

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Avaliação hormonal em fêmea de miqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus* –
Wied, 1820) *ex situ***

Hallana Couto e Silva
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

HALLANA COUTO E SILVA

**Avaliação hormonal em fêmea de miquiqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus* –
Wied, 1820) *ex situ***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Fabiana C. S. A. de Melo

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586a
2025
Silva, Hallana Couto e, 1995-
Avaliação hormonal em fêmea de muriqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus* – Wied, 1820) *ex situ* / Hallana Couto e Silva. – Viçosa, MG, 2025.
1 dissertação eletrônica (46 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Orientador: Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Animal, 2025.

Referências bibliográficas: f. 40-45.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.819>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Primatas. 2. Progesterona. 3. Hormônio luteinizante.
4. Primatas - Comportamento sexual. I. Melo, Fabiana Cristina Silveira Alves de, 1976-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. III. Título.

CDD 22. ed. 599.858

HALLANA COUTO E SILVA

Avaliação hormonal em fêmea de muriqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus* – Wied, 1820) *ex situ*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 10 de setembro de 2025.

Assentimento:

Hallana Couto e Silva
Autora

Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo
Orientadora

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 13/01/2026 às 09:12:49 e pela orientadora em 13/01/2026 às 09:21:23. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **BQL6.7IRT.XMKY** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por entender a ausência e por me receberem de braços abertos com tanto afeto a cada encontro. Agradeço à minha mãe Margarida Maria do Couto Silva por ser minha inspiração há 30 anos, pelas revisões, pelas novenas feitas repletas de fé e pelo amor incondicional. Ao meu pai Ronaldo Martins da Silva agradeço por compartilhar o interesse e respeito pela natureza, pelos ensinamentos e pelo amor incondicional. Ao meu irmão, Hudson Couto e Silva, agradeço pelo ombro amigo, pelo apoio e proteção. Amo vocês. Ao Marco Túlio Albuquerque agradeço por sonhar comigo, por ser lar, pelas habilidades em excel, pelo amor recíproco e bom humor. À minha cunhada Glaucia Mendes pela parceria com meu irmão e nossa família. Aos meus Tios Renato, Maria, Rosilene, Mônica e Bruno pelo apoio e compreensão. Agradeço aos meus sogros e cunhadas, Auxiliadora, Sandoval, Tana e Carolina pelo apoio e afeto.

À minha melhor amiga Luianny por sonhar comigo todos meus sonhos. À Valéria por ser a mestra que me aconselhou na jornada e nos conhecimentos dos muriquis. À Izabela pela presença, pelo conforto e acolhimento. Ao João Velozo pelo apoio constante e pela amizade sincera. Aos amigos da vida toda João Carlos, Leonardo, Raphael, João Vitor, Victor, Vinícius, Guilherme, Hondemberg, Heron e Marquinhos. Aos amigos Cris, Bruno, Babi, Angel, Inaiá e Thalia, amo vocês. Agradeço ao apoio e compreensão dos amigos, Igor e família, Bianca, Victor e Douglas. Aos meus amigos e irmãos do GRABH, pelo apoio e aprendizado constante, amo vocês. Paloma e Daniele pela amizade e parceria longa. Ao Prof. Aldair pelo carinho e apoio de sempre. À Duda pela amizade, pela parceira e pela dedicação com esse trabalho, juntas seguimos. Agradeço ao Orlando pelo apoio, contribuição e amizade. Ao Felipe pelo aprendizado, conselhos e bom humor. Aos amigos do CCSS, minha dose diária de inspiração. Agradeço a toda equipe do Mulheres Pela Primatologia pela força, inspiração e apoio.

E assim agradeço às instituições que foram grandes parceiras nesse projeto, em especial ao Muriqui's House e à MIB, por disponibilizar o espaço, os dados, por abrir as portas e pela Grotinha. À Cleusinha, por ter sido uma amiga tão importante e pelo seu trabalho que me deu tanta força. À Priscila pelo apoio e incentivo durante toda a jornada. Agradeço a dupla Carol e Fê Machado pela troca e apoio. Agradeço ao Laboratório de Fruticultura da UFV por ceder o espaço e equipamento. Agradeço à Profa. Dra. Bruna de Freitas pelo apoio e parceria, ceder material e equipamento. Agradeço ao Laboratório de Ecofisiologia dos Quirópteros pelo apoio primordial nesse projeto, à Coorientadora Dra. Mariella por compartilhar,

espaço, equipe, tempo e conhecimento. Sem o LEQ-UFV e equipe esse trabalho não seria possível. Agradeço ao Centro de Conservação de Sagui-da-Serra e ao Laboratório MeCFauna por todo apoio, ao Coorientador Dr. Fabiano de Melo pelas oportunidades, dedicação e pelo apoio. À Dra. Fabiana Melo por ser orientadora desse projeto, pelo apoio, paciência, ética e postura profissional admiráveis. Obrigado por acreditarem. Agradeço a parceria e recursos disponibilizados pelo IBITI Projeto, bem como ao Fundo Brasileiro para a Biodiversidade (FUNBIO). Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ao Odin, o miqui-do-norte que em uma breve vida transformou tão intensamente outras vidas, humanas e animais. Meus mais sinceros agradecimentos pela sua existência Odin. À Ecológica, por disponibilizar excelentes amostras diariamente e claro à Socorro, Eliot, Bertolino, Luna, Nena e Morfeu pela experiência e ensinamentos maravilhosos. Todo meu respeito e empatia pelos miquis.

RESUMO

SILVA, Hallana Couto e, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2025. **Avaliação hormonal em fêmea de muriqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus* – Wied, 1820) *ex situ***. Orientadora: Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo.

Os muriquis-do-norte são primatas classificados como criticamente em perigo de extinção. A principal ameaça à espécie consiste na perda de habitat, a fragmentação da floresta Mata Atlântica. Neste sentido, o comportamento migrante das fêmeas muitas vezes resulta em isolamento. Assim, manejos *in situ* e *ex situ* são fundamentais para manutenção da espécie. O manejo *ex situ* da espécie é realizado com um único grupo presente em um cativeiro exclusivamente adaptado para a espécie, conhecido como Muriqui's House. Até o momento, apenas um indivíduo nasceu dentro de um intervalo de 6 anos. Cabe ressaltar que os machos manejados e que formam este grupo social apresentam desafios para performar cópulas assertivas por questões comportamentais e de idade. Pensando nestes desafios, analisamos o perfil reprodutivo de uma fêmea de muriqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus*) *ex situ*. Durante o período de 2020 a 2021, selecionamos dados comportamentais *a priori*, além disso, também coletamos dados comportamentais durante o período de coleta urina e fezes de uma fêmea adulta primípara durante 30 dias consecutivos em 2024. Aplicamos a metodologia animal focal para a fêmea simultaneamente às coletas de amostras biológicas em março e abril de 2024. Para análises hormonais, utilizamos Kits comerciais ELISA específicos para identificação de hormônio luteinizante urinário e progesterona fecal, respectivamente. As análises retrospectivas dos anos de 2020 e 2021 de duas fêmeas de muriqui-do-norte cativas foram conduzidas com o objetivo de verificar a consistência temporal dos padrões cíclicos comportamentais previamente identificados. Essa abordagem permitiu avaliar a reprodutibilidade dos ciclos e fortalecer inferências sobre sua relação com processos fisiológicos concomitantes. Em nossas coletas no ano de 2024, nas três variáveis analisadas (progesterona fecal, LH urinário e comportamento sexual), identificamos picos e ciclicidade no comportamento reprodutivo da fêmea estudada. Encontramos correlação entre a combinação dos hormônios avaliados e o comportamento, corroborando com nossas hipóteses, esse resultado sugere forte influência hormonal ao comportamento sexual. Os resultados deste trabalho objetivam auxiliar a equipe e os tomadores de decisão acerca do futuro dos indivíduos residentes do Muriqui's House, além de ser possível contribuir para novas medidas de manejo reprodutivo da espécie

em cativeiro.

Palavras-chave: primatas; progesterona; hormônio luteinizante; comportamento sexual

ABSTRACT

SILVA, Hallana Couto e, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2025. **Hormonal evaluation in female northern muriqui (*Brachyteles hypoxanthus* – Wied, 1820) *ex situ***. Adviser: Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo.

Northern muriquis are primates classified as critically endangered. The main threat to the species is habitat loss, that is, the fragmentation of the Atlantic Forest. In this sense, the dispersal of females results in the isolation. Therefore, *in situ* and *ex situ* management are essential for the species' maintenance. *Ex situ* management of the species is carried out with a single group in a captivity exclusively adapted for the species, known as Muriqui's House. Only one individual has been born within a 6-year interval. It should be noted that the males managed and forming this social group present challenges for performing assertive copulations due to behavioral and age-related reasons. Considering these challenges, we analyzed the reproductive profile of a northern muriqui female (*Brachyteles hypoxanthus*) *ex situ*. During the period 2020 to 2021, we selected behavioral data; in addition, we also collected behavioral data during the urine and feces collection period of an adult primiparous female for 30 consecutive days in 2024. We applied the focal animal sampling method to the female simultaneously with the biological sample collections in March and April 2024. For hormonal analyses, we used commercial ELISA kits specifically for identifying urinary luteinizing hormone and fecal progesterone, respectively. Retrospective analyses of the years 2020 and 2021 of two captive northern muriquis females were conducted to verify the temporal consistency of previously identified behavioral cyclic patterns. This approach allowed us to evaluate the reproducibility of the cycles and strengthen inferences about their relationship with concomitant physiological processes. In our 2024 collections, in the three variables analyzed (fecal progesterone, urinary LH, and sexual behavior), we identified peaks and cyclicity in the reproductive behavior of the studied female. We found a correlation between the combination of the hormones assessed and the behavior, corroborating our hypotheses; this result suggests a strong hormonal influence on sexual behavior. The results of this work purpose to assist the team and decision-makers regarding the future of the individuals resident at Muriqui's House, and may also contribute to new reproductive management measures for the species in captivity.

Keywords: primates; progesterone; luteinizing hormone; sexual behavior

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	OBJETIVOS	14
2.1.	Objetivos Gerais	14
2.2.	Objetivos Específicos	14
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1.	Área de estudo	15
3.2.	Animais do estudo	16
3.2.1.	ECO-S	16
3.2.2.	SOC-S.....	17
3.3.	Seleção de dados comportamentais retrospectivos (ECO-S e SOC-S).....	18
3.4.	Coleta de dados comportamentais da fêmea ECO-S	18
3.5.	Coleta de material biológico (ECO-S).....	19
3.5.1.	Urina.....	19
3.5.2.	Coleta de Fezes.....	22
3.6.	Ensaio Hormonais	22
3.6.1.	Teste da Fita de Ovulação	23
3.6.2.	Ensaio hormonal: Hormônio Luteinizante	23
3.6.3.	Extração de esteroides através de sólidos	25
3.6.4.	Ensaio hormonal: Progesterona.....	27
3.7.	Análises Estatísticas.....	27
4.	RESULTADOS	28
4.3.1.	Estudo comportamental retrospectivo (ECO-S e SOC-S).....	28
4.3.2.	Dados comportamentais da fêmea ECO-S	31
4.3.3.	Material biológico	32
4.3.4.	Teste da Fita de Ovulação	33

4.3.5. Influência hormonal no comportamento sexual	33
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a família de primatas Atelidae é representada pelas duas subfamílias Alouattinae e Atelinae, divididas em quatro gêneros: *Alouatta*, *Ateles*, *Brachyteles* e *Lagothrix* (Abreu *et al.*, 2022). O gênero *Brachyteles* compreende duas espécies: *Brachyteles hypoxanthus* (Wied, 1820) - o miquiqui-do-norte e *Brachyteles arachnoides* (E. Geoffroy Saint-Hilaire, 1806) - o miquiqui-do-sul (Chaves *et al.*, 2019). Dentre as diferenças morfológicas destas espécies estão principalmente a despigmentação facial e genital, além da presença de um polegar vestigial nos miquiquis-do-norte (Lemos de Sá *et al.*, 1990; Strier, 1999). Há também distinção na distribuição geográfica das espécies, sendo que o miquiqui-do-norte é encontrado nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, norte do Rio de Janeiro e extremo sul da Bahia, enquanto o miquiqui-do-sul ocorre nos estados do Rio de Janeiro, Paraná, Minas Gerais e São Paulo (Strier *et al.*, 2017, Colas-Rosas *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2025).

Os miquiquis são primatas endêmicos da Mata Atlântica (Chaves *et al.*, 2011), considerados os maiores primatas neotropicais, atingem em média 1,37m de altura e 9,30kg (Jerusalinsky *et al.*, 2011, Lemos de Sá *et al.*, 1993). Possuem cauda preênsil capaz de sustentar toda massa corpórea dos indivíduos durante a alimentação, membros torácicos e pélvicos alongados e mãos em forma de gancho que favorecem a locomoção no dossel das árvores (Aguirre, 1971; Ferraz, 2013; Strier, 1999). Distinguem-se por abdome proeminente, face achatada e densa pelagem, cuja coloração varia entre as espécies: miquiquis-do-sul com tons bege a avermelhados, e miquiquis-do-norte com coloração acinzentada a ferrugínea e despigmentação facial e na genitália na fase adulta (Jerusalinsky *et al.*, 2011). Não há dimorfismo sexual evidente, sendo o sexo identificado apenas pela genitália (Aguirre, 1971; Strier, 1990, 1999).

Os miquiquis-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus*) são primatas predominante pacíficos em suas relações, tendem evitar confrontos físicos (Strier, 1990) e não há hierarquia social entre os integrantes do grupo (Strier, 1999). São animais diurnos e mantêm a maior parte do seu tempo de atividade no dossel da floresta, sendo predominantemente folívoros, também se alimentando de flores e frutos (Strier, 1991; Jerusalinsky *et al.*, 2011). Eventualmente se deslocam para o estrato inferior ou térreo para ingestão de água, sendo a maior parte da ingestão hídrica consumida através de folhas, galhos ocos e brotos de bromélias (Aguirre, 1971; Ferreira, 2022; Strier, 1999).

Os machos dos grupos de miquiqui-do-norte são filopátricos, isto é, se mantêm desde o nascimento até o óbito em seu grupo natal (Strier, 1999). A competição parental ocorre por via espermática (Strier, 1999) a partir de um tampão copulatório criado pela solidificação de

proteínas presentes na composição de seu fluido espermático (Arakaki *et al.*, 2019). É possível observar muriqui-do-norte machos se abraçando como forma de estreitar laços sociais, o que pode ser notado entre fêmeas, machos e fêmeas e mais de dois indivíduos (Strier, 1999). Trata-se de uma espécie com comportamento sexual promíscuo, portanto as fêmeas de um grupo acasalam sucessivas vezes com diferentes machos (Jerusalinsky *et al.*, 2011; Strier, 1999).

As fêmeas de muriqui-do-norte possuem clitóris proeminente (Jerusalinsky *et al.*, 2011; Strier, 1993), sendo facilmente observado na mata (Strier, 1999). Quando se aproximam da puberdade, entre 5 e 7 anos, as fêmeas migram de seu grupo natal em busca de um novo grupo onde possam estabelecer parceiros sexuais (Jerusalinsky *et al.*, 2011; Strier, 1993; Strier; Ziegler, 1997; Tabacow *et al.*, 2021). A dispersão das fêmeas ocorre na fase pré-púbere de sua vida (Strier; Ziegler, 2000). Para que possa estabelecer a concepção, é necessário que a fêmea tenha passado por alguns ciclos ovarianos, sendo que os intervalos entre as ovulações ocorrem entre 21 dias (Strier *et al.*, 2003). Uma vez gestantes, as fêmeas de muriqui-do-norte possuem gestação com duração média de 7,2 meses (Strier; Ziegler, 1997) e estarão aptas para gerar um novo filhote 3 anos depois, assim como em outros gêneros da família Atelidae (Strier, 1996; Guedes *et al.*, 2008).

A perda e fragmentação de hábitat configuram entre as principais ameaças ao muriqui-do-norte, sobretudo em função do comportamento migrante de fêmeas subadultas. Estas, ao procurar novos grupos se perdem em florestas vazias e/ou são impedidas de dispersar pela matriz antrópica, realidade atual da Mata Atlântica fragmentada na área de distribuição da espécie (Strier, 1993). Estima-se a existência de aproximadamente mil indivíduos na natureza (Melo; Dias, 2005; Strier *et al.*, 2017; Melo; Jerusalinsky, 2024). No ano de 2006, a espécie foi listada entre as 25 espécies mais ameaçadas do mundo (Mittermeier *et al.*, 2006), sendo atualmente classificados como criticamente em perigo (CR) pelo Instituto Chico de Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (Melo *et al.*, 2025). A espécie necessita prioritariamente de cuidados relativos à sua conservação, bem como medidas emergenciais de manejo *in situ* e *ex situ* (Ferraz *et al.*, 2019; Jerusalinsky *et al.* 2011; Melo *et al.*, 2021).

O estudo da fisiologia reprodutiva de animais selvagens é essencial para a conservação das espécies, pois fornece subsídios para estratégias de aumento populacional em programas de conservação *ex situ* e *in situ* (Andrabi; Maxwell, 2007; Kersey; Dehnhard, 2014). Tradicionalmente, utilizam-se amostras séricas para análises hormonais, metodologia invasiva potencialmente estressora, especialmente para pesquisa com fauna selvagem (Brown *et al.*, 2010; Goymann, 2005). São recomendados métodos não-invasivos, como coletas de excretas de animais, que reduzem o potencial estressor e possibilitam a obtenção de dados reprodutivos

confiáveis (Palme *et al.*, 2013; Robbins; Czekala, 1997). O teste de enzimaímmunoensaio (ELISA) constitui alternativa eficaz à avaliação sérica, permitindo análise hormonal em fluidos como saliva, urina e fezes (Abondano *et al.*, 2022; Shimizu, 2005). Por meio dessas metodologias, pesquisadores identificaram ciclos ovarianos dos primatas, intervalos reprodutivos, duração de gestações, ampliando o conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva (Czekala *et al.*, 1981; Strier; Ziegler 1997; Ziegler; Wittwer, 2005).

As principais informações a respeito da endocrinologia reprodutiva do miquiqui-do-norte foram estabelecidas a partir de metodologias não-invasivas (Strier; Ziegler, 1997, 2005; Strier, 2000). Outros primatas neotropicais também tiveram seu perfil hormonal avaliado através de coleta não-invasiva, como macaco-aranha (*Ateles geoffroyi*) (Campbell *et al.*, 2001), bugio (*Alouatta caraya*) (Kulgemeier, 2005) miquiqui-do-sul (*Brachyteles arachnoides*) (Bastos, 2006) e calitriquídeos (Zigler; Scott, 1986).

O hormônio luteinizante (LH) é um hormônio glicoproteico presente em machos e fêmeas, e em ambos desempenha importante função relacionada à maturação de células germinativas. Dentre as diversas funções na fisiologia das mulheres, o LH participa ativamente no processo de indução da ovulação. O aumento da excreção deste hormônio através de fluidos corporais, principalmente no soro plasmático sanguíneo e urina, é amplamente utilizado para detecção do melhor momento para iniciar as tentativas de fecundação (Nedresky; Singh, 2019; Ziegler *et al.*, 2009).

A excreção de hormônios esteroides é abundante em amostras fecais de miquiqui-do-norte quando comparada com amostras urinárias. Para a maioria dos primatas antropóides, o aumento sustentado de estrogênio precede o pico de LH e ocorre o aumento de progesterona (Ziegler *et al.*, 2009). Já nos primatas neotropicais, o aumento do estrogênio fecal ocorre no mesmo período em que foi observado o aumento da progesterona. Existem dados consistentes de que em primatas neotropicais a progesterona demonstrou ser um importante marcador da ovulação (Strier *et al.*, 2003, Strier; Ziegler, 1997; Ziegler *et al.* 1997; Ziegler *et al.* 1996, 1993).

No ano de 2019 foi fundado o primeiro cativeiro temporário para os miquiquis-do-norte, o Miquiqui's House, situado no Ibiti Projeto no município de Lima Duarte (Melo *et al.*, 2024). Possuindo área de mata nativa, proporciona um ambiente similar ao de vida livre para os indivíduos do Miquiqui's House. Para uma estrutura como esta, consideramos atrativos os estudos embasados em metodologias não-invasivas aplicados em animais de vida livre (Kersey; Dehnhard, 2014; Strier *et al.*, 2003; Sugianto *et al.*, 2021).

Neste contexto, reforçamos a importância de compreender parâmetros reprodutivos, bem como auxiliar na reprodução de espécies ameaçadas como ferramenta fundamental para sua

manutenção. Na maioria das espécies de mamíferos, incluindo humanos, o pico do LH traz uma janela de oportunidade quase perfeita para inseminação das fêmeas (Comizzoli *et al.*, 2000; Dehnhard *et al.* 2008; Kersey; Dehnhard, 2014; Sugianto *et al.*, 2021). Em suma, tais pesquisas e técnicas visam facilitar o manejo da espécie, promovendo o aumento da taxa de natalidade, aspecto particularmente relevantes para o muriqui-do-norte cuja recuperação populacional é lenta (Strier; Ziegler, 1997; Tabacow *et al.*, 2021). Com o crescimento das populações mantidas *ex situ*, ampliam-se as perspectivas para projetos de reintrodução, fortalecendo as estratégias integradas de conservação (Andrabi; Maxwell, 2007, Kierulff *et al.*, 2007).

Portanto, ao avaliarmos a excreção hormonal de uma fêmea de muriqui-do-norte primípara sob cuidados humanos e ao associarmos os resultados aos comportamentos sexuais apresentados, testamos a hipótese de que as condições de cativeiro alteram os picos hormonais de fêmeas nestas condições de estresse. Baseamos nossas análises em metodologias estabelecidas na Reserva Particular do Patrimônio Natural Feliciano Miguel Abdala, onde são realizadas pesquisas sobre a espécie há mais de quarenta anos (Strier; Ziegler, 1997; Ziegler *et al.*, 1997; Strier *et al.*, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Realizar análise hormonal de uma fêmea primípara de muriqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus*) em cativeiro.

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Coletar amostras biológicas através de método não-invasivo de uma fêmea para avaliar hormônios reprodutivos;
- 2) Aplicar teste comercial de ovulação para pico de LH em mulheres para uso em primatas não-humanos;
- 3) Realizar teste laboratorial específico para identificação de LH urinário;
- 4) Realizar teste laboratorial específico para identificação de progesterona fecal;
- 5) Comparar os resultados hormonais e de comportamento sexual apresentado no mesmo período;

- 6) Detectar presença de padrões comportamentais em dados retrospectivos de duas fêmeas adultas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Área de estudo

O Muriqui's House está localizado em uma área cedida pelo IBITI Projeto, no município de Lima Duarte, Minas Gerais (Melo *et al.*, 2024). Predominantemente inserido na Mata Atlântica, a vegetação é caracterizada por fitofisionomias campestres, florestas estacionais semidecíduas e florestas ombrófilas, sendo que uma parte significativa da vegetação se encontra em processo de regeneração (IEF, 2011).

O cativeiro tem uma área de extensão de 5 hectares (ha), destes, 1,8ha são de mata nativa em regeneração onde os animais podem se alimentar (Figura 1). Dentro desta área há um recinto de aclimatação com as dimensões: 7,0 m de altura; 20,0 m de comprimento; 8,0 m de largura (Figura 2). O local conta com espaço de trabalho para os pesquisadores e cozinha de uso exclusivo para preparo da dieta suplementar dos animais. Toda área do Muriqui's House é limitada por um alambrado com 3 metros de altura e uma cerca com recurso de eletricidade com voltagem de 8.000 a 10.000 Volts para evitar a fuga dos animais.

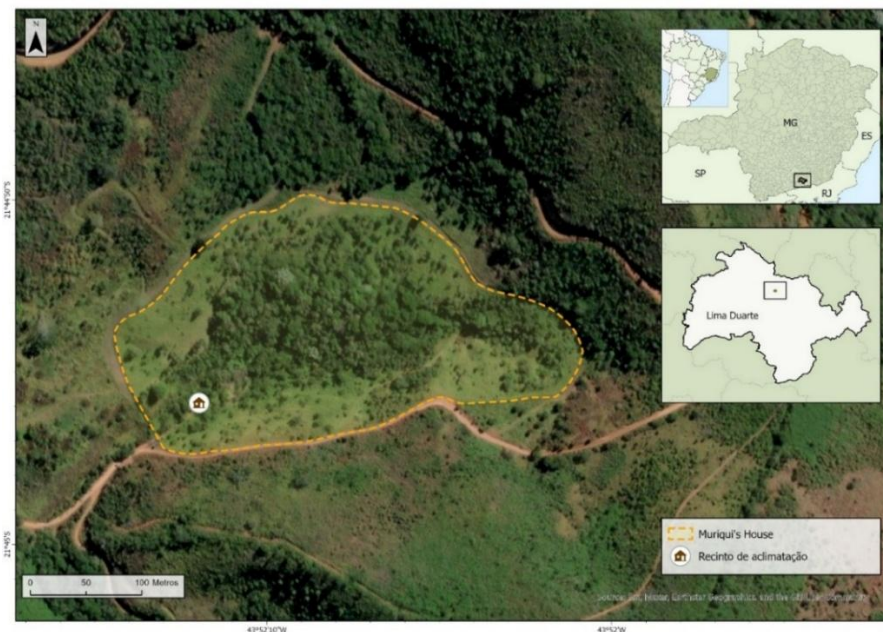


Figura 1. Mapa representativo da área do Muriqui's House e entorno, no município de Lima Duarte, Minas Gerais. Fonte: Orlando Vital, 2025.



Figura 2. Vista aérea do recinto de aclimação do Muriqui's House. Fonte: Fabiano de Melo, 2025.

Todos os dias são ofertados aos muriquis cativos uma dieta suplementar com frutas, legumes e hortaliças. Os alimentos são servidos em plataformas de alimentação com média de altura de 3 metros do solo. Todos os alimentos, superfícies e vasilhames do cativeiro passam pelo processo de higienização e são manuseados por profissionais que utilizam equipamentos de proteção individual durante todo o processo, como luvas, máscaras, botas e aventais.

A rotina de trabalho do Muriqui's House inclui aplicação de técnicas de condicionamento animal com o objetivo de promover bem-estar aos indivíduos e potencializar as ações de manejo *ex situ*. Durante nossos estudos haviam dois machos alojados no recinto de aclimação, sendo um jovem e um idoso. Os demais muriquis-do-norte habitavam a área de mata nativa, sendo duas fêmeas adultas (ECO-S e SOC-S), uma fêmea subadulta, um macho adulto e um macho jovem (o único indivíduo nascido no cativeiro).

3.2. Animais do estudo

3.2.1. ECO-S

ECO-S (Figura 3A) é uma fêmea adulta de muriqui-do-norte originária da Mata do Sossego, em Simonésia – Minas Gerais. Aos oito anos de idade, ao migrar em busca de um novo grupo e parceiros sexuais, ficou isolada em fragmentos de matas vizinhas. ECO-S passou a viver solitária, quando então foi determinado seu encaminhamento para o cativeiro Muriqui's

House (Tabacow *et al.*, 2021; Melo *et al.*, 2024). A captura da fêmea ocorreu em março de 2019 e esta passou a ocupar o recinto de aclimatação. ECO-S permaneceu 11 meses neste recinto com os demais indivíduos que foram adicionados ao plantel ao longo tempo. Em janeiro de 2020, após adaptação e interação dos quatro indivíduos residentes do recinto, foi decidida a liberação destes para a área de mata do cativeiro. Em novembro do mesmo ano, nasce o filhote de ECO-S, Eliot, o único macho da espécie nascido em condições *ex situ*.

Por tratar-se de um indivíduo aparentemente saudável e única primípara do grupo, ECO-S apresenta características promissoras para a reprodução da espécie, portanto a escolhida para avaliação hormonal em nossa pesquisa.

3.2.2. SOC-S

SOC-S (Figura 3B) é uma fêmea adulta de miquiqui-do-norte da população de Muriquis da Mata do Sossego, em Simonésia, Minas Gerais. Ao migrar de seu grupo natal, ficou isolada em um pequeno fragmento de mata cercado por monocultura de café. Viveu nessa região durante aproximadamente 10 anos e era alimentada quando avistada pelos moradores locais. Teve seu resgate e encaminhamento para o cativeiro em agosto de 2019 para integrar o novo grupo formado pelos machos BER-IB e LUN-IB e a fêmea ECO-S (Tabacow *et al.*, 2021; Melo *et al.*, 2024). Ficou com estes indivíduos no recinto de aclimatação durante quatro meses, quando então junto ao grupo foi liberada para uso da área de mata presente no cativeiro. Não há registros de concepção de SOC-S, e pouco se sabe sobre seu histórico reprodutivo. Seus períodos de exibição de comportamento sexual no Muriqui's House estão em sua maioria pareados com os ciclos da fêmea ECO-S e com duração semelhante.



Figura 3. Animais presentes no estudo: A – Fêmea ECO-S; B — Fêmea SOC-S. Fonte: Arquivo Pessoal, 2023.

3.3. Seleção de dados comportamentais retrospectivos (ECO-S e SOC-S)

A fim de buscar maiores informações a respeito dos comportamentos exibidos pela fêmea foco do estudo ECO-S, selecionamos dados de comportamentos coletados ao longo dos anos pelos pesquisadores do Muriqui's House. Para esta seleção, consideramos as fêmeas adultas ECO-S e SOC-S, sendo a última sem registro de concepção. Estabelecemos que para serem analisados os dados retrospectivos das duas fêmeas deveriam seguir a mesma metodologia aplicada em nossas coletas de comportamento em 2024 (descrita no tópico 3.4). Após filtragem dos dados entre o período de 2019 a 2022, selecionamos os dados dos anos de 2020 e 2021. Para o ano de 2020 os meses de fevereiro, março, maio, junho, e os meses entre julho e dezembro atenderam aos nossos requisitos para análise, isto é, possuíam a mesma metodologia das nossas coletas em 2024. Para o ano de 2021 os meses janeiro, abril, junho, agosto e dezembro também atenderam aos nossos requisitos. As categorias a seguir foram baseadas nos estudos de Strier (2018), onde optamos por analisar as seguintes categorias de comportamentos:

Alimentação – compreende as atividades de manusear, provar, mastigar e deglutir alimentos;

Locomoção – consiste nos movimentos que o animal faz para mudar de substrato;

Sexual – as inspeções na genitália de outro indivíduo, vocalização de acasalamento emitida pela fêmea acompanhado de bater dos dentes (*mating twitter*), bater dos dentes ou careta (*grimace*), tentativa de cópulas (quando não ocorre penetração do órgão genital do macho);

Social – conjunto de interações, de afiliação ou agonísticas, entre dois ou mais indivíduos;

Descanso – quando o animal permanece parado independentemente da posição do seu corpo.

3.4. Coleta de dados comportamentais da fêmea ECO-S

Durante o mês de março de 2024, no mesmo período em que realizamos as coletas de amostras biológicas, registramos dados comportamentais da fêmea foco do estudo (ECO-S). A metodologia que aplicamos foi Animal Focal (Altmann, 1974; Del-Claro, 2004), sendo que implementamos o Animal Focal com duração de 10 minutos de registro e 40 minutos de

intervalo. Precisávamos de no mínimo 4 registros de Animal Focal pela manhã e 4 à tarde para que os dados pudessem ser aproveitados em nossas análises. Consideramos manhã o período que compreende de 7:00 às 12:00 horas e tarde o período de 12:00 até 17:00 horas. O etograma utilizado para coleta (material suplementar) já era aplicado nas coletas de dados do Muriquis House e foi adaptado dos dados do projeto Muriqui de Caratinga (Strier, 2018). Realizamos os registros durante 30 dias consecutivos, do momento da chegada ao cativeiro no início do dia (7:00 horas) ao momento da saída no fim da tarde (17:00 horas). Na tabela de anotações, preenchíamos os campos: q identificação do animal; condição climática no momento da coleta; temperatura mínima e máxima do dia; data; nome do pesquisador; atividade do animal; posição da cauda; substrato utilizado; altura; vizinho e raio de distância do vizinho. Analisamos as mesmas categorias descritas no tópico 3.3, Alimentação, Locomoção, Sexual, Social e Descanso.

3.5. Coleta de material biológico (ECO-S)

Concentramos nossas coletas de amostras biológicas no período da manhã, de 7:00 às 11:00 horas. Porém, considerando as adversidades do ambiente cativo com presença de mata nativa, coletamos algumas amostras de forma oportuna no período da tarde. Especificamente nos dias 18, 21, 26/03 e 01/04 não conseguimos coletar no período ideal matinal, nestes dias as coletas ocorreram entre 13:00 e 15:00 horas.

3.5.1. Urina

Para realizarmos a coleta de urina na fêmea ECO-S do Muriqui's House consideramos o comportamento arborícola da espécie e a estrutura do cativeiro. Como os animais têm acesso a um fragmento de mata dentro do recinto e permanecem maior parte de seu tempo de atividade em dossel das árvores, os métodos não-invasivos de coleta de amostras biológicas aplicados *in situ* se apresentaram como alternativa adequada (Kersey; Dehnhard, 2014; Strier, 1999; Sugianto *et al.*, 2021).

A coleta de urina em primatas com hábitos arborícolas pode ser realizada com um dispositivo de haste alongada, onde o coletor fica na ponta oposta ao cesto de coleta que são separados pela haste (Gilardi *et al.*, 2015). Outra opção, usual *ex situ*, é uso de uma bandeja onde o coletor se posiciona abaixo e em direção à genitália do animal foco do estudo (Ziegler

et al.,1997). Realizamos um teste para avaliar a resposta comportamental dos animais em relação à nossa presença e do dispositivo de coleta na mata.

O objeto com haste alongada que utilizamos no teste foi um puçá de captura (Figura 4A), com haste de 100 centímetros de comprimento, cesto de 45 de diâmetro e malha de rede em nylon (Figura 4B). Para reduzir a profundidade da malha adicionamos um nó em sua extremidade (Figura 4C), reduzindo assim seu tamanho. Além disso, usamos um saco plástico branco leitoso cobrindo todo diâmetro do cesto (Figura 4D) para facilitar a coleta da urina. Realizamos o teste em dias de exibição do comportamento sexual da ECO-S, onde monitoramos o animal durante a manhã em posse do dispositivo de coleta.



Figura 4. A – Puçá para aves com haste longa; B – Cesto com malha de rede em nylon; C – Redução da profundidade do cesto com uso de um nó na ponta; D – Plástico branco leitoso envolvendo interior do cesto. Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

No mesmo dia, durante o período da tarde, realizamos o teste com o segundo dispositivo, uma bacia redonda. Esta possuía capacidade para 25 litros (Figura 5), e a envolvemos com um plástico branco leitoso para facilitar a distinção da urina que tem comumente coloração amarelada (Ferreira, 2022) (Figura 6).



Figura 5. Bacia de plástico multiuso simples com capacidade para 25 litros. Fonte: Arquivo pessoal, 2023.



Figura 6. Saco plástico branco leitoso à esquerda e à direita bacia com saco plástico ocupando todo seu interior. Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Coletamos as amostras durante 30 dias consecutivos, preferencialmente pela manhã, a partir das 7 horas e ocasionalmente ao longo do dia. Seguíamos a fêmea até conseguir a amostra (Figura 7 e 8A), que quando coletada imediatamente direcionávamos para ser manipulada, testada e armazenada.

O volume de urina que coletamos variou ao longo dos dias, seja por questões fisiológicas do indivíduo, galhos que ficavam entre o animal e bacia, densidade de folhas, posição do animal ou do recipiente de coleta. O impacto da urina ao atingir a superfície da bacia causa uma dispersão do líquido, o que resultava em diversas gotículas de urina espalhadas. Realizamos a coleta da urina com uma seringa de 3mL com agulha hipodérmica 0,55x20mm em um movimento de aspiração (Figura 7 e Figura 8B). Tal movimento nos possibilitava coletar um maior número de gotículas de urina e, conseqüentemente, maior volume final.

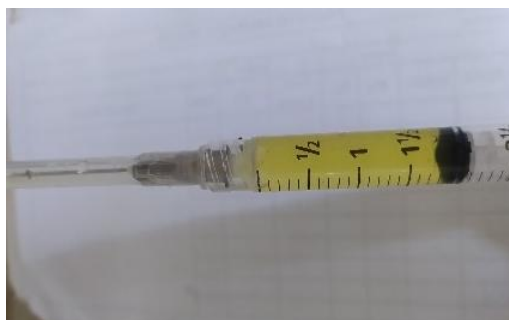


Figura 7. Seringa de 3mL com 2mL de urina coletada. Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

Adicionamos volumes totais de urina a um pote de polipropileno tipo coletor universal (Figura 8C) e realizamos inicialmente o teste de fita (descrito no tópico 3.6.1, Figuras 8D e 9). Armazenamos o sobressalente da urina em criotubos de 2 ml (Figura 8E), identificados com a sigla do indivíduo e número da amostra (Figuras 8F). Os criotubos foram armazenados em botijão criogênico abastecido com nitrogênio líquido (Figura 8G). Mensuramos o nível de

nitrogênio do botijão diariamente para manutenção da temperatura (Figura 8H), considerando 17 centímetros o valor limite para reabastecimento.

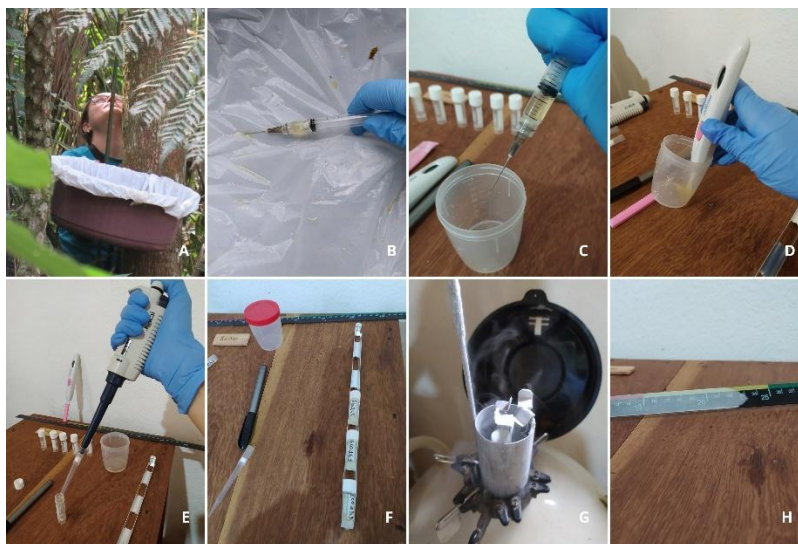


Figura 8. A – Coleta de urina na mata; B – Sucção das gotas de urina com agulha e seringa; C – Armazenamento do volume total de urina coletada em pote coletor universal; D – Realização do teste de fita; E – Armazenamento da urina em criotubos; F – Identificação dos criotubos e armazenamento nas canaletas; G – Armazenamento das amostras em botijão criogênico; H – Aferição do nível de nitrogênio líquido. Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

3.5.2. Coleta de Fezes

Realizamos as coletas de fezes preferencialmente no mesmo momento de coleta da urina. Acompanhamos o animal foco do estudo, a fêmea ECO-S, coletando os fragmentos de fezes frescas logo após o momento da defecação. Certificamos a individualização da amostra, ou seja, coletamos apenas fragmentos do mesmo bolo fecal expelido pelo animal em observação. Adicionamos os fragmentos em saco plástico com fecho zíper, identificados com o nome do animal, número da amostra, temperatura no momento da coleta e coletor. Realizamos a homogeneização das fezes e armazenamento em isopor e gelo. Ao final do dia, encaminhávamos a amostra para o alojamento para acondicionamento em freezer -20°C .

Ao término do campo, encaminhamos todas as amostras biológicas (urina e fezes) para o Departamento de Biologia Animal da UFV para armazenamento em um refrigerador -80° no Laboratório de Ecofisiologia dos Quirópteros (LEQ).

3.6. Ensaio Hormonais

3.6.1. Teste da Fita de Ovulação

O teste da fita de ovulação consiste na análise do pico de hormônio luteinizante (LH) através de um teste comercial de ovulação para mulheres ClearBlue®, baseando-se na detecção do pico do LH por meio de urina. O teste é vendido em farmácias em caixas contendo um leitor digital e dez fitas com ponta absorvível. Conforme orientação do fabricante, quando o leitor digital apresenta um desenho com um rosto feliz, é um indicativo que a mulher está ovulando naquele momento e no próximo dia, ou seja, houve aumento na produção e excreção do LH. A instrução de uso orienta que o teste pode ser aplicado em qualquer horário do dia, desde que o indivíduo não tenha urinado até quatro horas antes da utilização.

Realizamos o teste todos os dias durante trinta dias consecutivos após as coletas de urina. Após coletar a urina, prontamente nos dirigíamos à base de apoio, onde encontrava-se todo material previamente organizado e preparado. Ao chegar no local, com auxílio de uma seringa com agulha, realizávamos a sucção de cada gota de urina observada sob o plástico branco. Adicionamos o volume total em tubo coletor universal, inserindo apenas a parte absorvível da fita durante 5 segundos (Figura 9A). Conforme recomendação do fabricante, posicionamos o leitor digital com a porção da fita absorvível para baixo (Figura 9B). A leitura com o resultado (Figura C) demandava em torno de 7 segundos e enquanto esta era realizada, terminávamos o processo de armazenamento da urina coletada.

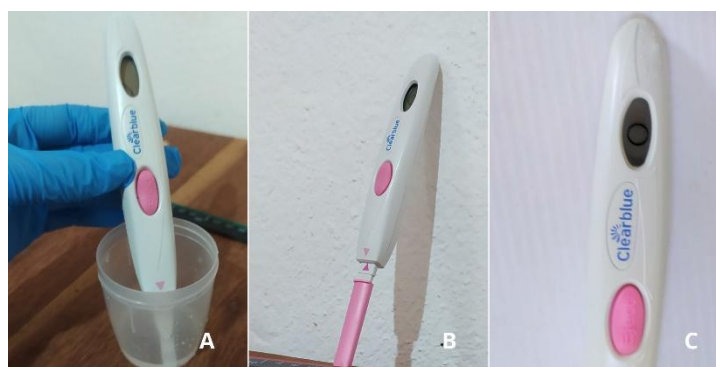


Figura 9. A – Ponta absorvível do teste de ovulação em contato com a urina; B – Ponta absorvível da fita com tampa rosa posicionada para baixo; C – Visor digital com círculo indicando resultado negativo para presença de LH na urina. Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

3.6.2. Ensaio hormonal: Hormônio Luteinizante

Realizamos o ensaio hormonal no Laboratório de Ecofisiologia dos Quirópteros do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa. Para a análise do

hormônio luteinizante (LH), adquirimos um kit com teste de enzimaímmunoensaio (ELISA) específico para LH da marca EZ Assays®.

Iniciamos o procedimento com preparação das amostras e reagentes (Figura 10A). A princípio, retiramos do resfriamento as amostras urinárias coletadas e reagentes fornecidos pelo fabricante do Kit ELISA para que assim pudessem atingir temperatura ambiente lentamente (20° a 25°C). Retiramos as amostras urinárias após descongeladas dos criotubos e passamos para tubos Eppendorf de 2mL, compatíveis com a centrífuga. Centrifugamos as amostras a 3000rpm durante 20 minutos (Figura 10B) para retirada do sobrenadante, material que seria utilizado na microplaca. Se mesmo após centrifugadas as amostras apresentassem sedimentos, conforme recomendação do fabricante, repetíamos o processo.

Após o preparo de amostras e reagentes, iniciamos a atividade em microplaca de 96 poços fornecida junto ao Kit. Para os poços padrões e amostras adicionamos as soluções reagentes conforme orientação do fabricante. Em seguida, cobrimos a placa com uma membrana de vedação presente no kit, que foi agitada e misturada suavemente por 10 minutos. Com a placa já vedada, a levamos para a incubação a 37°C durante 60 minutos.

Durante a incubação da placa, preparamos a solução de lavagem diluindo a sua concentração 20x em água destilada. Após incubação da placa, retiramos a película de vedação, escoamos toda solução presente nos poços e secamos a placa em papel absorvente. Repetimos esse processo por 5 vezes conforme recomendação do fabricante.

Iniciamos então a etapa de desenvolvimento de cor da microplaca, a partir da adição das soluções Cromogênicas A e B em cada um dos poços. Agitamos a placa suavemente de forma manual para mistura das soluções e em seguida a levamos novamente para incubação a 37°C durante 15 minutos (Figura 10C) para desenvolvimento da cor. Os poços ficaram azuis (Figura 10D).

A última etapa consistiu na adição de Solução de Parada fornecida pelo fabricante, onde adicionamos a solução para interromper a reação. Neste momento os poços que estavam azuis mudaram para cor amarelo (Figura 10E). Conduzimos a placa para uma leitora automática Multiskan™ FC Microplate Photometer utilizando o filtro de 450nm (Figura 10F).

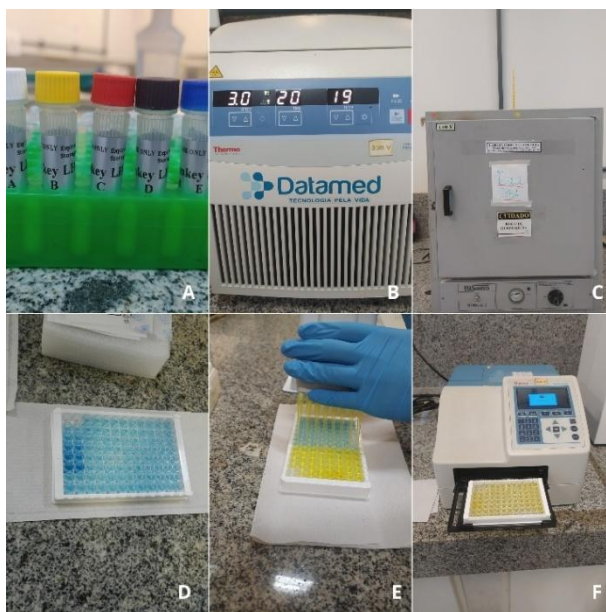


Figura 10. A – Reagentes que compõe o KIT ELISA para hormônio luteinizante em primatas; B – Centrífuga utilizada para as amostras em ambos ensaios hormonais (hormônio luteinizante e progesterona); C – Estufa utilizada para encubação da placa ELISA; D – Placa com poços onde amostras e reagentes são inseridos, nesta imagem o fluido presente nos poços está em azul pois havia passado pelo processo para desenvolvimento de cor; E – Os poços da placa estão alterando sua cor para amarelo imediatamente após reação da Solução de Parada; F – Placa passando pela etapa de leitura em uma leitora automática; Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

3.6.3. Extração de esteroides através de sólidos

Realizamos a extração de esteroides no Laboratório de Fruticultura onde foi realizada a secagem das amostras de fezes e no Laboratório de Ecofisiologia dos Quirópteros para etapa de extração, ambos da Universidade Federal de Viçosa. Baseamos nosso protocolo de extração de esteroides através de matriz fecal de acordo com Strier e Ziegler (1997) e de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante do Kit ELISA.

Retiramos as amostras do congelador para atingir temperatura ambiente de forma gradual, sendo posteriormente homogeneizadas separando 3 gramas para cada, pesadas em balança de precisão modelo Shimadzu AX200 (Figura 11A). Separamos o bolo fecal em 3g com auxílio de espátula de inox, que foi inserido em pequenos pacotes feitos de papel alumínio e devidamente identificados para passar pelo processo de secagem (Figura 11B). A etapa de secagem, realizamos em aparelho liofilizador modelo MODULYO D-230 Freeze Dryer (Figura 11C).

A etapa de extração de metabólitos fecais conta com a retirada máxima de água presente nas fezes para que a análise seja realizada através apenas da matéria seca. Dessa forma, separamos as amostras em dois conjuntos para o processo de liofilização. O primeiro conjunto de amostras passou duas vezes pelo processo de liofilização, a primeira durante 23 horas, e ao

final do processo as amostras ainda estavam úmidas. Assim, retornamos com as amostras para um segundo processo de liofilização que durou 16 horas. Ao final das 39 horas observamos perda média de 76,5% de massa (Figura 11D). Com o segundo conjunto de amostras, optamos por um processo de liofilização de 96 horas consecutivas, e obtivemos perda média 77,6% de massa.

Finalizada a liofilização, passamos as amostras novamente pelo processo de pesagem e encaminhamos ao LEQ-UFV para a extração. Individualmente maceramos o bolo fecal seco com auxílio de um cadinho de porcelana até virar pó (Figura 11E). Passamos nossas amostras por uma peneira para garantir que fibras e sementes fossem retiradas das amostras fecais (Figura 11F). Após pulverizadas, passamos a amostra pela terceira pesagem com auxílio de uma espátula de alumínio, placa de vidro e balança de precisão, e então armazenamos em tubo Falcon 15mL. Nesta etapa o fabricante recomendava adição de etanol absoluto em cada um dos tubos, com a proporção de a cada 0,1g do pó fecal adicionávamos 1mL de etanol. Como as amostras demonstravam variação em peso após pulverização, ajustamos o volume de etanol individualmente (Figura 11G). Os tubos contendo amostras com etanol passaram por um processo de agitação vigorosa durante 30 minutos em um agitador modelo Orbital-Genie Adhering Mat (Figura 11H). Após essa etapa, centrifugamos as amostras a 5000rpm durante 15 minutos. Posteriormente retiramos o sobrenadante dos tubos Falcon e armazenamos em tubos Eppendorfs de 2mL devidamente identificados. Ao final do procedimento acondicionamos os sobrenadantes em congelador a -20C.

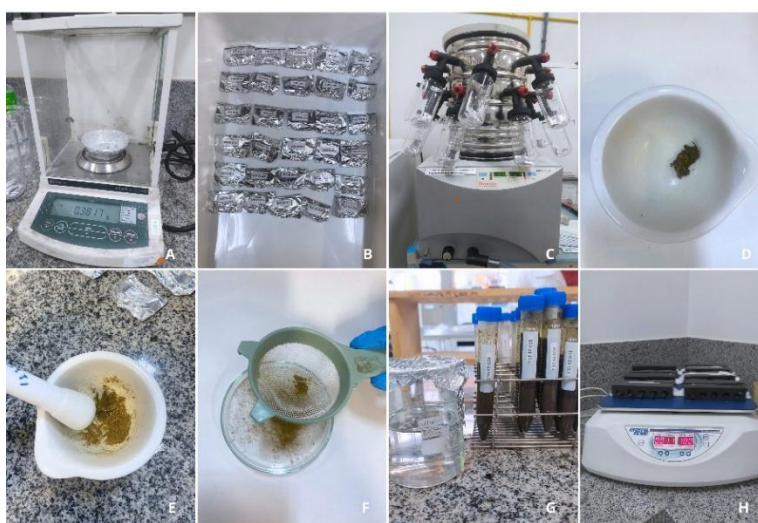


Figura 11. A – Pesagem das amostras em balança de precisão; B – Amostras acondicionada em envelopes de alumínio identificados; C – Amostras passando pelo processo de secagem em um aparelho liofilizador; D – Aspecto das amostras fecais após liofilização; E – Amostras pulverizadas com auxílio de um cadinho de porcelana; F – Amostras peneiradas até virarem pó; G – Amostras diluídas em álcool absoluto; H – Amostras passando pelo agitador. Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

3.6.4. Ensaio hormonal: Progesterona

Realizamos o ensaio imunoenzimático a partir de um kit do fabricante EZ ASSAY, específico para progesterona. O protocolo que aplicamos foi disponibilizado pelo fabricante em bula. Para tal, preparamos amostras e reagentes para dar início ao protocolo. Os sobrenadantes das amostras passaram pelo descongelamento lento para atingir temperatura ambiente e posteriormente centrifugamos a 5000rpm durante 15 minutos e retiramos o novo sobrenadante. Quanto aos reagentes fornecidos, também os retiramos do resfriamento para atingir temperatura ambiente durante 30 minutos.

Diluímos o Assay Buffer fornecido pelo fabricante inicialmente em uma razão de 1:4 de água destilada e o Wash Buffer em 1:10 de água destilada. Com o Assay Buffer já diluído iniciamos a reconstituição das amostras contendo 100µl de sobrenadante para 400µl de Assay Buffer. Após diluição, passamos as amostras duas vezes por agitação no aparelho Vórtex modelo DLAB Mx-S com descansos de 5 minutos para cada agitação. Em seguida separamos 7 tubos de ensaio sequencialmente enumerados e identificados. Realizamos então uma diluição em série. Repetimos o processo em série para os tubos de 3 a 7 mantendo o volume de 250µl de solução. Com todos reagentes e amostras preparados, iniciamos o ensaio hormonal em placa de 96 poços.

Após processo em agitador, aspiramos toda solução presente em cada um dos poços e lavamos com solução Wash Buffer. Este procedimento exigia 4 repetições e, após cada repetição, realizamos a secagem da placa em papel absorvente. Adicionamos em cada um dos poços Substrato TMB e incubamos a placa em temperatura ambiente ao abrigo da luz durante 30 minutos. Após incubação pipetávamos solução de parada em cada um dos poços para interromper a reação. Em leitora modelo Multiskan™ FC Microplate Photometer ajustada a 450nm, realizamos a leitura da microplaca.

3.7. Análises Estatísticas

Para investigarmos a variação na frequência dos comportamentos sexuais ao longo do tempo, ajustamos modelos lineares mistos generalizados (GLMM) com distribuição binomial negativa, apropriada para dados de contagem com superdispersão. A variável temporal foi transformada em variável numérica, correspondente ao número de dias desde o início da coleta, e incluída como covariável contínua nos modelos. Além do modelo com efeito linear do tempo,

aplicamos um modelo *spline* utilizando funções base de *splines* naturais, com o intuito de capturarmos possíveis relações não lineares entre o tempo e a frequência comportamental. Previamente, definimos o grau de liberdade das *splines* para permitir flexibilidade na modelagem (Bolker *et al.*, 2009; Hastie; Tibshirani, 1990; Hilbe, 2011; Wood, 2017; Zuur *et al.*, 2009).

Como efeitos fixos, os modelos incluíram as concentrações padronizadas dos hormônios luteinizante (LH) e progesterona, bem como a interação entre esses hormônios, além do fator categórico referente ao grupo “vizinho”. Para controlar a autocorrelação temporal e a variabilidade inerente aos diferentes dias de coleta, inserimos um efeito aleatório para a variável “data”.

Para identificarmos padrões cíclicos na frequência de comportamentos, desenvolvemos uma função analítica que ajusta modelos estatísticos incorporando termos senoidais (seno e cosseno) (Barnett; Dobson, 2010; Stolwijk *et al.*, 1999), para representar diferentes durações de ciclo (21 a 26 dias). A função testa automaticamente diferentes famílias de modelos (*Poisson*, *quasi-Poisson*, modelos mistos e zero-inflados) com base na dispersão dos dados e proporção de zeros, selecionando o modelo mais adequado com menor AIC (Bolker *et al.*, 2009; Brooks *et al.*, 2017; Burnham; Anderson, 2002; Hilbe, 2011; Zuur *et al.*, 2009). O modelo final fornece estimativas dos coeficientes angulares, valores de p para os termos senoidais e a identificação da periodicidade mais significativa para cada indivíduo e comportamento.

Conduzimos todas as análises no software R versão 4.4.2 (R CORE TEAM, 2025). A adequação dos modelos, avaliamos por meio de diagnósticos de resíduos simulados, utilizando o pacote DHARMA, com foco em testes de dispersão, uniformidade e independência dos resíduos. A função “*glmmTMB*” do pacote “*glmmTMB*” utilizamos para ajuste dos modelos. O nível de significância que adotamos para os testes estatísticos foi de 5%.

4. RESULTADOS

4.3.1. Estudo comportamental retrospectivo (ECO-S e SOC-S)

No ano de 2020, o indivíduo ECO-S apresentou gestação e no início de novembro de 2020 ocorreu o nascimento da prole ELI-IB. Supomos que a cópula de concepção tenha ocorrido em março de 2020. Deste modo, o último registro de comportamento sexual apresentado por ECO-S ocorreu em 17 de março de 2020. A retomada dos comportamentos

sexuais (em específico a vocalização de acasalamento – *Mating twitter*) ocorreu em novembro de 2021, um ano após o nascimento de ELI-IB.

A aplicação de modelos harmônicos aos dados retrospectivos de 2020 e 2021 nos permitiu identificar padrões cíclicos significativos nos comportamentos dos indivíduos ECO-S e SOC-S, com variações na duração dos ciclos, tipo de modelo mais adequado e coeficientes senoidais e cossenoidais.

Para o indivíduo ECO-S, a categoria alimentação apresentou um ciclo de 25 dias, ajustado por um modelo Poisson, com dispersão = 3,98 e AIC = 541,90. O termo cossenoidal foi altamente significativo ($\beta_{c_{os}} = 0,26$; $p < 0,001$), enquanto o senoidal não apresentou significância ($\beta_{sin} = -0,01$; $p = 0,78$), sugerindo uma oscilação regular com picos bem definidos no ciclo alimentar. Na categoria descanso, observamos um ciclo de 26 dias, com melhor ajuste também por modelo Poisson (dispersão = 3,41; AIC = 565,55). Tanto o coeficiente senoidal ($\beta_{sin} = 0,12$; $p < 0,001$) quanto o cossenoidal ($\beta_{c_{os}} = -0,11$; $p < 0,001$) foram significativos, sugerindo uma oscilação marcada e estável no padrão de repouso ao longo do tempo. Na categoria locomoção, observamos um ciclo de 23 dias, com melhor ajuste por modelo Poisson (dispersão = 1,46; AIC = 301,01). Neste caso, o coeficiente senoidal foi significativo ($\beta_{sin} = 0,24$; $p = 0,008$), enquanto o cossenoidal não foi ($\beta_{c_{os}} = -0,11$; $p = 0,22$), indicando um padrão oscilatório com amplitude relevante ao longo do tempo. A categoria sexual apresentou um ciclo de 22 dias, sendo melhor modelado por um modelo Poisson (dispersão = 1,98; AIC = 133,11). O coeficiente cossenoidal foi significativo ($\beta_{c_{os}} = -1,92$; $p < 0,001$), enquanto o senoidal esteve próximo da significância ($\beta_{sin} = -0,50$; $p = 0,07$), sugerindo uma forte variação periódica nesse comportamento, compatível com fases reprodutivas. Para o comportamento social, identificamos um ciclo de 21 dias, com melhor ajuste por um modelo Poisson (dispersão = 1,40; AIC = 105,23). Apenas o coeficiente cossenoidal foi significativo ($\beta_{c_{os}} = -0,69$; $p = 0,0448$), indicando um padrão cíclico moderado na frequência de interações sociais.

O indivíduo SOC-S nos apresentou um ciclo de 26 dias na categoria alimentação, com melhor ajuste por modelo Poisson (dispersão = 3,57; AIC = 500,92). Ambos os coeficientes foram significativos: senoidal ($\beta_{sin} = -0,21$; $p < 0,001$) e cossenoidal ($\beta_{c_{os}} = 0,11$; $p = 0,0412$), indicando uma variação periódica evidente no padrão alimentar. Na categoria descanso, observamos um ciclo de 25 dias, ajustado por modelo Poisson (dispersão = 3,65; AIC = 591,54). Apenas o coeficiente cossenoidal foi significativo ($\beta_{c_{os}} = -0,13$; $p < 0,001$), enquanto o senoidal não apresentou significância ($\beta_{sin} = -0,03$; $p = 0,3021$), sugerindo uma modulação periódica discreta no comportamento de repouso. Para a categoria locomoção, identificamos um ciclo de 22 dias, também com melhor ajuste por modelo Poisson (dispersão = 1,95; AIC = 342,66). O

coeficiente senoidal foi significativo ($\beta_{\text{sin}} = -0,18$; $p = 0,0198$), enquanto o cossenoidal não foi ($\beta_{\text{cos}} = -0,11$; $p = 0,1727$), apontando para um padrão rítmico consistente ao longo do tempo. Na categoria sexual, observamos um ciclo de 22 dias, igualmente melhor modelado por Poisson (dispersão = 3,96; AIC = 123,52). Ambos os coeficientes apresentaram significância estatística: senoidal ($\beta_{\text{sin}} = -0,98$; $p = 0,0032$) e cossenoidal ($\beta_{\text{cos}} = -2,53$; $p < 0,001$), revelando uma modulação periódica pronunciada, compatível com eventos reprodutivos sazonais. Por fim, a categoria social nos apresentou um ciclo de 24 dias, com melhor ajuste por modelo Poisson (dispersão = 1,17; AIC = 124,61). Apenas o coeficiente cossenoidal foi significativo ($\beta_{\text{cos}} = 0,72$; $p = 0,0096$), enquanto o senoidal não nos apresentou significância ($\beta_{\text{sin}} = 0,12$; $p = 0,6721$), indicando um padrão rítmico regular, porém menos intenso, nas interações sociais.

Os resultados estão descritos nas Figuras 12 e 13 e Tabela 1.

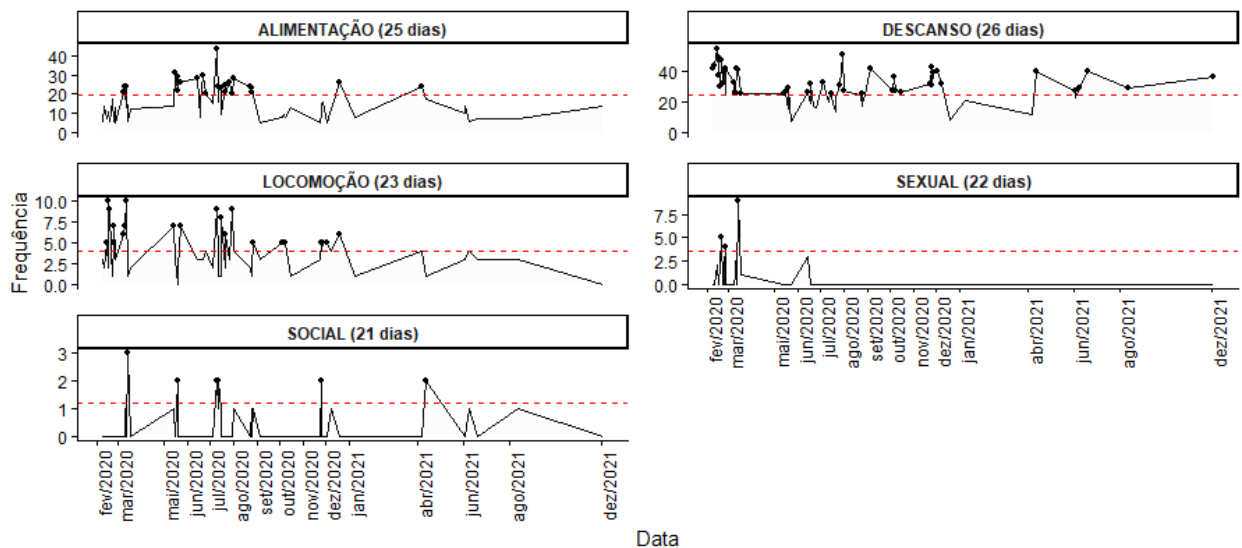


Figura 12. Variação da frequência comportamental do indivíduo ECO-S ao longo do tempo. A linha vermelha tracejada indica o limiar de pico (40% da amplitude). Pontos pretos destacam os dias em que os comportamentos ultrapassaram esse limiar. A descrição das categorias analisadas pode ser encontrada no tópico 3.3 deste trabalho.

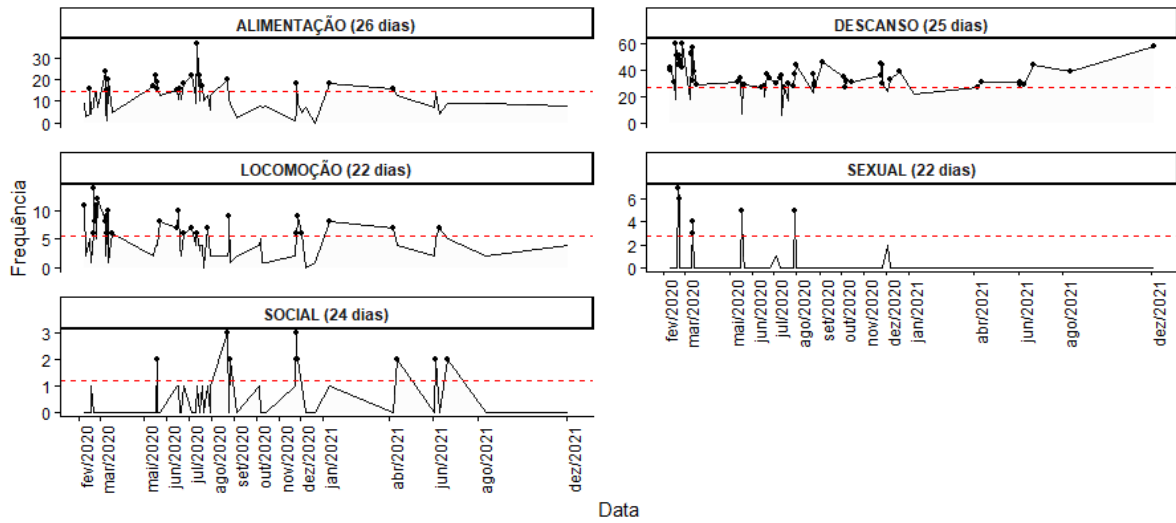


Figura 13. Variação da frequência comportamental do indivíduo SOC-S ao longo do tempo. A linha vermelha tracejada indica o limiar de pico (40% da amplitude). Pontos pretos destacam os dias em que os comportamentos ultrapassaram esse limiar. A descrição das categorias analisadas pode ser encontrada no tópico 3.3 deste trabalho.

Tabela 1. Resumo dos parâmetros estimados pelos modelos para cada comportamento.

ID	Comportamento	Ciclo	Modelo	Valor de p		Coeficiente		AIC
				sen	cos	sen	cos	
ECO-S	Alimentação	25	Poisson	$p = 0,784$	$p < 0,001$	-0,012	0,257	541,9
ECO-S	Descanso	26	Poisson	$p < 0,001$	$p < 0,001$	0,12	-0,114	565,55
ECO-S	Locomoção	23	Poisson	$p < 0,001$	$p = 0,224$	0,235	-0,113	301,01
ECO-S	Sexual	22	Poisson	$p = 0,076$	$p < 0,001$	-0,5	-1,922	133,11
ECO-S	Social	21	Poisson	$p = 0,178$	$p = 0,044$	0,433	-0,689	105,22
SOC-S	Alimentação	26	Poisson	$p < 0,001$	$p = 0,041$	-0,21	0,11	500,92
SOC-S	Descanso	25	Poisson	$p = 0,302$	$p < 0,001$	-0,031	-0,13	591,54
SOC-S	Locomoção	22	Poisson	$p = 0,019$	$p = 0,009$	-0,184	-0,108	342,66
SOC-S	Sexual	22	Poisson	$p = 0,003$	$p < 0,001$	-0,98	-2,53	123,52
SOC-S	Social	24	Poisson	$p = 0,672$	$p = 0,009$	0,12	0,72	124,61

4.3.2. Dados comportamentais da fêmea ECO-S

A coleta de dados comportamentais de ECO-S durante o mês de março de 2024 totalizou 243 horas e 04 minutos amostrados com 2.480 registros. A frequência de comportamentos sexuais em ECO-S variou ao longo do tempo, apresentando um padrão temporal não linear. O período avaliado neste contexto engloba os 30 dias consecutivos de coleta de dados da fêmea foco do estudo, realizados em março de 2024. O modelo misto com distribuição binomial negativa e função *spline* ajustada para a variável temporal nos revelou que o tempo foi um preditor significativo da variação nos comportamentos sexuais ($\beta = 2,19$; $SE = 0,65$; $z = 3,38$;

$p = 0,0007$; $\beta = 1,58$; $SE = 0,80$; $z = 1,97$; $p = 0,049$). Esse padrão sugere flutuações ao longo do tempo, como demonstrado pela Figura 14, que não segue uma tendência linear, o que pode indicar variações associadas a fatores fisiológicos cíclicos.

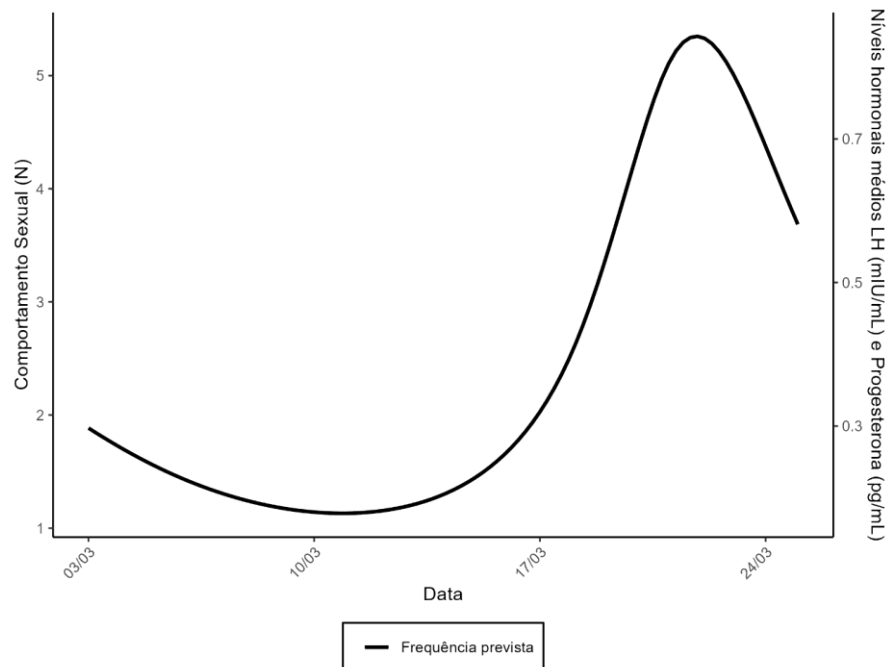


Figura 14. Variação da frequência prevista de comportamentos sexuais ao longo do tempo, modelada por *spline*, com níveis médios de LH e progesterona.

4.3.3. Material biológico

Em relação aos nossos testes de metodologias de coleta (dispositivo de haste ou bacia), optamos pela bacia em função dos resultados descritos neste tópico. Durante nossa tentativa de coleta pela manhã com o dispositivo de haste, a fêmea apresentou comportamento agonístico com vocalização em direção ao objeto. Pelo período da tarde do mesmo dia, durante o teste com a bacia a fêmea ECO-S não apresentou qualquer comportamento agonístico ou que pudesse ser interpretado como desconforto tanto com a nossa presença quanto do objeto de coleta. Uma vez que a metodologia não-invasiva tem como premissa manutenção do bem-estar animal e redução do estresse, o dispositivo de haste foi descartado. O comportamento agonístico apresentado pela ECO-S apenas durante o uso do dispositivo de haste foi o fator preponderante por optarmos pelo uso da bacia.

Em relação às amostras de urina, ao todo coletamos 128 alíquotas, e sempre que possível em triplicata ou até mais alíquotas a depender do volume de urina. A quantidade de urina que

coletamos por dia variou entre 0,4mL e 3mL, com média de 1,06mL, totalizando 36,1mL de urina coletado em todo estudo. A coleta fecal nos proporcionou exatas 30 amostras com variação do peso por amostra.

Em relação ao material biológico da nossa extração de esteroides através de sólidos, tivemos a oportunidade de avaliar dois períodos diferentes de liofilização das fezes e suas perdas. Ao final do nosso procedimento, observamos a diferença na perda de massa de 1,1% com 57 horas a mais de liofilização.

4.3.4. Teste da Fita de Ovulação

O Teste de Fita comercial CLEAR BLUE que utilizamos nas amostras urinárias não identificou LH em nenhum dos dias dos trinta dias do estudo.

4.3.5. Influência hormonal no comportamento sexual

A análise conjunta dos hormônios (Figuras 15 e 16) revelou que os níveis escalonados de progesterona apresentaram tendência marginal à significância ($p = 0,085$), enquanto o LH isoladamente não se mostrou estatisticamente significativo ($p = 0,148$). No entanto, a interação entre LH e progesterona foi significativa ($\beta = 1,91$; $SE = 0,87$; $z = 2,21$; $p = 0,027$), indicando que a combinação dos dois hormônios tem um papel modulador na frequência dos comportamentos sexuais.

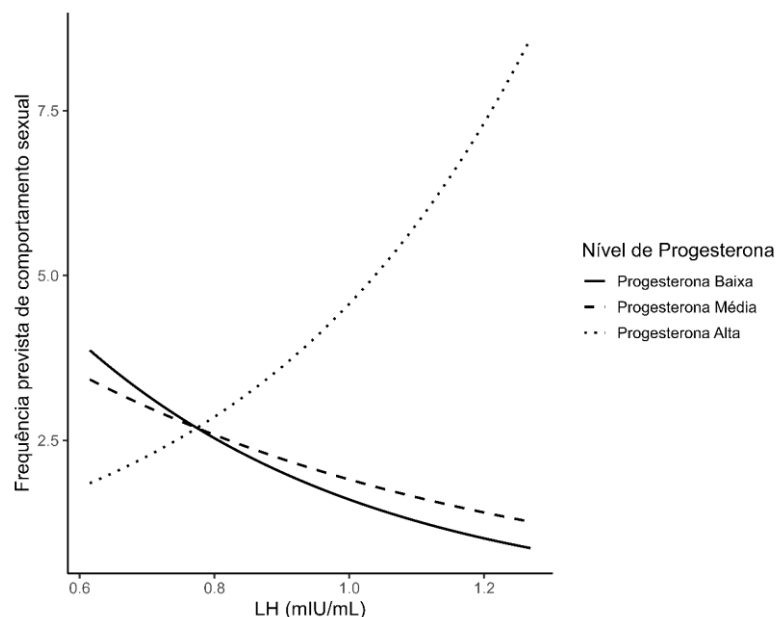


Figura 15. Relação entre LH e a frequência prevista de comportamentos sexuais em três níveis de Progesterona (baixo, médio e alto), destacando a interação hormonal na modulação comportamental.

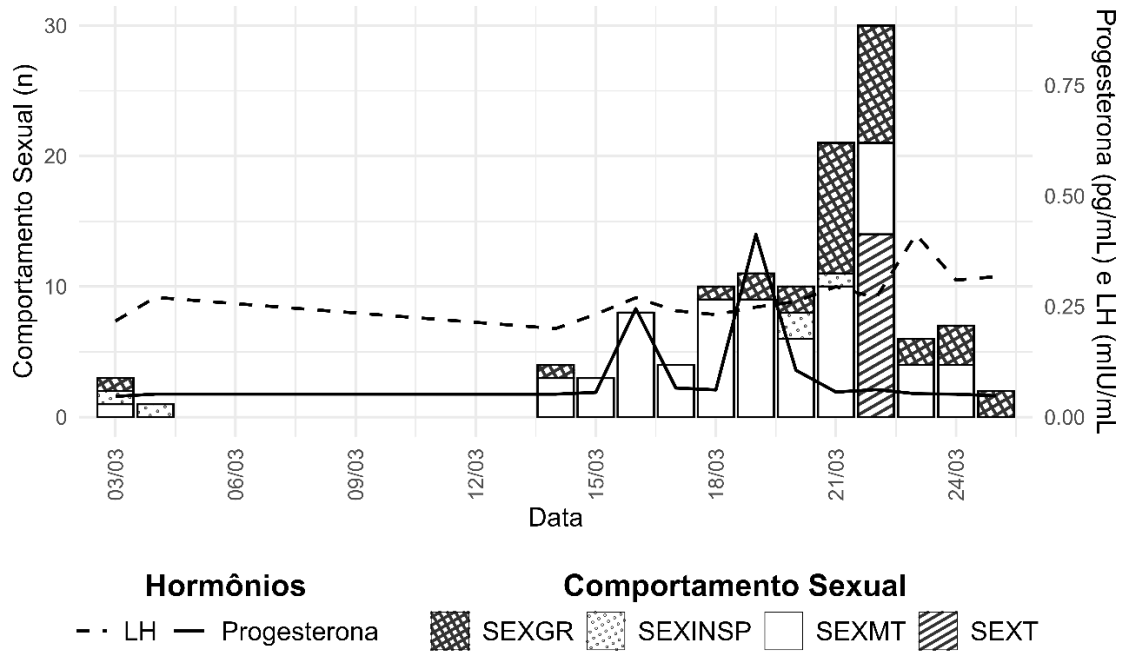


Figura 16. Frequência de comportamentos sexuais ao longo do tempo, com a sobreposição dos níveis hormonais de LH (linha pontilhada) e Progesterona (linha contínua), normalizados à escala da frequência. Comportamento sexual – SEXGR (*Grimace*): bater dos dentes; SEXINSP: inspeção da genitália de outro indivíduo; SEXMT (*Mating twitter*): Vocalização como um “piado” de acasalamento acompanhado de bater dos dentes (para mais informações sobre as categorias de comportamento consultar o tópico 3.3).

Ao longo do período analisado, observamos que os níveis do hormônio progesterona permaneceram relativamente baixos e estáveis, com valores variando entre 0,0469 pg/mL e 0,413 pg/mL (Tabela 2). O hormônio luteinizante (LH), também apresentou estabilidade relativa, com elevações pontuais, mas mantendo-se dentro de uma faixa moderada. Um pico acentuado de LH foi registrado, sugerindo a ocorrência da ovulação. Após esse evento, os níveis hormonais demonstraram maior oscilação, com flutuações em ambas as concentrações, dificultando a classificação clara de fases subsequentes. Esses dados nos indicam uma relação entre o aumento de LH e a ovulação, embora a ausência de um padrão claro de elevação sustentada de progesterona torne indefinida a caracterização do início da fase lútea.

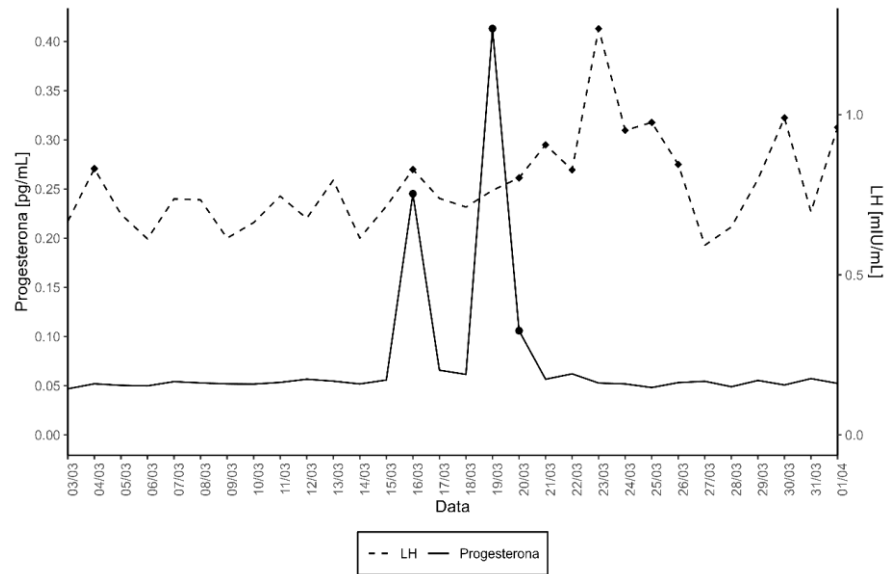


Figura 14. Variação temporal dos níveis de Progesterona (linha contínua) e LH (linha tracejada), com picos hormonais destacados por pontos. Os eixos representam as concentrações relativas de cada hormônio ajustadas por fator de escala.

Tabela 2. Estatística descritiva para as variáveis hormonais e comportamentais.

Hormônio	Categoria Comportamental	
	Sexual (N = 120)	Social (N = 45)
Hormônio Luteinizante (mIU/mL)		
Média (DP)	0,839 (0,128)	0,721 (0,128)
Mediana [Min, Max]	0,828 [0,615, 1,27]	0,676 [0,614, 1,27]
Progesterona (pg/mL)		
Média (DP)	0,107 (0,109)	0,0553 (0,0140)
Mediana [Min, Max]	0,0621 [0,0469, 0,413]	0,0519 [0,0469, 0,106]

5. DISCUSSÃO

As análises de comportamento retrospectivo da fêmea ECO-S nos permitiram identificar padrões cíclicos em todas as categorias analisadas: Locomoção, Alimentação, Social, Descanso e Sexual. Os comportamentos cíclicos, cujo resultados de seno e cosseno apresentam uma variação entre os valores positivos e os negativos, podem ser explicados pelo ambiente cativo onde os animais não experimentam boa parte dos desafios do ambiente natural. A disponibilidade constante de uma dieta suplementar, abrigo e ambiente restrito podem

contribuir para exibição de comportamentos cíclicos evidentes. Observamos uma interrupção na exibição dos comportamentos sexuais da fêmea ECO-S, caracterizado pela prenhez, durante o período amostral do ano de 2020. Ainda assim, nossos dados indicam manutenção de 22 dias no ciclo do comportamento reprodutivo, com picos regulares de expressão. De acordo com Strier e Ziegler (1997), as fêmeas de miquiqui-do-norte apresentam ciclos com duração de $21,0 \pm 5,4$ dias, períodos de cópula concentrados em $2,1 \pm 1,2$ dias e intervalos entre períodos de cópula que variam em média de $15,6 \pm 6,7$ dias. Observamos uma consistência temporal dos padrões cíclicos nos comportamentos exibidos, incluindo o comportamento sexual. Nossas análises revelam padrões significativos para os ciclos do comportamento sexual exibido por ECO-S, sugerindo uma forte oscilação com fases bem definidas no ciclo, previsíveis ao longo do período analisado. Essas oscilações são compatíveis com as variações nos processos fisiológicos e endócrinos associados às fases reprodutivas, caracterizado por eventos sazonais com picos de atividades e pela exibição de comportamentos específicos do período (Strier, 2016).

As análises do comportamento da fêmea SOC-S também nos revelam padrões cíclicos em todas as categorias analisadas. Observamos que os ciclos presentes nas categorias Alimentação, Locomoção e Descanso apresentados pelas duas fêmeas, SOC-S e ECO-S, exibiram baixa variação (± 1 dia) quando comparados. Para interações sociais, SOC-S apresentou ciclo de 24 dias, três dias a mais que ECO-S. Já para comportamentos sexuais ambas as fêmeas apresentaram ciclos de 22 dias, com coeficientes significativos e oscilação intensa e marcada, e em concordância com o observado por Strier e Ziegler (1997).

Em condições de vida livre, as fêmeas de miquiqui apresentam cerca de seis ciclos não conceptivos antes de apresentar um ciclo de concepção (Strier; Ziegler, 1997; Ziegler *et al.*, 2009). As fêmeas saudáveis e selvagens de miquiqui-do-norte tendem a alcançar a concepção, com uma gestação com duração média de 7,2 meses, e então retomam seus ciclos em torno de 24 meses após o nascimento de seus filhotes (Strier; Ziegler, 2005). Nesse contexto, as fêmeas passam por um intervalo entre a concepção e o retorno de suas atividades sexuais. Diferente do observado em vida livre, as fêmeas ECO-S e SOC-S apresentam sucessivos períodos de exibição de comportamentos sexuais e de tentativas de cópulas. Apenas a fêmea ECO-S apresentou um intervalo na exibição de comportamentos sexuais entre março de 2020 e novembro de 2021, período que corresponde à sua prenhez, confirmada pelo nascimento do macho ELI-IB em 03 de novembro de 2020.

O nascimento de ELI-IB ocorreu pouco tardio em relação ao encontrado em vida livre, onde os nascimentos concentram-se no período de seca, de maio a outubro (Strier, 1996; Strier

et al., 2001). A faixa etária da primeira concepção de ECO-S é semelhante ao observado nas fêmeas em vida livre, que normalmente tem o primeiro filhote com aproximadamente nove anos (Strier; Ziegler, 2000). Uma fêmea precisa de condições adequadas de saúde e bem-estar para se reproduzir. Animais cativos tendem a poupar energia uma vez que não precisam encontrar seus alimentos ativamente (Lessa, 2013). Assim, o nascimento de ELI-IB e a idade da primeira concepção de ECO-S sugerem que o ambiente cativo pode oferecer condições favoráveis à reprodução. Após 12 meses do nascimento de seu filhote, ECO-S já havia retomado a exibição de comportamentos sexuais, aproximadamente metade do tempo observado em fêmeas de miqui de vida livre. A precocidade desse retorno para ECO-S pode ser atribuída também à disponibilidade constante de alimento e outros recursos em cativeiro (Strier, 1996; Strier *et al.*, 2001; Lessa, 2013).

No período da nossa coleta de amostras em março de 2024, a variável tempo influenciou significativamente o comportamento da fêmea ECO-S. A frequência de comportamentos sexuais sofreu variações ao longo do período analisado e o padrão temporal não linear sugere forte presença de picos conforme observado em vida livre, onde as fêmeas tendem a concentrar o período de cópula em determinado período do ciclo (Strier; Ziegler, 1997; Possamai *et al.*, 2007). Dentro da categoria de comportamento sexual, o comportamento exibido com maior frequência foi SEXMT (*Mating twitter*) que é a vocalização de acasalamento. No Miqui's House essa vocalização geralmente marca o início e fim do período de exibição dos comportamentos sexuais das fêmeas. O indivíduo ECO-S apresentou esses comportamentos durante o período de 12 dias, sendo que as tentativas de cópulas (SEXT) foram iniciadas no oitavo dia após início da exibição do comportamento sexual. As tentativas de cópulas foram registradas durante 3 dias, conforme observado em indivíduos de vida livre (Strier, Ziegler 1997).

Durante o período das coletas de dados comportamentais em 2024, coletamos amostra biológicas da fêmea ECO-S para relacionar suas concentrações de hormônios reprodutivos com os comportamentos registrados. Realizamos um teste de Fita de Ovulação *in loco* com a urina coletada, que não indicou resultado positivo. Segundo o fabricante, o teste detecta o aumento do LH presente na urina de mulheres e pode ser usado em qualquer horário do dia, desde que a pessoa não tenha urinado nas 4 horas que antecedem a realização do teste. Sugerimos que a fêmea tenha excretado apenas quantidades pequenas de LH urinário, apresentando um pico hormonal conforme observado por Ziegler *et al.* 1997. Ressaltamos, entretanto, que no ano daquele estudo não havia distinção técnica/científica da divisão de espécies no gênero *Brachyteles* e o que limita comparações diretas com *Brachyteles hypoxanthus*. Consideramos

ainda as adversidades inerentes às coletas de urina em primatas, o que culminou em perdas de amostras. Pontuamos também a impossibilidade de controlar o intervalo de micção conforme recomenda o fabricante, bem como as variações fisiológicas na metabolização e excreção hormonal entre espécies (Ziegler *et al.* 2009; Strier, 2016).

Em mulheres, o ciclo ovariano caracteriza-se pelo aumento sustentado de estrogênio, definindo a fase folicular. O pico abrupto de LH marca a ovulação sucedida pela fase lútea, esta é caracterizada pelo pico abrupto seguido de aumento sustentado do estrogênio, enquanto a progesterona apresenta aumento sustentado nesta fase (Nedresky; Singh, 2019). Esse perfil hormonal pode ser observado em algumas espécies de homínídeos e primatas asiáticos (infraordem Catarrhini). Em primatas neotropicais (Platyrrhini), infraordem a qual os miquis pertencem, os metabólitos do estrogênio e da progesterona apresentam aumento sustendo após o pico de LH, e isto ocorre durante toda fase lútea (Ziegler *et al.*, 2009). Em contraste ao esperado, observamos que o aumento da progesterona presente nas fezes, precedeu ao momento em que encontramos o aumento do LH na urina. Para melhor interpretação de nossos resultados, consideramos as diferentes vias de excreções, excretas, e horários de coleta. A progesterona, produzida tanto nas suprarrenais quanto nas gônadas, é metabolizada pelos rins e fígado, sendo excretada tanto na urina quanto nas fezes, com atraso de até dois dias em relação a níveis séricos (Ziegler *et al.* 1997, Campbell *et al.* 2001). Já o LH, produzido pela adenohipófise, possui filtração e excreção renal, e desempenha importante função na secreção de progesterona. Portanto, fisiologicamente o aumento do LH precede o de progesterona (Nedresky; Singh, 2019).

Os níveis de progesterona fecal da fêmea ECO-S de forma isolada, nos mostram apenas uma tendência à significância, sem evidências estatísticas de que a progesterona fecal possa ter exercido alguma influência sobre comportamento sexual. Já o LH urinário não apresentou nenhum efeito estatisticamente significativo. Todavia, a interação entre os dois hormônios nos mostra um resultado significativo sugerindo que quando os níveis de LH urinário e progesterona fecal estão simultaneamente altos, podem favorecer a exibição de comportamentos sexuais. Este resultado sugere que a ocorrência simultânea de altos níveis de LH e progesterona pode estar associada a picos na expressão desses comportamentos, possivelmente refletindo fases específicas do ciclo estral. Semelhante ao observado em vida livre, ECO-S apresentou pico de progesterona fecal após exibir comportamento sexual de tentativa de cópula (Strier; Ziegler, 1997; Ziegler *et al.* 2009). Destacamos que, diferente das populações em vida livre, nas quais as cópulas são completas, as fêmeas de nossos estudos exibiram apenas tentativas. Os dois machos adultos residentes do Muriqui's House exibem dificuldades reprodutivas: um com

dificuldade na ereção durante as tentativas de cópula, possivelmente relacionada à idade avançada em torno 30 anos, e o outro macho com dificuldade na posição de monta, possivelmente pelo isolamento social em fragmento florestal sem fêmeas.

Embora alguns estudos como de Ziegler et al. (1993; 1997) indiquem que alguns primatas apresentam aumento de progesterona fecal logo após o pico sérico de LH, não podemos constatar qual foi o momento exato da ovulação de ECO-S. Recomendamos a continuidade do monitoramento hormonal das fêmeas do Muriqui's House com maior variabilidade amostral, integrando coletas urinárias, fecais e dados comportamentais. A análise sistemática a longo prazo de forma não-invasiva pode nos revelar marcadores comportamentais observados próximos aos picos hormonais. Observamos que o aumento da frequência da vocalização de acasalamento exibido pela fêmea ECO-S ocorreu próximo aos picos de excreção hormonal, com isso podemos inferir a necessidade de um estudo sistemático da vocalização exibida por essas fêmeas. Essas vocalizações podem ser um importante marcador hormonal da fêmea ECO-S. A identificação de um padrão entre aumento da frequência vocal com aumento da excreção hormonal pode ser um valioso achado para o manejo reprodutivo. Além disso, com treinamentos comportamentais em curso, existe a possibilidade de adoção de coletas invasivas controladas com redução significativa do fator estresse, como a coleta de swabs vaginais e dosagem hormonal sérica que, em conjunto com as metodologias não-invasivas, podem relevar importantes *insights* sobre a espécie. Análises comparativas entre indivíduos de vida livre e de cativeiro também podem fornecer *insights* para auxílio na tomada de decisão por parte dos pesquisadores quanto ao manejo reprodutivo da espécie *ex situ*.

6. CONCLUSÕES

- O estudo do comportamento sexual de duas fêmeas de muriqui-do-norte adultas *ex situ*, ECO-S e SOC-S, revela semelhança quanto a ciclicidade quando comparados com indivíduos de vida livre;
- Os padrões cíclicos observados em todas as categorias de nossos estudos podem ser justificados por aspectos intrínsecos ao ambiente de cativeiro, como disponibilidade e facilidade ao encontro de alimentos, bem como área de uso reduzida;
- O teste da Fita de Ovulação para seres humanos não apresentou eficiência quando aplicado a urina da fêmea ECO-S;

- Os ensaios hormonais através de kits ELISA demonstraram ser importantes aliados na aplicação de metodologia não-invasiva para coleta de amostras biológicas;
- Quando os níveis de progesterona fecal e LH urinário estão simultaneamente intensificados (picos), podem exercer influência no comportamento reprodutivo da fêmea ECO-S.

REFERÊNCIAS

ABREU, E. F., *et al.*, Lista de Mamíferos do Brasil (2021-2) [Data set]. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5802047>, 2022.

ALTMANN, J. Observational study of behavior: sampling methods. *Behaviour*, 49(3-4), 227-266, 1974.

ARAKAKI, P. R. *et al.* Testicular volume and semen characteristics in the endangered southern murrelet (*Brachyteles arachnoides*). *Journal of Medical Primatology*, 48(4), 244-250, 2019.

ABONDANO, L. A.; ZIEGLER, T. E.; DI FIORE, A. Reproductive endocrinology of wild female woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha poeppigii*) during puberty, ovarian cyclicity, and pregnancy. *American Journal of Primatology*, v. 84, n. 6, p. e23303, 2022.

AGUIRRE, A. C. O mono *Brachyteles arachnoides* (E. Geoffroy) – Situação atual da espécie no Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciência*. ABC, Rio de Janeiro. 53p, 1971.

ANDRABI, S. M., MAXWELL, W. M. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal reproduction science*, v. 99, n. 3-4, p. 223-243, 2007.

BARNETT, A. G., DOBSON, A. J. *Analysing seasonal health data* Berlin: Springer. Vol. 30. 2010.

BASTOS, A. F. L. Avaliação endocrinológica da reprodução de muriquis do sul em cativeiro (*Brachyteles arachnoides*-E. GEOFFROY, 1806) por meio de dosagem de metabólitos de esteróides fecais, 2006.

BROWN, J. L.; KERSEY, D. C., WALKER, S. L. Assessment of luteinizing hormone and prolactin immunoactivity in Asian and African elephant urine using assays validated for serum. *General and comparative endocrinology*, 169(2), 138-143, 2010.

BOLKER, B. M. *et al* Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 24, n. 3, p. 127–135, 2009.

BROOKS, M. E. *et al.* glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. *The R Journal*, v. 9, n. 2, p. 378–400, 2017.

BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R. Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach. 2. ed. New York: Springer, 2002.

CAMPBELL, C. J., SHIDELER, S.E., TODD, H. E., AND LASLEY, B. L. Fecal analysis of ovarian cycles in female black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). *Am. J. Primatol.* 54:79–89. 2001.

CHAVES, P. B.; *et al.*, Genetic diversity and population history of a critically endangered primate, the northern miqui (*Brachyteles hypoxanthus*). *PLoS One*, v. 6, n. 6, p. e20722, 2011.

CHAVES, P. B.; *et al.*, Phylogeographic evidence for two species of miqui (genus *Brachyteles*). *American Journal of Primatology*, v. 81, n. 12, p. e23066, 2019.

COLAS-ROSAS P. F., REZENDE C, SILVA L. P., MELO F. R. First record of the southern miqui (*Brachyteles arachnoides*) in the state of Minas Gerais, Brazil. *Primates* 64:415-419. <https://doi.org/10.1007/s10329-023-01071-y> 2023.

COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; MAUGET, R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reproduction Nutrition Development*, 40(5), 493-504, 2000.

CZEKALA, N. M.; HODGES, J. K.; LASLEY, B. L. Pregnancy monitoring in diverse primate species by estrogen and bioactive luteinizing hormone determinations in small volumes of urine. *Journal of medical primatology*, 10(1), 1-15, 1981.

DEL-CLARO, K. *Comportamento Animal - Uma introdução à ecologia comportamental* Distribuidora / Editora - Livraria Conceito - Jundiaí – SP, 2004.

DEHNHARD, M., *et al.* Non-invasive monitoring of hormones: a tool to improve reproduction in captive breeding of the Eurasian lynx. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p. 74-82, 2008.

FERRAZ.; *et al.*, *Brachyteles hypoxanthus*. The IUCN Red List of Threatened Species, 2019.

FERRAZ, D. S. *Comportamento locomotor de uma população de miquis-do-norte (Brachyteles hypoxanthus)*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 59 p., 2013.

FERREIRA, N. F. O consumo de água por miqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus*, Primates, Atelidae) em um fragmento de floresta semidecídua, 2022.

GILARDI, K. V.; *et al.*, Best practice guidelines for health monitoring and disease control in great ape populations. Gland, Switzerland: IUCN SSC Primate Specialist Group. 56pp., 2015.

GOYMANN, W. Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings: physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1046, n. 1, p. 35-53, 2005.

GUEDES, D.; YOUNG, R. J.; STRIER, K. B. Energetic costs of reproduction in female northern miquis, *Brachyteles hypoxanthus* (Primates: Platyrrhini: Atelidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 25, p. 587-593, 2008.

HASTIE, T.; TIBSHIRANI, R. Generalized Additive Models. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1990.

HILBE, J. M. Negative Binomial Regression. Cambridge: Cambridge University Press, 2011.

IEF. Plano de Manejo Reservado Ibitipoca. Biosfera Consultoria Ambiental e Engenharia LTDA. Juiz de Fora - MG, 161 p., 2011.

JERUSALINSKY, L.; TALEBI, M.; MELO, F. R. Plano de ação nacional para a conservação dos muriquis. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2011.

KERSEY, D. C.; DEHNHARD, M. The use of noninvasive and minimally invasive methods in endocrinology for threatened mammalian species conservation. General and comparative endocrinology, v. 203, p. 296-306, 2014.

KIERULFF, M. C. M. *et al.* Manejo para a conservação de primatas brasileiros. Primatologia do Brasil, vol. 10. p. 71-99, 2007.

KUGELMEIER, T. Avaliação endocrinológica do ciclo ovariano de macaco bugio (*Alouatta caraya*-HUMBOLDT, 1812) por meio de extração e dosagem de metabólitos de esteróides fecais (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo), 2005.

LEMOS DE SÁ, R. M.; POPE, T. R.; GLANDER, K. E.; STRUHSAKER, T. T. & FONSECA, G. A.B. A pilot study of genetic and morphological variation in the muriqui (*Brachyteles arachnoides*). Primate Conservation 11: 26-30,1990.

LEMOS DE SÁ, R. M.; GLANDER, K. E. Capture techniques and morphometrics for the woolly spider monkey, or muriqui (*Brachyteles arachnoides*, E. Geoffroy 1806). American Journal of Primatology, v. 29, n. 2, p. 145-153, 1993.

LESSA, M. A. M. Bem estar de macacos pregos no cativeiro: engenharia comportamental no enriquecimento ambiental e análise da dinâmica espacial. Tese de Doutorado em Teoria e Pesquisa do comportamento. Universidade Federal do Pará, Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento, Belém, 2013.

MELO, F. R.; DIAS, L. G. Muriqui populations reported in the literature over the last 40 years. Neotrop Primates, v. 13, n. ssuppl, 2005.

MELO, F. R. DE; JERUSALINSKY, L. Distribuição geográfica e conservação dos muriquis: passado e presente. Em: MENDES, S. L.; AGUIRRE, V. DE (Eds.). O mono, de Alvaro Aguirre. Santa Teresa, Espírito Santo: Instituto Nacional da Mata Atlântica, 2024.

MELO, F.R. *et al.* *Brachyteles hypoxanthus* (versão alterada da avaliação de 2019). A Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN2021: e. T 2994A191693399. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021.RLTS.T2994A191693399>, 2021.

MELO F. R., *et al.*, Muriqui House: conservation management to support the recovery of the northern muriqui *Brachyteles hypoxanthus* in Ibitipoca, Minas Gerais, Brazil. *Oryx*. 2024;58(6):715-719. doi:10.1017/S0030605324000644, 2024.

MELO, F.R., *et al.*, *Brachyteles hypoxanthus*. Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade - SALVE. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio. Disponível em: <https://salve.icmbio.gov.br>, 2025.

MITTERMEIER, R. A.; *et al.*, Primates in peril: the world's 25 most endangered primates, 2004–2006. *Primate Conservation*, v. 2006, n. 20, p. 1-28, 2006.

NEDRESKY, D.; SINGH, G. *Physiology, luteinizing hormone*, 2019.

PALME, R.; TOUMA, C.; ARIAS, N.; DOMINCHIN, M. F.; LEPSCHY, M. *Steroid extraction: get the best out of faecal samples*, 2013.

POSSAMAI C. B., YOUNG R.J., MENDES S.L., STRIER K.B. Socio-sexual behavior of female northern muriquis (*Brachyteles hypoxanthus*). *Am J Primatol.* 2007 Jul;69(7):766-76. doi: 10.1002/ajp.20399. PMID: 17294434, 2007.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2025.

ROBBINS, M. M.; CZEKALA, N. M. A preliminary investigation of urinary testosterone and cortisol levels in wild male mountain gorillas. *American Journal of Primatology*, v. 43, n. 1, p. 51-64, 1997.

SHIMIZU, K. Studies on reproductive endocrinology in non-human primates: application of non-invasive methods. *Journal of Reproduction and Development*, 51(1), 1-13, 2005.

SILVA, L.P., *et al.* New records of the southern muriqui (*Brachyteles arachnoides*) in Serra da Mantiqueira through thermal drones. *Primates* 66, 367–374. <https://doi.org/10.1007/s10329-025-01194-4>, 2025.

STOLWIJK, A. M.; STRAATMAN, H. M. P. M.; ZIELHUIS, G. A. Studying seasonality by using sine and cosine functions in regression analysis. *Journal of Epidemiology & Community Health*, v. 53, n. 4, p. 235–238, 1999.

STRIER, K. B. New World primates, new frontiers: Insights from the woolly spider monkey, or muriqui (*Brachyteles arachnoides*). *International Journal of Primatology*, 11: 7–19, 1990.

STRIER, K. B. Diet in one group of woolly spider monkeys, or muriquis (*Brachyteles arachnoides*). *American Journal of Primatology* 23: 113–126, 1991.

STRIER, K. B. Growing up in a patrifocal society: sex differences in the spatial relations of immature Muriquis. In: *Juvenile Primates: Life history, development, and behavior* (M.E. Pereira and L.A. Fairbanks, Eds), pp. 138-147. Oxford University Press, New York, 1993.

STRIER, K. B. Reproductive ecology of female muriquis (*Brachyteles arachnoides*). Em Norconk, M. A., Rosenberger, A. L. & Garber, P. A. (Eds.), *Adaptative radiations of neotropical primates* (pp. 511-532). New York, NY: Plenum Press, 1996.

STRIER, K. B. Faces in the forest: the endangered miqui monkeys of Brazil. Harvard University Press, 1999.

STRIER, K. B. Population Viabilities and Conservation Implications for Miquis (*Brachyteles arachnoides*) in Brazil's Atlantic Forest 1. *Biotropica*, v. 32, n. 4b, p. 903-913, 2000.

STRIER, K. B. Primate behavioral ecology. Routledge, 2016.

STRIER, K. B.; ZIEGLER, T. E. Behavioral and endocrine characteristics of the reproductive cycle in wild miqui monkeys, *Brachyteles arachnoides*. *American Journal of Primatology*, v. 42, n. 4, p. 299-310, 1997.

STRIER, K. B.; ZIEGLER, T. E. Lack of pubertal influences on female dispersal in miqui monkeys (*Brachyteles arachnoides*). *Animal Behavior* 59: 849–860, 2000.

STRIER, K. B.; ZIEGLER, T. E. Variation in the resumption of cycling and conception by fecal androgen and estradiol levels in female miquis (*Brachyteles hypoxanthus*). *American Journal of Primatology*, 67, 69–81, 2005.

STRIER K. B., MENDES S.L., SANTOS R.R. Timing of births in sympatric brown howler monkeys (*Alouatta fusca clamitans*) and northern miquis (*Brachyteles arachnoides hypoxanthus*). *Am J Primatol.* Oct;55(2):87-100. doi: 10.1002/ajp.1042. PMID: 11668527, 2001.

STRIER, K. B.; LYNCH, J. W.; ZIEGLER, T. E. Hormonal changes during the mating and conception seasons of wild northern miquis (*Brachyteles arachnoides hypoxanthus*). *American Journal of Primatology*, 61, 85–99, 2003.

STRIER, K. B.; *et al.* Demographic monitoring of wild miqui populations: criteria for defining priority areas and monitoring intensity. *PLoS One*, v. 12, n. 12, p. e0188922, 2017.

SUGIANTO, N. A., DEHNHARD, M., NEWMAN, C.; MACDONALD, D. W.; BUESCHING, C. D. A non-invasive method to assess the reproductive status of the European badger (*Meles meles*) from urinary sex-steroid metabolites. *General and Comparative Endocrinology*, 301, 113655, 2021.

TABACOW, F. P. *et al.*, Demographic effects of the translocation of a female northern miqui (*Brachyteles hypoxanthus*) in an Atlantic Forest fragment in Minas Gerais, Brazil. *Primate Conservation*, 35, 21-35, 2021.

WOOD, S. N. Generalized additive models: an introduction with R. 2. ed. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, 2017.

ZIEGLER, T., AND STOTT, G. Determination of estrogen concentrations and ovulation detection in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) by an enzymatic technique. In D. M. Taub and F. E. King (eds.), *Current Perspectives in Primate Biology* (pp. 42–58). New York: Van Nostrand Reinhold. 1986.

ZIEGLER, T. E.; MATTERI, R. L.; WEGNER, F. H. Detection of urinary gonadotropins in callitrichid monkeys with a sensitive immunoassay based upon a unique monoclonal antibody. *American Journal of Primatology*, v. 31, n. 3, p. 181-188, 1993.

ZIEGLER, T. E., *et al.* 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. *Biol. Reprod.* 54: 91–99, 1996.

ZIEGLER, T. E.; SANTOS, C. V.; PISSINATTI, A.; STRIER, K. B. Steroid Excretion during the Ovarian Cycle in Captive and Wild Muriquis, *Brachyteles Arachnoides*. *American Journal of Primatology* v. 42, n. 4, p. 311-321, 1997.

ZIEGLER, T. E.; WITTEWER, D. J. Fecal steroid research in the field and laboratory: improved methods for storage, transport, processing, and analysis. *American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists*, 67(1), 159-174. 2005.

ZIEGLER, T.E., STRIER, K.B., VAN BELLE, S. The Reproductive Ecology of South American Primates: Ecological Adaptations in Ovulation and Conception. In: Garber, P.A., Estrada, A., Bicca-Marques, J.C., Heymann, E.W., STRIER, K.B. (eds) *South American Primates. Developments in Primatology: Progress and Prospects*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78705-3_8. 2009

ZUUR, A. F., *et al.* *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R*. New York: Springer, 2009

