

Levantamento da proporção sexual em *Ara chloropterus* Gray, 1859 em CETAS da Bahia, Brasil*

Survey of sex proportion in *Ara chloropterus* Gray, 1859 in CETAS in Bahia, Brazil

Edma Santos de Antonio,** Priscila Sacramento Batista,*** Sabrina Barbosa Teixeira,*** Jérisson Silva Barros,*** Gabriel Doretto Gobbo,*** Ricardo Evangelista Fraga,**** Laize Tomazi****

Resumo

O presente trabalho teve por objetivo determinar a proporção entre machos e fêmeas na população de *A. chloropterus* alocada em CETAS (Centro de Triagem de Animais Silvestres) na Bahia, Brasil. Foram estudados 12 indivíduos alocados no CETAS de Porto Seguro; estes compreendiam, no período do estudo, todas as araras-vermelhas alocadas em CETAS na Bahia. A sexagem molecular ocorreu, utilizando como material biológico sangue de corte de unha. O processamento das amostras ocorreu através de extração de DNA, PCR utilizando os *primers* 2550F/2718R e eletroforese em gel de agarose 2%. As fêmeas foram identificadas por duas bandas de aproximadamente 650 e 450 pb e os machos por banda única próxima a 650 pb. Durante a coleta das amostras, foi realizada a observação comportamental direta de eventos pontuais, visando identificar a formação de pares. Dos 12 indivíduos analisados, 7 (58,3%) eram fêmeas e 5 (41,7%) machos, o que resultou em proporção sexual próxima de 1:1; similar ao esperado em populações de psitacídeos de vida livre. A partir da avaliação comportamental, foi possível inferir a formação de pelo menos 2 pares sociais heterossexuais. Este é o primeiro trabalho a relatar a proporção sexual em população de *A. chloropterus*.

Palavras chave: arara-vermelha, Psittaciformes, sexagem molecular.

Abstract

The present work objectify to determine the proportion between males and females in the population of *A. chloropterus* allocated in CETAS (Wild Animal Screening Center) in Bahia, Brazil. Twelve individuals allocated to CETAS in Porto Seguro were studied; these comprised all the green-winged macaws allocated to CETAS in Bahia in the study period. Molecular sexing took place, using blood from a cut nail as biological material. The processing of the samples occurred through DNA extraction, PCR using the primers 2550F/2718R and electrophoresis in 2% agarose gel. Females were identified by two bands of approximately 650 and 450 bp and males by a single band close to 650 bp. In addition, during sample collection, direct behavioral observation of specific events was carried out, in order to identify the formation of pairs among the studied animals. Of the 12 individuals analyzed, 7 (58,3%) were females and 5 (41,7%) males. This resulted in a sexual ratio close to 1:1; similar to that expected in populations of free-living parrots. From the behavioral assessment, it was possible to infer the formation of at least 2 heterosexual social pairs. This is the first work to report the sex ratio in a population of *A. chloropterus*.

Keywords: green-winged macaws, Psittaciformes, molecular sexing.

Introdução

O Brasil é o país com maior biodiversidade em aves da Ordem Psittaciformes; dentre as espécies brasileiras deste grupo está *Ara chloropterus* Gray, 1859 (arara-vermelha) (SICK, 1997). Apesar desta espécie não ser globalmente ameaçada de extinção (IUCN, 2021), encontra-se extinta na Mata Atlântica (LIMA, 2013); o que inclui o estado da Bahia (BAHIA, 2017). Dentre os fatores que levam a perda da biodiversidade está o tráfico de animais silvestres, sendo as aves o grupo mais afetado por este (DESTRO et al., 2012).

Os CETAS (Centro de Triagem de Animais Silvestres) são unidades relevantes na destinação dos animais apreendidos do tráfico; sendo a destinação frequentemente associada a projetos de soltura (ex: reintrodução ou revigoramento populacional), tendo como foco retornar para a natureza animais em condições de sobrevivência e reprodução (BRASIL, 2015). O baixo financiamento governamental nessas instituições (Godoy, 2006), pode dificultar a realização das avaliações recomendadas pelas diretrizes que os regem, incluindo o exame da sexagem. Psitacídeos não possuem dimorfismo sexual (ALLGAYER e CZIULIK, 2007), são monogâmicos sociais (CAPARROZ et

*Recebido em 13 de julho de 2021 e aceito em 22 de dezembro de 2021.

**Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. Autora correspondente: edma.santos@ufba.br.

***Graduando(a) em Ciências Biológicas pela Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil.

****Professor(a) da Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil.

al., 2011) e poligâmicos genéticos (Beissinger, 2008). Neste contexto, não realizar sexagem em psitacídeos, limita as medidas de conservação a serem tomadas.

Dentre as técnicas de sexagem de aves, encontra-se a sexagem molecular. Comparativamente, esta é assertiva, de baixo custo, pouco invasiva e segura (Vieira et al., 2009). O marcador molecular normalmente utilizado na sexagem é o CHD (*chromo-helicase-DNA-binding*), gene evolutivamente conservado em aves não-ratitas, possuindo variação intrônica entre os cromossomos sexuais, o que permite a distinção por tamanho entre CHD-Z e CHD-W (Griffiths et al., 1996). Estudos demonstram que o par de *primers* 2550F/2718R (Fridolfsson e Ellegren, 1999) é o mais eficaz para a técnica de sexagem molecular de aves não-ratitas (Ágh et al., 2018; Ong e Vellayan; 2008; Ramos et al., 2021). Trabalhos utilizando os iniciadores citados na sexagem de *A. chloropterus*, registraram eficácia para a espécie (Bosnjak et al., 2013; Del Puerto et al., 2017; Franco-Gutiérrez et al., 2017; Maheshkumar et al., 2017; Neves, 2013; Ong e Vellayan, 2008; Vucicevic et al., 2012).

Considerando o exposto, o objetivo do presente trabalho foi determinar a proporção entre machos e fêmeas em populações de *A. chloropterus* alocadas em CETAS na Bahia, Brasil.

Material e Métodos

O presente estudo foi conduzido parte no CETAS de Porto Seguro (CETAS-PS) (16°23'17.4"S 39°28'56.1"W) e parte no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira, da Universidade Federal da Bahia (IMS/CAT-UFBA) (14°52'41.0"S 40°48'43.9"W). No CETAS-PS, foi realizada a coleta do material biológico. No Laboratório de Biologia Celular e Molecular do IMS/CAT-UFBA, ocorreu o processamento das amostras.

O CETAS-PS, é uma das 23 unidades de recebimento de animais silvestres mantidas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (Ibama, 2017). Esse centro foi criado no ano de 2010 e encontra-se localizado dentro da Estação Ecológica Pau-Brasil (ESPAB/CEPLAC), na cidade de Porto Seguro-BA. Com pouco mais de uma década de existência, o CETAS-PS registra um número de quase 30 mil animais atendidos e estima-se que cerca de 85% dos animais recebidos foram reintroduzidos na natureza (Ibama, 2020).

A amostra estudada de animais alocados no CETAS-PS, foi composta por 12 araras-vermelhas (*A. chloropterus*), as quais possuíam as seguintes identificações de anilha ou chip: 02172, 00297, 00227, 982009106695212, 00219, 00222, 00224, 002, 00223, 00218, 00221 e 00220. No período de coleta (11/2019), havia 3 CETAS em funcionamento no estado da Bahia (nas cidades de Salvador, Vitória da Conquista e Porto Seguro), os únicos exemplares de *A. chloropterus* nos CETAS do estado eram os 12 de Porto Seguro. Portanto, pode-se afirmar que o presente trabalho examinou todas as araras-vermelhas alocadas em CETAS no estado da Bahia naquele período. Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) do IMS/CAT-UFBA (protocolo nº 093/2021).

De cada indivíduo foi coletada uma gota de sangue através de um pequeno corte na unha com tesoura especializada e esterilizada. Após a coleta foi imediatamente aplicado pó hemostático Granado® sobre o corte. O tempo estimado de

contenção física do animal para coleta foi de até 10 minutos. O sangue retirado foi colocado em tiras (3,0 x 0,5 cm) esterilizadas de papel filtro qualitativo Qualy® (JProlab, Paraná, Brasil), armazenado em tubo de microcentrífuga individual e mantido em temperatura ambiente (22-25°C) por aproximadamente 48 horas, até a secagem completa do sangue no papel.

A extração de DNA ocorreu a partir de sangue seco aderido a papel filtro, seguindo o protocolo adaptado de Smith e Burgoyne (2004) para extração de DNA genômico de sangue em papel FTA® (Whatman™). A adaptação tratou-se da substituição do papel FTA® pelo papel filtro Qualy®.

A amplificação do material genético para a sexagem de aves (gene CHD-Z/W) foi realizada através de PCR convencional, utilizando-se os *primers* 2550F (5'-GTTACTGATTTCGTCTACGAGA-3') e 2718R (5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3') desenhados por Fridolfsson e Ellegren (1999). Para a PCR foi seguido o protocolo adaptado de Vucicevic et al. (2012), os parâmetros de concentração foram: 1x de Tampão; 1,5mM de MgCl₂; 0,1mM de dNTPs; 1µM para cada um dos *primers* (2550F e 2718R); 0,13U/µL de Taq DNA polimerase; 4µL do DNA extraído e H₂O ultrapura até a completar 20µL. As amostras foram amplificadas em termociclador Veriti™ Dx 96-well (Applied Biosystems®), sendo submetidas ao seguinte programa de termociclagem: Desnaturação inicial a 94°C por 3min; 40 ciclos de (i) desnaturação (94°C por 30 seg.), (ii) anelamento (50°C por 30 seg.) e (iii) extensão (72°C por 45 seg.); e Extensão final a 72°C por 45 seg., finalizando em tempo infinito com temperatura de 4°C. Como controle positivo da PCR, foram utilizadas duas amostras de DNA: uma de arara-vermelha (*A. chloropterus*) previamente sexada como macho e uma de arara-canindé (*Ara ararauna*) previamente sexada como fêmea. Como controle negativo da PCR foi utilizada água Milli-Q, no lugar do DNA.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, com corrente de 90 V e 120 mA, com tempo médio de corrida de 35 minutos. A visualização, das bandas de DNA, ocorreu via fotodocumentador L-Pix® (Loccus Biotecnologia®, SP, Brasil) de luz ultravioleta.

A determinação da sexagem ocorreu seguindo os parâmetros relatados por Fridolfsson e Ellegren (1999). Especificamente, o marcador molecular (gene CHD-Z/W) ao ser amplificado potencialmente gera duas bandas e, conseqüentemente, duas possíveis interpretações: (i) banda única entre 600 e 650 pb (CDH-Z), indicadora de indivíduos ZZ (machos) e (ii) duas bandas, uma entre 600pb e 650pb (CDH-Z) e outra entre 400 e 450 pb (CDH-W), identificando amostras de aves ZW (fêmeas). A partir dos resultados obtidos nos géis foi possível determinar a proporção entre machos e fêmeas, por regra de três; para tanto foi dividido o número de indivíduos do sexo mais numeroso (n⁺), pelo número de indivíduos do sexo menos numeroso (n⁻), ou seja, n⁺/n⁻=n⁺/x.

Os resultados, interpretados pela análise das bandas em gel (macho/fêmea/indeterminado) foram vinculados com a identificação dos indivíduos (nome popular, nome científico e número da anilha ou do chip). Tais dados compuseram o laudo da sexagem molecular dos indivíduos aqui estudados, o qual foi utilizado pelo CETAS como elemento importante para a posterior destinação dos animais.

A identificação da formação de pares entre os animais estudados ocorreu através da observação comportamental direta de eventos

pontuais. Tal observação ocorreu durante a coleta do material biológico, por um período de aproximadamente 30 minutos. As interações foram anotadas e em alguns momentos gravadas. Foram utilizados como parâmetros, para a identificação dos pares, os comportamentos sócio-afiliativos descritos por Favoretto (2016), Prestes (2000), Schneider et al. (2006) e Uribe (1982). Tais parâmetros, já eram de conhecimento da equipe de coleta dos dados, devido a experiência etológica adquirida em trabalhos anteriores, envolvendo análises comportamentais de psitacídeos.

Resultados

A partir da análise das ampliações do marcador molecular em gel de agarose (Figura 1), obteve-se a sexagem das 12 araras-vermelhas examinadas (100% das amostras). Dos indivíduos sexados, 7 (58,3%) eram fêmeas (Indivíduos 2, 3, 5, 6, 10, 11 e 12, da Tabela 1) e 5 (41,7%) machos (Indivíduos 1, 4, 7, 8 e 9, da Tabela 1). O que resultou em proporção sexual de 1:1,4 (macho:fêmea), resultado estatisticamente próximo de 1:1.

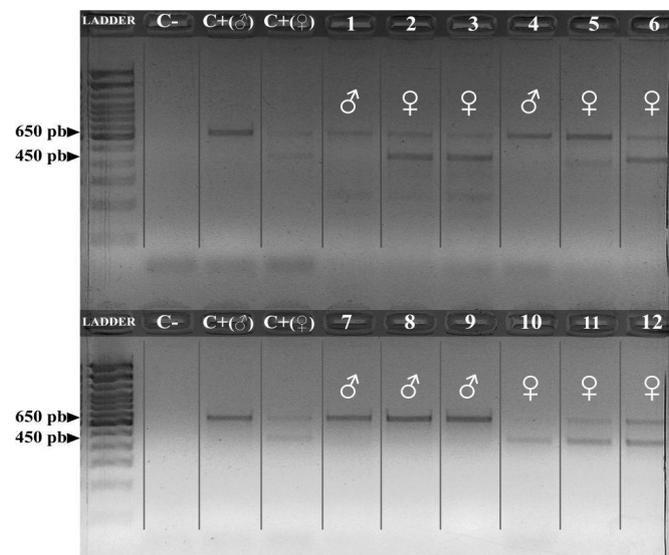
Tabela 1: Sexagem das araras-vermelhas (*Ara chloropterus*) alocadas em CETAS da Bahia, Brasil

Indivíduo	Identificação de anilha/chip	Resultado da sexagem
1	Anilha: 02172	Macho
2	Anilha: 00297	Fêmea
3	Anilha: 00227	Fêmea
4	Chip: 982009106695212	Macho
5	Anilha: 00219	Fêmea
6	Anilha: 00222	Fêmea
7	Anilha: 00224	Macho
8	Anilha: 002	Macho
9	Anilha: 00223	Macho
10	Anilha: 00218	Fêmea
11	Anilha: 00221	Fêmea
12	Anilha: 00220	Fêmea

A numeração dos indivíduos desta tabela equivale a mesma numeração das amostras mencionadas na Figura 1. Estes animais consistiam em todas as araras-vermelhas alocadas no CETAS de Porto Seguro - Bahia (Brasil), único CETAS da Bahia que abrigava araras-vermelhas no período do estudo.

No presente trabalho, os machos foram identificados pela presença de banda única a aproximadamente 650 pb (indicativo do alelo Z); ou seja, genótipo ZZ. As fêmeas foram identificadas em duas configurações de bandas: seis fêmeas (Indivíduos 2, 3, 5, 6, 11 e 12) foram identificadas, dentro do esperado, apresentando duas bandas, uma de aproximadamente 650 pb (alelo Z) e outra em torno de 450 pb (alelo W); já a fêmea correspondente ao Indivíduo 10 foi determinada pela visualização de uma única banda de aproximadamente 450 pb; o que corresponde ao alelo W, presente apenas em fêmeas. Todos os resultados aqui descritos foram incluídos no laudo emitido para o CETAS-PS.

Figura 1: Gel de agarose (2%), mostrando marcador molecular utilizado na sexagem de *Ara chloropterus* (arara-vermelha). Conteúdo dos poços da esquerda para a direita na primeira linha do gel: Ladder; C- (controle de reação negativo); C+ macho (amostra de *A. chloropterus* previamente sexada como macho); C+ fêmea (amostra de *Ara ararauna* previamente sexada como fêmea); seguido das reações de PCR das amostras dos indivíduos 1 (anilha: 02172), 2 (anilha: 00297), 3 (anilha: 00227), 4 (chip: 982009106695212), 5 (anilha: 00219) e 6 (anilha: 00222). Conteúdo dos poços da esquerda para a direita na segunda linha do gel: Ladder; C-; C+ macho; C+ fêmea; seguido das reações de PCR das amostras dos indivíduos 7 (anilha: 00224), 8 (anilha: 002), 9 (anilha: 00223), 10 (anilha: 00218), 11 (anilha: 00221) e 12 (anilha: 00220). As amostras sexadas como fêmeas foram dos indivíduos 2, 3, 5, 6, 10, 11 e 12. As amostras sexadas como machos foram dos indivíduos 1, 4, 7, 8 e 9. O marcador molecular da sexagem de aves equivale a bandas de DNA de aproximadamente 650 pb para macho e 650 pb e 450 pb para fêmea. Ladder 100pb a 1 Kb (Invitrogen®, SP, Brasil). Os últimos fragmentos do Ladder lidos de baixo para cima possuem os seguintes tamanhos: 100, 200, 300, 400, 500 e 600 pb. DNA corado com brometo de etídio. Os indivíduos são todos araras-vermelhas e provém do CETAS – Porto Seguro, Bahia, Brasil. A imagem do gel teve suas cores invertidas para facilitar a visualização das bandas de DNA.



Entre os 12 indivíduos analisados (Tabela 1), foi possível perceber a provável formação de pelo menos 2 pares sociais heterossexuais entre os Indivíduos 4 e 5 e os Indivíduos 6 e 7. Os comportamentos observados em ambos os possíveis pareamentos seguem: (i) limpar e organizar as penas do parceiro (*allopreening*), (ii) tocar os bicos e as línguas, (iii) se movimentar lateralmente no poleiro para ficar mais próximo do parceiro, permanecendo sempre juntos sem brigar e (iv) apresentar defesa por intimidação e ataque (no momento da contenção da ave para a coleta de sangue o par mostrou-se inquieto e irritado, voando em direção aos técnicos que realizavam a coleta).

Discussão

Segundo Fridolfsson e Ellegren (1999), desenvolvedores do par de *primers* usado no presente trabalho (2550F/2718R),

o tamanho das bandas da sexagem difere entre espécies pela variação no tamanho dos íntrons no marcador molecular utilizado (gene CHD). Porém, em todas as espécies de aves não-ratitas as duas bandas (representando Z e W) apresentarão diferença entre si, variando entre 150 e 250 pb (FRIDOLFSSON e ELLEGREN, 1999). O que foi corroborado pelos resultados do presente trabalho, no qual as bandas obtidas (650 pb para CHD-Z e 450 pb para CHD-W) apresentaram 200 pb de diferença entre si.

Monge et al. (2018) sexaram indivíduos da espécie *Ara macao*, grupo irmão de *A. chloropterus* (OLIVEIRA-MARQUES, 2006), utilizando os *primers* 2550F/2718R, e obtiveram para fêmeas bandas de ~650 e 480 pb; corroborando com a banda maior aqui encontrada e apresentando banda menor um pouco mais alta. Franco-Gutiérrez et al. (2017) realizaram sexagem de macho de *A. chloropterus* e de fêmea híbrida entre *A. chloropterus* e *A. ararauna*, obtendo bandas próximas a 660 pb para CHD-Z - em ambos os indivíduos - e 490 pb para CHD-W - na fêmea híbrida; tal padrão de banda é um pouco mais alto do que o encontrado no presente trabalho, principalmente quanto ao gene CHD-W. A diferença encontrada no tamanho entre as bandas dos dois últimos trabalhos citados e as bandas obtidas no presente trabalho, pode ser explicada pela menor separação entre as bandas no gel de agarose do presente trabalho; o que dificulta a avaliação precisa do peso molecular das bandas. Ágh et al. (2018), utilizando os *primers* 2550F/2718R para *Ara spp.*, não especificando as espécies, observaram fragmentos de 700 pb para o gene do cromossomo Z, maior que o encontrado para *A. chloropterus* no presente estudo, e 450 pb para o gene do W, coincidente com o aqui estimado. Bosnjak et al. (2013) realizaram sexagem de *A. chloropterus* macho com o par de *primers* 2550F/2718R e obtiveram banda de aproximadamente 650 pb, o que é concordante com os resultados obtidos no presente trabalho. Neves (2013), sexando araras-vermelhas fêmeas com o mesmo par de *primers*, em gel com maior tempo de corrida que o aqui realizado - portanto maior separação entre as bandas - obteve bandas de ~650 e 450 pb, resultado coincidente com os obtidos no presente trabalho.

Apesar de existir um padrão de bandas esperado para a sexagem de aves fêmeas, tal padrão nem sempre é claramente visualizado. No presente trabalho, das sete fêmeas identificadas, uma foi determinada apenas pela banda de ~450 pb (alelo W). Fridolfsson e Ellegren (1999) comentam que em alguns casos durante a amplificação o par de *primers* aqui utilizado têm preferência pelo fragmento menor, neste caso o gene CHD-W, o que resulta em uma banda menor mais forte em relação a banda maior (CHD-Z) e por vezes a banda maior fica indetectável em gel. Além desta situação ter ocorrido no presente trabalho, também foi relatada por outros (FRIDOLFSSON e ELLEGREN, 1999; ONG e VELLAYAN, 2008; VUCICEVIC et al., 2012; DEL PUERTO et al., 2017). Diante do exposto é considerada segura a sexagem de aves como fêmea a partir de gel com banda única na altura esperada para o CHD-W da espécie (FRIDOLFSSON e ELLEGREN, 1999).

Além das bandas de tamanho esperado, no presente trabalho também foi visualizada uma banda de peso molecular menor, abaixo de 450 pb. Tal banda foi observada nas amostras dos Indivíduos 1 e 3. Tal padrão (presença de uma banda a mais,

não esperada) não compromete a determinação sexual segura. Porém, é necessário ter cuidado porque bandas inespecíficas podem constituir-se em fator de confundimento na interpretação dos géis para a sexagem. Destacamos que o método de extração de DNA aqui empregado trata-se de um método simples, que não possui etapa de purificação, o que pode ter relação com a aparição de bandas inespecíficas.

A proporção aqui encontrada entre machos e fêmeas de *A. chloropterus*, próxima de 1:1, corrobora com a maioria dos trabalhos de sexagem de aves em cativeiro (TOMASULO et al., 2002; RASO e WERTHER, 2004; VIEIRA et al., 2012) e também com estudos incluindo apenas aves cativas da ordem Psittaciformes (MIYAKI et al., 1997; RUSSELLO e AMATO, 2001; GRANDO, 2002; NEVES, 2013). Existem exceções, como o trabalho de Barros et al. (2017), que obteve proporção de 1:3,1 (fêmea:macho), em população de *Amazona aestiva* em cativeiro. Acredita-se que a proporção 1:1 das aves em cativeiro, reflete a proporção das aves em vida livre (ANTAS et al., 2010).

Acredita-se que a proporção sexual em *A. chloropterus* aqui encontrada, beneficia a conservação desta espécie, uma vez que favorece a formação de pares sociais heterossexuais. Esse padrão aumenta a probabilidade de formação de pares reprodutivos, o que por sua vez pode gerar descendentes e perpetuar a espécie. Porém, vale ressaltar que a não formação de par ou a formação de pares sociais homossexuais, não necessariamente limita a reprodução na estação reprodutiva, tendo em vista a comprovada, mesmo que em baixa frequência, poligamia genética em psitacédeos. Nesse sistema, de monogâmia social e poligamia genética, o acasamento pode ocorrer extra-par; geralmente envolvendo fêmea acasalando com macho que não seja o seu par social. Além disso, pares sociais macho-macho de psitacédeos de vida livre, têm registrado separação para priorizar pareamento com fêmea livre, formando assim par reprodutivo (BEISSINGER, 2008). Dessa forma, acredita-se, que a simples disponibilidade de fêmeas e machos, que a proporção 1:1 oferece, já beneficia a conservação da espécie; visto que mesmo em cenários de não formação de pares sociais heterossexuais, os indivíduos estarão disponíveis para reprodução.

Outros trabalhos visando a determinação da proporção sexual de aves em cativeiro foram desenvolvidos exclusivamente com populações de araras (considerando araras os gêneros *Ara*, *Anodorhynchus* e *Cyanopsitta*). Pereira et al. (2021) desenvolveu trabalho com população cativa de 23 indivíduos de *A. ararauna*, obtendo proporção próxima a 1:1 entre os sexos. Franco-Gutiérrez et al. (2017) avaliaram aves em cativeiro de 6 espécies do gênero *Ara*, dentre os 33 indivíduos examinados 1 era de *A. chloropterus*, a proporção sexual encontrada foi de 1:1,5 (fêmea:macho). Vieira (2019) avaliou aves cativas de três espécies do gênero *Ara* (*A. chloropterus*, *A. ararauna* e *A. macao*) sendo que dos 17 animais avaliados apenas 1 era arara-vermelha; neste trabalho foi observada proporção entre os sexos próxima a 1:1. Lima (2014), em estudo com 50 indivíduos de *Anodorhynchus hyacinthinus* (arara-azul-grande) em cativeiro, também obteve proporção sexual próxima a 1:1.

Estudos com populações de araras de vida livre são mais escassos. Furtado et al. (2008) avaliaram 91 filhotes de *A. hyacinthinus* de vida livre nascidos durante quatro estações reprodutivas (2003-2006) no Pantanal de Miranda-MS e

obtiveram proporção sexual de 1:1,4 (macho:fêmea). Antas et al. (2010) avaliaram durante 7 temporadas reprodutivas (2001-2007) a proporção sexual entre os filhotes de *A. hyacinthinus* de vida livre nascidos na RPPN SESC Pantanal-MS e registraram o nascimento de 105 indivíduos; durante os anos de avaliação observaram altas variações na proporção sexual, dependendo da estação reprodutiva nasciam mais machos ou mais fêmeas, porém, ao final do estudo somando os valores obtidos em todos os anos puderam perceber o nascimento de machos e fêmeas de maneira igualitária (1:1). Ambos os estudos aqui citados com araras de vida livre, ocorreram na mesma região, com a mesma espécie e com sobreposição do tempo de estudo. O trabalho de Antas et al. (2010) avaliou por um período maior, que inicia antes e finaliza depois do trabalho desenvolvido por Furtado et al. (2008). Considerando o estudo com maior tempo de avaliação, pode-se afirmar que a proporção sexual para araras de vida livre *A. hyacinthinus*, mantém-se em torno de 1:1. Não há elementos que levam a acreditar que tal proporção não se estende às outras espécies de araras.

Não foram encontrados estudos de determinação da proporção sexual em população de *A. chloropterus*. Os trabalhos produzidos incluindo a arara-vermelha, geralmente apresentam poucos indivíduos da espécie, não sendo ela o foco do estudo; por vezes a sexagem desse ou desses poucos indivíduos não é mencionada individualmente. Portanto, o presente trabalho trata-se do primeiro estudo a descrever a proporção sexual em população de *A. chloropterus*.

Alguns trabalhos envolvendo observação comportamental prolongada de psitacídeos e suas relações, observaram os comportamentos que seguem. Favoretto (2016) observou os seguintes comportamentos sócio-afiliativos entre os pares de arara-azul-de-lear (*Anodorhynchus leari*, Psittacidae): (i) alimentação conjunta no mesmo cocho, (ii) aproximação na posição empoleirada, (iii) chamar atenção do parceiro, (iv) contato de bico e línguas, (v) segurar pés (como se estivessem de "pés dados"), (vi) furtar objeto que o parceiro está interagindo, (vii) *allopreening* (limpeza das penas de difícil acesso) e (viii) *mutual allopreening* (limpeza nas penas da cloaca). Uribe (1982) a partir de estudo etológico de *A. ararauna* (arara-canindé) e *A. macao* (aracanga) observou os comportamentos sócio-afiliativos que seguem: (i) *allopreening*, (ii) *mutual allopreening*, (iii) apoiar o bico fechado, a asa aberta ou a garra aberta, como um carinho sobre o corpo do parceiro, (iv) cruzamento de bicos e (v) aproximação. Prestes (2000) descreveu o etograma de *Amazona pretrei* (papagaio-charão, Psittacidae) em cativeiro e observou as seguintes características sócio-afiliativas: (i) aproximação, (ii) *allopreening* e (iii) solicitar e passar o alimento. Schneider et al. (2006), em trabalho com arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*, Psittacidae) de vida

livre em período reprodutivo, documentaram os seguintes comportamentos sócio-afiliativos: (i) *allopreening*, (ii) *mutual allopreening* e (iii) aproximação seguida de bicada, uma forma de brincadeira entre o par. Além disso, neste último estudo, também foi observada defesa por intimidação e ataque, incluindo vocalização e voo em direção ao animal invasor que se aproximou do ninho onde o par se encontrava.

Em ambos os possíveis pareamentos sociais de araras-vermelhas indicados no presente trabalho (Indivíduos 4 e 5 e Indivíduos 6 e 7), foram observados três dos oito comportamentos sócio-afiliativos descritos por Favoretto (2016), dois dos três descritos por Prestes (2000), três dos cinco observados por Uribe (1982) e um dos três visualizados por Schneider et al. (2006). Também vale ressaltar, a semelhança entre o comportamento de defesa do ninho por intimidação e ataque, na presença de animais invasores, registrado por Schneider et al. (2006), e o comportamento de intimidação e ataque dos pares de araras-vermelhas aqui estudados. O que ocorreu aqui, quando o parceiro foi manipulado pelos técnicos no momento da coleta do sangue.

Todos os comportamentos observados no presente trabalho, indicam fortemente a formação dos dois pares aqui sugeridos. Acredita-se que com uma investigação mais exaustiva seria possível a observação de (i) mais comportamentos indicativos do pareamento entre os indivíduos aqui apontados como pares e (ii) comportamentos indicativos da formação de pares entre outros indivíduos da amostra estudada. É provável que o levantamento da formação de 2 pares na amostra aqui estudada esteja subestimado, visto que o tempo de observação etológica foi curto. Considerando a escassez de informação específica para a espécie, estudos mais aprofundados dos comportamentos entre os pares de *A. chloropterus* são necessários.

Conclusão

O presente trabalho concluiu que a metodologia de sexagem molecular de *A. chloropterus* empregada foi eficaz, com 100% de resultados conclusivos. Tal metodologia possui bom custo benefício; considerando eficácia, baixo custo financeiro, simplicidade técnica e baixo estresse e risco para os animais envolvidos. A proporção entre os sexos encontrada, de aproximadamente 1:1, indica uma proporção próxima ao esperado em populações de *A. chloropterus* de vida livre. Tal proporção auxilia na conservação das espécies, uma vez que favorece a formação de pares sociais heterossexuais, tanto em cativeiro, quanto em vida livre. Esse é o primeiro estudo a descrever a proporção sexual em população de *A. chloropterus*. Por fim, acredita-se que os dados obtidos neste estudo podem auxiliar nas medidas de conservação desta espécie.

Agradecimentos

Ao Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia, pelo suporte. Ao CETAS de Porto Seguro por ter aberto as portas para este trabalho e todos os técnicos que auxiliaram na coleta. A UFBA, pela concessão de bolsa ligada ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (Pibic). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa ligada ao Pibic. A Pró-Reitoria de Assistência Estudantil da UFBA (PROAE), pela concessão de bolsa ligada ao Programa Permanecer. Aos biólogos Bernardo Mirabal Santos, Douglas Campos Pereira e Antonio Iderval Sodrê Neto.

Referências

- ÁGH, N.; KOVÁCS, S.Z.; NEMESHÁZI, E.; SZABÓ K. Univerzális, ivarhatározáshoz használt CHD1 markerek alkalmazhatósága különböző madárrendekben. *Magyar állatorvosok lapja*, v.140, n.1, p.47-59, 2018.
- ALLGAYER, M.D.C.; CZIULIK, M. Reprodução de psitacídeos em cativeiro. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, n.3, p.344-350, 2007.
- ANTAS, P.T.Z.; CARRARA, L.A.; YABE, R.S.; UBAID, F.K.; OLIVEIRA-JÚNIOR, S.B.; VASQUES, E.R.; FERREIRA, L.P. *Conhecendo o Pantanal 6: A arara-azul na Reserva Particular do Patrimônio Natural SESC Pantanal*. Rio de Janeiro: SESC, Departamento Nacional, 2010, 178 p.
- BAHIA. Portaria SEMA nº 37 de 15 de agosto de 2017. Torna pública a Lista Oficial das Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção do Estado da Bahia. *Diário Oficial do Estado da Bahia*: Salvador, BA, 16 ago. 2017.
- BARROS, T.B.; FRAGA, R.E.; RAMOS, C.N.; TOMAZI, L. Improvement of the Molecular Sexing of Parrots in the State of Bahia. *Acta Biológica Paranaense*, v.46, n.3-4, p.89-107, 2017.
- BEISSINGER, S. R. Long-term studies of the Green-rumped Parrotlet (*Forpus passerinus*) in Venezuela: hatching asynchrony, social system and population structure. *Ornitologia Neotropical*, v.19, p.73-83, 2008.
- BOSNJAK, J.; STEVANOVIĆ-PAVLOVIĆ, M.; VUCICEVIĆ, M.; STEVANOVIĆ, J.; SIMEUNOVIĆ, P.; RESANOVIĆ, R.; STANIMIROVIĆ, Z. Feasibility of non-invasive molecular method for sexing of parrots. *Pakistan Journal of Zoology*, v.45, n.3, p.715-720, 2013.
- BRASIL. Instrução Normativa ICMBio nº 23, de 31 de dezembro de 2014. Define as diretrizes e os procedimentos para a destinação de animais silvestres apreendidos, resgatados por autoridade competente ou entregues voluntariamente pela população, bem como para o funcionamento dos Centros de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA - CETAS. *Diário Oficial da União*: seção 1, Brasília, DF, p. 115-118, 02 jan. 2015.
- CAPARROZ, R.; MIYAKI, C.Y.; BAKER, A.J. Genetic evaluation of the mating system in the blue-and-yellow macaw (*Ara ararauna*, Aves, Psittacidae) by DNA fingerprinting. *Genetics and molecular biology*, v.34, n.1, p.161-164, 2011.
- DEL PUERTO, F.; PÉSOLE, D.; MOLINA, S.; VERA, K.; ARIAS, M.; SOSA, J.; ORTIZ, M.L.; FERNÁNDEZ, J.; GARAY, A. Identificación molecular del sexo en 9 especies de aves del Centro de Investigación en Animales Silvestres de la hidroeléctrica de ITAIPU, lado paraguayo. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, v.15, n.3, p.89-92, 2017.
- DESTRO, G.F.G.; PIMENTEL, T.L.; SABAINI, R.M.; BORGES, R.C.; BARRETO, R. *Efforts to combat wild animals trafficking in Brazil*. In: LAMEED, G.A. (ed.) Biodiversity enrichment in a diverse world. Londres: IntechOpen, 2012, p. 421-436.
- FAVORETTO, G.R. Comportamento de arara-azul-de-lear (*Anodorhynchus leari*, Bonaparte, 1856) em cativeiro e a influência da técnica flocking na interação de pares. 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Fundação Parque Zoológico de São Paulo - Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, SP, Brasil, 2016.
- FRANCO-GUTIÉRREZ, L.J.; ÁLVAREZ-CARDONA, J.; SOTO-CALDERÓN, I.D. Sex identification of neotropical macaws (*Ara spp.*) from invasive and non-invasive samples. *Ornitologia Colombiana*, n.16, eNB03, p.01-07, 2017.
- FRIDOLFSSON, A.-K.; ELLEGREN, H. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of avian biology*, v.30, n.1, p.116-121, 1999.
- FURTADO, T.C.; GUEDES, N.M.R.; PASSOS, D.T.; WEIMER, T.A.; SILVEIRA, F.; ALLGAYER, M.C. Avaliação hematológica e bioquímica de filhotes de arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*) no Pantanal-MS. *Revista de Iniciação Científica da ULBRA*, n.7, p.11-20, 2008.
- GODOY, S.N. Patologia comparada de passeriformes oriundos do tráfico: implicações na soltura. 2006. 109 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil, 2006.
- GRANDO, A.P. Utilização de tomografia por ressonância magnética nuclear para sexagem de aves silvestres sem dimorfismo sexual. 2002. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil, 2002.
- GRIFFITHS, R.; DAAN, S.; DIJKSTRA, C. Sex identification in birds using two CHD genes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v.263, p.1251-1256, 1996.
- IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). *Centros de Triagem de Animais Silvestres (Cetas)*. 2017. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/composicao/quem-e-quem/centros/cetas#cetas-ba>. Acesso em: 9 mar. 2021.
- IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). *Cetas em Porto Seguro/BA completa 10 anos*. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/noticias/2020/cetas-em-porto-seguro-ba-completa-10-anos>. Acesso em: 9 mar. 2021.
- IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza). *The IUCN Red List of Threatened Species*. v.2020-3. 2021. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/species/22685566/93080287>. Acesso em: 22 mar. 2021.
- LIMA, F.R. Arara-azul-grande (Psittaciformes, Aves): informações genéticas para a conservação e o manejo em cativeiro. 2014. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Biológicas e Saúde - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, 2014.
- MAHESHKUMAR, G.; SARAVANAN, R.; MANI, K.; MURALI, N. Molecular marker based sex identification in ratite and non-ratite type of birds: A comparative study. *Indian Veterinary Journal*, v.94, n.5, p.11-13, 2017.
- MIYAKI, C.Y.; DUARTE, J.M.B.; CAPARROZ, R.; NUNES, A.L.V.; WAJNTAL, A. Sex identification of south american parrots (Psittacidae, Aves) using the human minisatellite probe 33.15. *The Auk*, v.114, n.3, p.516-520, 1997.
- MONGE, O.; DUMAS, D.; BAUS, I. Environmental DNA from avian residual saliva in fruits and its potential uses in population genetics. *Conservation Genetics Resources*, v.12, p.131-139, 2018.
- NEVES, J.P. Estudo da prevalência de *Mycoplasma spp.* em psitacídeos de dois criadouros do Distrito Federal. 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil, 2013.
- OLIVEIRA-MARQUES, A.R. Filogenia molecular das espécies do gênero *Ara* (Psittaciformes, Aves). 2006. 52 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, 2006.

- ONG, A.H.K.; VELLAYAN, S. An evaluation of CHD-Specific primer sets for sex typing of birds from feathers. *Zoo Biology*, v.27, n.1, p.62-69, 2008.
- PEREIRA, D.C.; MIRABAL, B.; FRANÇA, A.M.M.; ANTONIO, E.S.; FRAGA, R.E.; TOMAZI, L. Molecular sexing in the formation of pairs of blue-and-yellow macaw (*Ara ararauna*) in reintroduction programs. *Research, Society and Development*, v.10, n.10, p.570101019330, 2021.
- PRESTES, N.P. Descrição e análise quantitativa do etograma de *Amazona pretrei* em cativeiro. *Ararajuba*, v.8, n.1, p.25-42, 2000.
- RAMOS, C.N.; BARROS, T.B.; ANTONIO, E.S.; MIRABAL, B.; SILVA, M.B.; FRAGA, R.E.; TOMAZI, L. Sexing as a tool for reinsertion of *Amazona aestiva* parrots to nature: use of less invasive technique. *Research, Society and Development*, v.10, n.12, p.e380101220601, 2021.
- RASO, T.F.; WERTHER, K. Sexagem cirúrgica em aves silvestres. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56, n.2, p.187-192, 2004.
- RODRÍGUEZ-MAHECHA, J.V.R.; SUÁREZ, F.R.; ARZUZA, D.E.; HERNÁNDEZ, A.G. *Loros, Pericos & Guacamayas Neotropicales*. Bogotá: Conservación Internacional, Panamericana Formas e Impresos, 2005, 148 p.
- RUSSELLO, M.A.; AMATO, G. Application of a noninvasive, PCR-based test for sex identification in an endangered parrot, *Amazona guildingii*. *Zoo Biology*, v.20, n.1, p.41-45, 2001.
- SCHNEIDER, L.; SERBENA, A.L.; GUEDES, N.M.R. Behavioral categories of Hyacinth Macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) during the reproductive period, at South Pantanal, Brazil. *Revista de Etologia*, v.8, n.2, p.71-80, 2006.
- SICK, H. *Ornitologia brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997, 912 p.
- SMITH, L.M.; BURGOYNE, L.A. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA® databasing paper. *BMC ecology*, v.4, p.1-11, 2004.
- TOMASULO, A.M.; DEL LAMA, S.N.; ROCHA, C.D. Molecular method of sexing waterbirds without DNA extraction. *Waterbirds*, v.25, n.2, p.245-248, 2002.
- URIBE, F. Quantitative ethogram of *Ara ararauna* and *Ara macao* (Aves, Psittacidae) in captivity. *Biology of Behaviour*, v.7, p.309-323, 1982.
- VIEIRA, B.T. Determinação do sexo em araras (*Ara ararauna*, *A. macao* e *A. chloropterus*) por ensaio imunoenzimático de metabólitos de esteróides sexuais a partir de excretas. 2019. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil, 2019.
- VIEIRA, J.N.; COELHO, E.G.A.; OLIVEIRA, D.A.A. Sexagem molecular em aves silvestres. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.33, n.2, p.66-70, 2009.
- VIEIRA, J.N.; COELHO, E.G.A.; TEIXEIRA, C.S.; OLIVEIRA, D.A.A. PCR como técnica para sexagem molecular em aves. *Revista brasileira de Reprodução Animal*, v.36, n.3, p.199-201, 2012.
- VUCICEVIC, M.; STEVANOV-PAVLOVIC, M.; STEVANOVIC, J.; BOSNJAK, J.; GAJIC, B.; ALEKSIC, N.; STANIMIROVIC, Z. Sex determination in 58 bird species and evaluation of CHD gene as a universal molecular marker in bird sexing. *Zoo biology*, v.32, n.3, p.269-276, 2012.