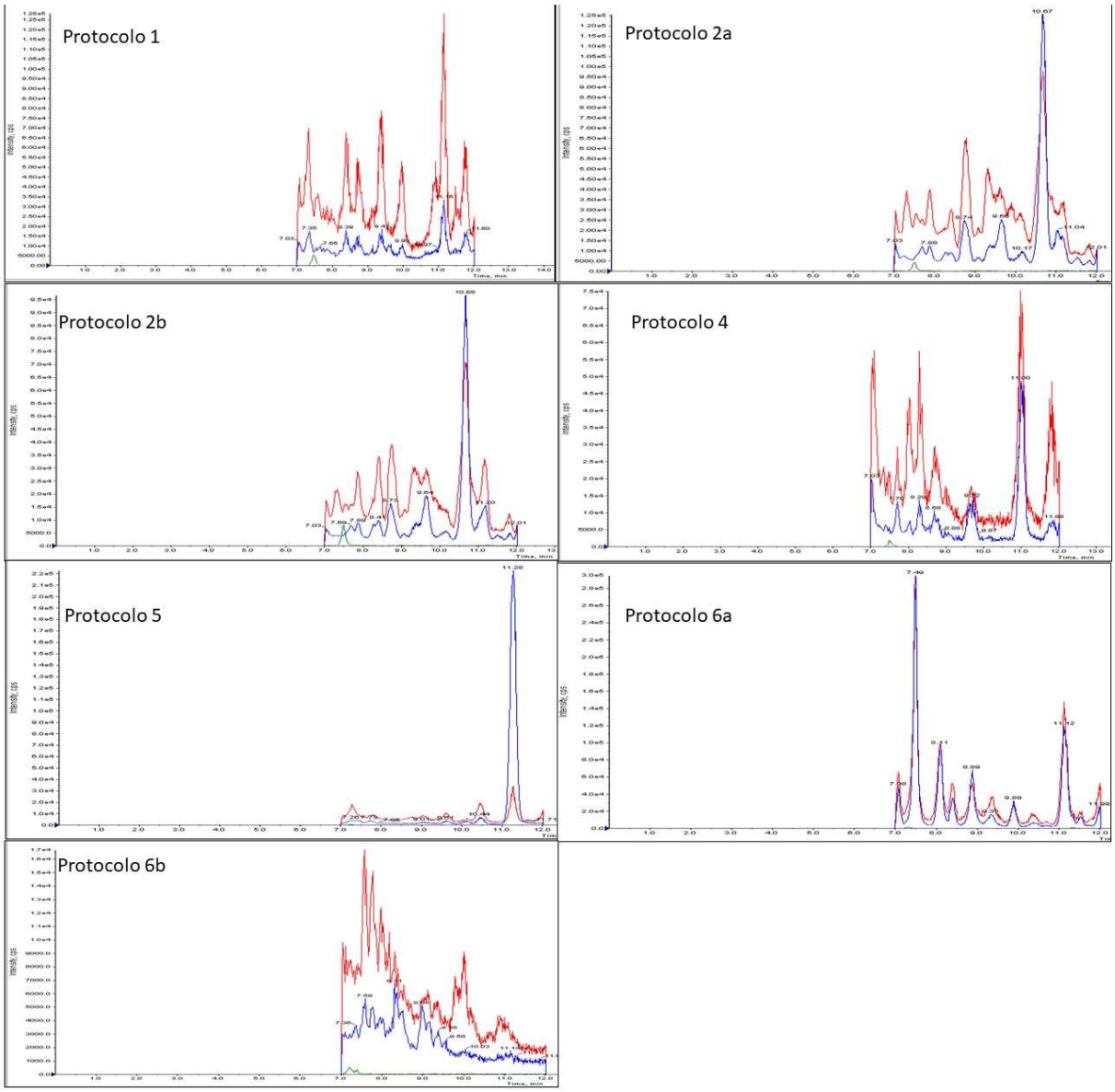
APÊNDICE IV.E - Resultado do ensaio envolvendo algumas das frações intermediárias do teste de recuperação. SPE 1ª e 2ª indicam a ordem que foi realizada. Limite mínimo: 4.095pg/mL e limite máximo: 262.500 pg/mL.

Amostra	Etapa	SPE	OT pg/mL
GS800	1mL 10%ACN/0.1%TFA (3a)	1ª	>262.500
GS800	1mL 10%ACN/0.1%TFA (3a)	1ª	>262.500
GS800 + alta	1mL 10%ACN/0.1%TFA (3a)	1ª	>262.500
GS800 + alta	1mL 10%ACN/0.1%TFA (3a)	1ª	>262.500
GS800	lavagem 1 (0.1%TFA)	2ª	27.48
GS800	lavagem 1 (0.1%TFA)	2ª	<4.095
GS800 + alta	lavagem 1 (0.1%TFA)	2ª	<4.095
GS800 + alta	lavagem 1 (0.1%TFA)	2ª	10.76
GS800	lavagem 2 (0.1%TFA)	2ª	9.25
GS800	lavagem 2 (0.1%TFA)	2ª	86.45
GS800 + alta	lavagem 2 (0.1%TFA)	2ª	17.83
GS800 + alta	lavagem 2 (0.1%TFA)	2ª	62.69
GS800	lavagem 3 (0.1%TFA)	2ª	4.77
GS800	lavagem 3 (0.1%TFA)	2ª	<4.095
GS800 + alta	lavagem 3 (0.1%TFA)	2ª	<4.095
GS800 + alta	lavagem 3 (0.1%TFA)	2ª	9.91

APÊNDICE IV.F - Relação das concentrações oriundas do ensaio de ocitocina. Amostras GS627 e GS800 foram utilizadas como controle, sem utilização de filtro ou de uma segunda SPE. As amostras indicadas como "filtro" são aquelas da tentativa i, onde a amostra diluída em isopropanol passou por um filtro. Já as amostras indicadas como "SPE" são aquelas da tentativa ii, onde se realizou uma segunda extração de fase sólida (SPE).

Amostra	pg/poço	pg/mL
GS627	977.769	2566.643
GS627	726.443	1906.914
GS627-filtro	29.182	76.602
GS627-filtro	15.360	40.320
GS627-SPE	6.663	17.490
GS627-SPE	6.689	18.030
GS800	1052.727	2763.409
GS800	1132.407	2972.568
GS800-filtro	11.683	30.667
GS800-filtro	9.929	26.063
GS800-SPE	5.219	13.701
GS800-SPE	5.663	14.864

APÊNDICE IV.G - Cromatogramas de Progesterona de cada um dos protocolos utilizados na análise multiesteroide do LC-MS.



APÊNDICE I.A: Lista de dias com a quantidade de horas de observação para cada grupo.

Horas de observação	G3	G4
< 4	11	4
4 a 5	2	0
5 a 6	0	2
6 a 7	0	0
7 a 8	4	1
8 a 9	2	4
> 9	46	43

APÊNDICE I.B: Lista de valores diários das variáveis analisadas e incluídos no modelo da análise de caminhos.

Grupo	Chuva	Mês	Estação	IE	IG	Intra	Comp. Total	Descanso	Forrageio	Locomoção	Outro	%Fruta	%Folha	PD
G3	47	Nov	Chuvosa	0	2	NA	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1078.6
G3	3.1	Nov	Chuvosa	2	3	NA	5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	775.2
G3	0	Nov	Chuvosa	0	1	NA	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	866.1
G3	0.2	Dez	Chuvosa	0	2	NA	2	61.1	17.4	7.4	14.1	0.0	36.4	1198.2
G3	0	Dez	Chuvosa	0	3	NA	3	41.6	22.6	16.8	19.0	21.4	57.1	1124.2
G3	0	Dez	Chuvosa	0	1	1	2	46.2	10.9	23.5	19.3	8.3	50.0	947.9
G3	2	Dez	Chuvosa	0	1	NA	1	33.3	25.0	41.7	0.0	0.0	12.5	748.1
G3	2.7	Jan	Chuvosa	0	1	NA	1	NA	NA	NA	NA	25.0	58.3	1088.8
G3	0.1	Jan	Chuvosa	0	1	NA	1	85.7	0.0	0.0	14.3	0.0	100.0	737.2
G4	0.8	Jan	Chuvosa	0	1	NA	1	NA	NA	NA	NA	50.0	50.0	487.2
G4	2.8	Jan	Chuvosa	1	2	NA	3	NA	NA	NA	NA	18.8	50.0	700.7

G4	1.8	Jan	Chuvosa	1	1	1	3	18.8	25.0	25.0	31.3	46.7	40.0	895.9
G4	21.8	Jan	Chuvosa	2	2	NA	4	NA	NA	NA	NA	35.3	41.2	567.8
G4	4.4	Jan	Chuvosa	8	2	3	13	0.0	34.8	26.1	39.1	21.1	63.2	1093.3
G4	14.2	Jan	Chuvosa	0	2	NA	2	34.7	20.4	28.6	16.3	NA	NA	1075.7
G4	9.2	Jan	Chuvosa	0	1	NA	1	38.7	10.7	36.0	14.7	NA	NA	1272.1
G4	15.3	Jan	Chuvosa	0	1	1	2	60.3	17.8	13.7	8.2	50.0	30.0	645.9
G4	5.7	Jan	Chuvosa	2	1	NA	3	20.8	29.2	22.2	27.8	16.7	61.1	1426.3
G4	5.1	Fev	Chuvosa	1	1	NA	2	46.2	28.8	17.3	7.7	25.0	66.7	828.8
G3	1.7	Fev	Chuvosa	2	1	NA	3	40.0	26.0	24.0	10.0	33.3	50.0	771.9
G3	0.4	Fev	Chuvosa	2	1	1	4	66.3	12.0	4.3	17.4	23.5	52.9	857.2
G3	0.2	Fev	Chuvosa	0	2	NA	2	35.2	22.1	27.0	15.6	5.9	70.6	1025.3
G3	2.4	Mar	Chuvosa	0	1	1	2	NA	NA	NA	NA	41.2	41.2	758.7
G3	7.3	Mar	Chuvosa	0	1	NA	1	74.6	5.1	8.5	11.9	36.4	36.4	1073.7
G3	9.7	Mar	Chuvosa	0	1	NA	1	52.0	33.7	4.1	10.2	63.6	18.2	353.4
G3	0.1	Mar	Chuvosa	0	1	NA	1	50.0	0.0	10.5	39.5	100.0	0.0	256.1
G4	1.1	Mar	Chuvosa	2	1	NA	3	21.1	36.6	16.9	25.4	42.9	42.9	737.7
G4	0.1	Mar	Chuvosa	2	1	NA	3	58.5	17.1	11.0	13.4	41.2	52.9	1270.7
G4	56.3	Mar	Chuvosa	1	1	NA	2	32.5	18.2	31.2	18.2	66.7	25.0	826.7
G4	0	Mar	Chuvosa	0	1	NA	1	41.5	30.5	13.4	14.6	64.7	29.4	1027.2
G4	0	Mar	Chuvosa	1	2	NA	3	NA	NA	NA	NA	35.7	42.9	1076.5
G3	1	Abr	Chuvosa	0	1	NA	1	NA	NA	NA	NA	42.9	28.6	586.7
G3	4.1	Abr	Chuvosa	0	1	NA	1	67.9	21.4	8.3	2.4	71.4	21.4	673.2
G3	0.2	Abr	Chuvosa	0	1	NA	1	17.2	51.7	20.7	10.3	41.7	33.3	563.8
G3	0.2	Abr	Chuvosa	0	1	NA	1	77.6	18.4	3.9	0.0	70.0	20.0	418.8
G3	0	Abr	Chuvosa	0	1	NA	1	54.4	40.4	5.3	0.0	57.1	28.6	294.0
G3	0	Abr	Chuvosa	1	1	NA	2	74.8	24.4	0.8	0.0	66.7	33.3	691.7
G4	0	Abr	Chuvosa	0	2	1	3	37.7	33.3	23.2	5.8	80.0	0.0	842.5

G4	0	Abr	Chuvosa	0	1	NA	1	32.3	40.0	23.1	4.6	54.5	0.0	733.5
G4	0	Abr	Chuvosa	1	1	NA	2	53.8	13.8	16.3	16.3	50.0	0.0	769.2
G4	0.2	Abr	Chuvosa	0	1	NA	1	56.0	22.0	6.6	15.4	64.3	7.1	619.2
G4	15.1	Abr	Chuvosa	1	0	NA	1	70.2	26.2	3.6	0.0	57.1	0.0	266.8
G3	0	Mai	Seca	1	1	NA	2	70.2	22.8	7.0	0.0	58.3	25.0	419.4
G3	0	Mai	Seca	0	1	NA	1	55.2	20.9	9.0	14.9	90.0	0.0	430.1
G3	0	Mai	Seca	1	1	2	4	61.5	28.1	7.3	3.1	52.9	47.1	785.1
G3	20	Mai	Seca	1	1	NA	2	93.3	0.0	6.7	0.0	25.0	25.0	360.0
G4	0	Mai	Seca	0	1	1	2	55.2	15.5	29.3	0.0	31.3	6.3	648.5
G4	0.2	Mai	Seca	0	2	NA	2	66.2	18.2	14.3	1.3	80.0	0.0	691.0
G4	0.1	Mai	Seca	1	1	NA	2	63.8	23.8	10.8	1.5	43.8	6.3	482.7
G4	1	Mai	Seca	0	1	NA	1	65.9	13.0	21.1	0.0	63.6	9.1	987.0
G4	1.1	Mai	Seca	0	1	NA	1	37.2	27.9	29.1	5.8	78.6	0.0	434.3
G4	0.3	Mai	Seca	0	1	NA	1	10.3	48.7	35.9	5.1	91.7	0.0	448.6
G4	0.3	Mai	Seca	0	2	NA	2	44.6	26.2	15.4	13.8	69.2	7.7	734.2
G4	0	Mai	Seca	1	1	NA	2	44.9	26.8	21.7	6.5	63.6	9.1	506.8
G4	0	Jun	Seca	1	1	1	3	46.2	14.4	30.8	8.7	66.7	0.0	1040.5
G4	0	Jun	Seca	0	1	NA	1	61.8	10.5	14.5	13.2	25.0	0.0	587.7
G4	0	Jul	Seca	0	2	NA	2	48.1	15.2	24.1	12.7	25.0	0.0	684.0
G4	0.4	Jul	Seca	0	1	NA	1	4.5	40.9	36.4	18.2	30.0	0.0	621.8
G4	4.5	Jul	Seca	0	1	1	2	64.7	12.0	15.8	7.5	41.7	25.0	744.6
G4	0.4	Jul	Seca	1	1	NA	2	52.0	27.2	17.6	3.2	23.5	5.9	875.8
G4	0.1	Jul	Seca	0	1	NA	1	46.6	19.0	29.4	4.9	75.0	0.0	1021.8
G4	0	Jul	Seca	0	1	NA	1	44.8	25.9	21.6	7.8	25.0	12.5	2592.6
G4	0.1	Set	Seca	0	1	NA	1	62.0	20.7	9.9	7.4	16.7	0.0	395.3
G4	0.1	Set	Seca	2	1	1	4	47.1	22.6	17.4	12.9	50.0	0.0	548.8
G4	0	Set	Seca	0	1	NA	1	50.0	15.1	24.7	10.3	NA	NA	861.0

G4	0	Set	Seca	0	2	NA	2	63.0	23.7	12.6	0.7	NA	NA	592.8
G4	0	Set	Seca	0	1	NA	1	59.5	20.8	15.0	4.6	30.0	10.0	789.4
G4	0	Set	Seca	1	1	1	3	35.3	37.3	17.3	10.0	36.4	4.5	794.8
G4	0	Out	Seca	0	1	NA	1	56.3	27.3	14.2	2.3	41.7	0.0	1121.7
G4	2.2	Out	Seca	0	1	NA	1	40.4	21.3	22.5	15.7	15.4	23.1	633.5
G4	3.9	Out	Seca	0	1	NA	1	66.7	0.0	30.0	3.3	46.2	15.4	829.8
G4	2.8	Out	Seca	0	1	NA	1	66.2	27.2	2.6	4.0	23.1	23.1	885.9
G3	18.2	Out	Seca	0	1	2	3	65.4	18.0	13.5	3.0	33.3	0.0	549.1
G3	7.5	Out	Seca	0	1	NA	1	58.4	29.2	6.2	6.2	36.4	0.0	524.8
G3	0.3	Out	Seca	0	1	NA	1	81.6	7.9	6.1	4.4	75.0	0.0	474.5
G3	0	Nov	Chuvosa	0	1	NA	1	80.2	8.3	2.1	9.4	37.5	12.5	503.5
G3	2.1	Nov	Chuvosa	0	NA	NA	0	75.8	12.6	0.0	11.6	50.0	0.0	263.4
G3	9.7	Nov	Chuvosa	0	1	1	2	69.5	21.1	2.1	7.4	61.5	15.4	576.4
G3	0	Nov	Chuvosa	0	1	1	2	44.2	41.6	3.9	10.4	62.5	25.0	580.5
G4	0	Nov	Chuvosa	1	1	1	3	71.1	14.5	0.0	14.5	62.5	12.5	269.9
G4	0	Nov	Chuvosa	0	1	1	2	64.2	8.2	12.6	15.1	43.8	43.8	1058.8
G4	2.2	Nov	Chuvosa	0	2	NA	2	NA	NA	NA	NA	50.0	40.0	552.7
G4	0	Nov	Chuvosa	0	1	NA	1	51.8	37.5	5.4	5.4	30.0	20.0	985.4
G3	0.8	Dez	Chuvosa	0	1	NA	1	59.0	18.1	13.3	9.6	14.3	81.0	770.4
G3	0	Dez	Chuvosa	1	1	NA	2	41.7	22.0	22.7	13.6	13.6	77.3	1085.6
G3	0.1	Dez	Chuvosa	1	4	1	6	61.5	11.9	19.3	7.3	42.1	52.6	915.4
G3	0	Dez	Chuvosa	0	1	NA	1	69.9	14.0	8.4	7.7	NA	NA	750.1
G4	0	Dez	Chuvosa	1	4	NA	5	71.7	15.9	4.4	8.0	22.2	55.6	944.4
G4	0	Dez	Chuvosa	2	1	1	4	31.1	47.2	16.0	5.7	18.8	43.8	1079.7
G4	2.8	Mar	Chuvosa	NA	0	NA	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	644.6
G3	5.7	Mar	Chuvosa	NA	0	NA	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	515.9
G4	5.7	Mar	Chuvosa	NA	0	NA	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	475.5

G3	12	Mar	Chuvosa	NA	0	NA	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	694.7
G3	1.4	Mar	Chuvosa	NA	0	NA	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	226.5
G3	0.2	Jun	Seca	NA	0	NA	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	445.5
G3	0	Jun	Seca	NA	1	NA	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	862.4
G4	NA	Set	Seca	NA	0	NA	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	405.1
G4	NA	Set	Seca	NA	0	NA	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	206.1
G4	NA	Set	Seca	NA	0	NA	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	84.7

IE: encontros interespecíficos; IG: encontros intergrupais; Intra: competição intragrupo; Comp. Total: soma das três fontes de competição; PD: percurso diário.

APÊNDICE I.C: Valores mensais do tamanho da área de vida em hectare para cada grupo, calculado a partir do 95% MCP

	G3	**G4**
Jan	8,6	20,3
Fev	10,1	19,9
Mar	11,7	23,0
Abr	15,2	16,8
Mai	10,0	23,3
Jun	5,9	6,5
Jul	-	26,4
Ago	-	-
Set	-	24,6
Out	7,6	30,2
Nov	8,4	24,5
Dez	13,2	16,4
Total	15,0	41,3