

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ESTUDO COMPORTAMENTAL, REPRODUTIVO E  
MOLECULAR DE AVESTRUZ (*Struthio camelus*)

Autora: Denise Nunes Araujo  
Orientador: Prof. Dr. Orlando Rus Barbosa  
Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rejane Machado Cardoso

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Janeiro – 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ESTUDO COMPORTAMENTAL, REPRODUTIVO E  
MOLECULAR DE AVESTRUZ (*Struthio camelus*)

Autora: Denise Nunes Araujo  
Orientador: Prof. Dr. Orlando Rus Barbosa  
Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rejane Machado Cardoso

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de Concentração Produção Animal.

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Janeiro – 2009

"As pessoas que vencem neste mundo são as que procuram as circunstâncias de que precisam e, quando não as encontram, as criam."  
Bernard Shaw - Filósofo

*Ao meu filho, Maurício, que me ensinou o verdadeiro sentido do verbo AMAR.*

*Aos meus pais, por tudo o que fizeram e fazem por mim.*

*Ao meu namorado, Sérgio, pela paciência e compreensão*

*A minhas irmãs, Daniela e Letícia, pelo incentivo e amizade.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por ter me concedido o dom da vida.

Ao Prof. Dr. Orlando Rus Barbosa, pela orientação, ensinamentos, estímulo e amizade.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rejane Machado Cardoso, pela co-orientação, ensinamentos, amizade e credibilidade em mim depositado.

À Universidade Estadual de Maringá, por possibilitar-me desenvolver este trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa que possibilitou a condução do experimento.

Aos meus pai, Herculano e Oliva, pelo incentivo e apoio.

Às minhas irmãs, Daniela e Letícia, pelo carinho e amizade.

Aos professores do Programa de pós-graduação em Zootecnia, pelos valiosos ensinamentos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Gasparino, pelo auxílio na condução das análises, apoio e amizade a mim concedido.

Ao Prof. Dr. Ricardo Pereira, pela disponibilidade do Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual de Maringá, que possibilitou a realização das análises laboratoriais do presente estudo.

Ao Sítio Santo Antônio, especialmente ao Dr. Antônio Calvo, pela contribuição e auxílio nos trabalhos realizados em sua propriedade, imprescindível na realização desta pesquisa.

Aos funcionários do Sítio Santo Antônio, Néia, Maguila e Leandro, pelo auxílio na condução do experimento,

Aos funcionários Célio, da Fazenda Experimental de Iguatemi - FEI, e Josimar, da Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Maringá, CODAPAR, pela atenção durante os trabalhos de campo.

Às minhas amigas, Janaína, Daniele Amaral, Daniely Blank, Débora Sommer Marques, Carina Scherer, Marcela Matavelli, Ana Cláudia, Patrícia Gomes, Ítala e Gislaine.

Ao meu amigo Marcelo Simões.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Denise Nunes Araujo, filha de Herculano Volpato Araujo e Oliva de Oliveira Nunes Araujo, nasceu em Nova Londrina, em 28 de agosto de 1979.

Em março de 1997, iniciou o Curso de Graduação em Zootecnia, na Universidade Estadual de Maringá, concluindo-o em dezembro de 2001.

Em março de 2003, iniciou o Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Mestrado, Área de Concentração em Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, desenvolvendo estudos na área de animais silvestres, concluindo-o em maio de 2005.

Em março de 2005, iniciou o Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Doutorado, Área de Concentração em Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, desenvolvendo estudos na área de animais silvestres, comportamento animal e biologia molecular.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
I – INTRODUÇÃO.....	1
Introdução Geral.....	1
1. Classificação e características da espécie.....	3
2. Incubação artificial.....	5
3. Comportamento animal.....	7
3.1 Comportamento reprodutivo e sistemas de acasalamento.....	9
3.2 Comportamento reprodutivo do avestruz.....	9
4. Extração do DNA e sua aplicação na Estrutociultura.....	10
Referência Bibliográfica.....	13
II – OBJETIVOS GERAIS.....	20
III – Influência do ambiente na de incubação e qualidade de casca de ovos de avestruzes ( <i>Struthio camelus</i> ).....	21
Resumo.....	21
Abstract.....	22
Introdução.....	23
Material e Métodos.....	24
Resultados e Discussão.....	26
Conclusões.....	31
Literatura Citada.....	31
IV – Aspectos Comportamentais e Reprodutivo de Avestruzes ( <i>Struthio camelus</i> ).....	35
Resumo.....	35
Abstract.....	36
Introdução.....	37
Material e Métodos.....	38
Resultados e Discussão.....	39
Conclusões.....	45
Literatura Citada.....	46
V – Método alternativo de coleta e armazenamento de sangue para obtenção de	49



DNA em avestruzes ( <i>Struthio camelus</i> ).....	
Resumo.....	49
Abstract.....	50
Introdução.....	51
Material e Métodos.....	52
Resultados e Discussão.....	54
Conclusões.....	59
Literatura Citada.....	59
VI – CONCLUSÕES GERAIS.....	61

## LISTA DE TABELAS

		Página
III	Influência do ambiente na de incubação e qualidade de casca de ovos de avestruzes ( <i>Struthio camelus</i> ).....	21
Tabela 1	Influência das condições do ninho sobre os índices da incubação dos ovos de avestruzes ( <i>Struthio camelus</i> ).....	26
Tabela 2	Valores médios da temperatura do ar e peso dos ovos de avestruzes ( <i>Struthio camelus</i> ).....	27
Tabela 3	Valores médios da espessura da casca, matéria mineral e porcentagem de cálcio de ovos de avestruzes ( <i>Struthio camelus</i> ).....	28
Tabela 4	Média observada e estimada, distribuição de probabilidade e intervalo de confiança do parâmetro número de poros dos ovos de avestruzes ( <i>Struthio camelus</i> ).....	29
IV	Aspectos Comportamentais e Reprodutivo de Avestruzes ( <i>Struthio camelus</i> ).....	35
Tabela 1	Média dos valores percentuais e transformados (Arcsen $\sqrt{X\%}$ ) das frequências dos comportamentos observados durante o período das 9:00 até as 18:00 horas.....	40
V	Método alternativo de coleta e armazenamento de sangue para obtenção de DNA em avestruzes ( <i>Struthio camelus</i> ).....	49
Tabela 1	Seqüência dos primers do hormônio do crescimento (GH) desenhados de acordo com a seqüência do gene GH em bovinos.....	54
Tabela 2	Médias das variáveis: comprimento de onda 260nm e 280nm, razão ( $A_{260}/A_{280}$ ) e concentração de DNA (ng/ $\mu$ L) em função do período de armazenamento.....	56

## LISTA DE FIGURAS

		Página
I	Introdução Geral.....	01
Figura 1	Principais ratitas criadas comercialmente: Avestruz ( <i>Struthio camelus</i> ), Ema ( <i>Rhea americana</i> ) e Emú ( <i>Dromaius novaehollandiae</i> ).....	02
IV	Aspectos Comportamentais e Reprodutivo de Avestruzes ( <i>Struthio camelus</i> ).....	35
Figura 1	Relação entre os comportamento pastando e em pé ereto/parado durante o período das 9:00 às 18:00.....	41
Figura 2	Relação entre os comportamento comendo ração e deitado durante o período das 9:00 às 18:00.....	42
Figura 3	Relação entre os comportamento correndo/caminhando e rodopiando/fugindo durante o período das 9:00 às 18:00.....	44
V	Método alternativo de coleta e armazenamento de sangue para obtenção de DNA em avestruzes ( <i>Struthio camelus</i> ).....	49
Figura 1	Concentração de DNA (ng/ $\mu$ L) e razão DNA/proteína ( $A_{260}/A_{280}$ ), no sangue de avestruzes ( <i>Struthio camelus</i> ).....	55
Figura 2	Eletroforese em gel de agarose (0,8%) contendo amostras de DNA genômico nos períodos de armazenamento.....	56
Figura 3	Eletroforese em gel de agarose 1,5% das amplificação com o <i>primer</i> GHbovino.....	58

## RESUMO

No presente estudo objetivou-se avaliar o efeito do clima sobre os índices reprodutivos e o comportamento, e ainda avaliar métodos alternativos de coleta e estocagem de amostras de DNA genômico de avestruzes (*Struthio camelus*). Foram coletados 300 ovos de avestruzes no período de julho a outubro de 2007 e anotadas as condições do ninho no momento da coleta. Ao total, 31 matrizes realizaram postura, com média de 11 ovos postos/matriz e variação de 1 a 25 ovos postos/matriz durante todo o período. O perfil de incubação para ovos de avestruzes coletados em ninhos secos ou úmidos foram, respectivamente, 66,0 e 54,5 para ovos férteis, 45,0 e 54,5% para ovos eclodidos, 20,5 e 18,2% para ovos inférteis, 21,0 e 0% para mortalidade embrionária total, 13,5 e 27,3% para ovos contaminados. As médias da temperatura do ar foram de 29 e 25°C, e peso dos ovos foram de 1,298 e 1,276 kg para ninho seco e úmido, respectivamente. Os valores obtidos para qualidade da casca de ovos de avestruzes foram de 1,84 mm para espessura média, 93% para matéria mineral, 23% para concentração de cálcio e de 12,79 poros/cm<sup>2</sup> para número de poros. Os índices reprodutivos aumentaram durante o período de observações, porém não atingiram seu pico considerando que as matrizes ainda não haviam atingido seu pico reprodutivo. À medida que a temperatura aumentou, também aumentou o índice de postura das matrizes. Para avaliação do comportamento, os casais de avestruzes foram mantidos em piquetes em um criatório comercial e observados durante os meses de maio de 2007 a janeiro de 2008. O método utilizado para medir o comportamento foi o scan por um período de 9 horas consecutivas, com intervalos de 5 minutos. Os comportamentos mais freqüentes foram o pastando e em pé/parado, seguidos de correndo/caminhando e ropiando/fugindo, comendo ração e deitado. O comportamento pastando teve sua maior freqüência (43%) no fim do dia, enquanto comendo ração aumentou gradativamente até atingir o seu pico ao entardecer (9%), apesar da ração ser fornecida no período da manhã. Os comportamentos que apresentaram maior freqüência, em ordem decrescente, foram Pastando e Em pé/parado (43%), Correndo/caminhando (34%), Comendo ração (9%), Deitado (7%) e Rodopiando/fugindo (2%). Os animais diminuíram suas atividades nas horas mais quente do dia, permanecendo mais ativos ao amanhecer e entardecer. Também foram coletadas amostras de sangue de avestruzes (*Struthio camelus*) em papéis tipo filtro e armazenadas a temperatura ambiente. As extrações de DNA foram realizadas após 24 horas da coleta e em intervalos de 7 dias, utilizando-se o protocolo com CTAB. Foram realizadas leituras de absorbâncias no comprimento de onda de 260 e 280 nanômetros, para determinar o grau de pureza ( $A_{260nm}/A_{280nm}$ ) e a concentração de DNA. As

amplificações foram realizadas utilizando *primers* para o gene do hormônio do crescimento de bovino (GHbovino). As leituras  $A_{260}$ ,  $A_{280}$  e concentração de DNA diminuíram no decorrer do período, e a razão  $A_{260}/A_{280}$  aumentou. Todas as amostras apresentaram DNA genômico íntegro e com amplificações positivas, concluindo-se portanto, que o método testado pode ser utilizado em processos moleculares de maneira eficiente.

**Palavras-chaves:** avestruz, comportamento, extração de DNA, incubação artificial, variáveis climáticas.

## ABSTRACT

The aim of this study was to assess climate effect towards reproductive indexes and behavior, in despite of to evaluate alternative methods of collecting and storage genomic DNA of Ostrich (*Struthio camelus*). It was collected 300 Ostrich's eggs between July/2007 and October/2007 and its nets' conditions documented at the moment of each collection. Totaling 31 females were in laying season, with the average of 11 eggs layed/female and its variation ranging from 1 to 25 eggs layed/female during this timeframe. Incubation's profile to the Ostrich's eggs collected in dry or wet nests were, respectively, 66.00 and 54.5 for fertile eggs; 45.0 and 54.5% for hatched eggs; 20.5 and 18.2% for infertile eggs; 21.0 and 0% to the total embryonary mortality; 13,5 and 27,3% to contaminated eggs. Weather averages were between 29°C and 25°C, and egg's weight were 1.298 and 1.276 kg to dry and wet nests, respectively. Numbers achieved of the quality to Ostrich's eggs peel were 1.84 mm for the average thickness, 93% for mineral material, 23% to calcium concentrate and 12.79 poros/cm porous number. Reproductive's rates increased during the observation period, however did not achieve its peak considering that the females had not yet achieved its reproductive peak. As the temperature increased, the females indexes of laying increased. To assess the behavior, Ostrich pairs were kept on a commercial farm and observed during may/2007 to january/2008. The method used to assess the behavior was the "scan" during 9 hours, in intervals of 5 minutes. The most frequent behaviors were grazing and standing/stopped, followed by running/walking and escaping, feeding on concentrate food and lay down. Grazing has higher frequency (43%) at end of the day, and feeding on concentrate food increase till reach the most higher frequency (9%), in despite of concentrate ration being delivered during the morning. Both feeding and grazing combined took up over 50% of the time and running about 40%. Behaviors whom shown major frequency, in decrease order, were Grazing and Standing/stopped (43%), Running/walking (34%), feeding on concentrate food (9%), Lay down (7%) and Escaping (2%). Animals demonstrated being less actives during hot periods in the day, increasing their activities at dusk. Also were collected blood samples of ostriches (*Struthio camelus*) in *filter* papers and stored at room temperature. DNA extractions were made 24 hours after collected and each seven days period using CTAB protocol. Absorbance lectures were made at 260 and 280 nm and determined the degree of purity ( $A_{260nm}/A_{280nm}$ ) and DNA concentration. Amplifications were made, using *primers* to bovine growth hormone gene (GHbovine). The lectures  $A_{260}$ ,  $A_{280}$  and DNA concentration decrease during the period, and ratio

$A_{260}/A_{280}$  increase. All samples shown genomic DNA and positive amplicons, so we conclude that method tested could be used in molecular process as an efficient way.

**Key-words:** artificial incubation, behavior, climate variables, DNA extraction, ostrich.

## INTRODUÇÃO GERAL

As ratitas são aves corredoras que apresentam características anatômicas e fisiológicas que as diferenciam das aves carinatas (aves que voam), ou seja, são incapazes de voar, não possuem musculatura no peito para vôo e nem quilha sobre o osso esterno (Sick, 1997), e tampouco possuem ossos pneumáticos. As asas são rudimentares e apresentam dedos vestigiais (Anderloni, 1998; Buxade, 1999).

Dentre as ratitas, as espécies mais exploradas comercialmente são: Avestruz (*Struthio camelus*), Emú (*Dromaius novaehollandiae*) e Ema (*Rhea americana*) (Giannoni, 1999). Populações selvagens de ratitas tem sido detrimentalmente afetadas por atividades humanas (Burcher & Nores, 1988; Carman, 1988; Martella et al., 2000). A partir dos anos 90, o número de fazendas de ratitas apresentou um crescimento acelerado em países como EUA, Canadá e alguns países da Europa (Chapman & Bass, 1994; Deeming & Angel, 1996; Carbajo et al., 1997; Castelló, 1998; Dey, 1998; Gillespie & Schupp, 1998). Esta atividade também apresentou destaque em países como Argentina, Uruguai e Brasil (Giannoni, 1996; Navarro, 1999; AUCRIÑA, 2000).

À medida que a indústria de ratitas, especialmente do avestruz, expande-se por todo o mundo, os problemas como alto custo de investimento com infra-estrutura, rebanho, alimentação e mão-de-obra tornaram-se aparentes. Convém destacar que os avestruzes são aves exóticas, exigindo elevado custo com quarentena, documentação e transporte. No Brasil, a ema por ser uma ave nativa, os custos com a formação do plantel são menores, por não dependerem de importação, porém, o pequeno número de produtores de matrizes dificulta o início da criação (Giannoni, 1998). A criação comercial de ema é uma alternativa de diversificação e/ou integração de sistemas produtivos dentro da propriedade, respeitando-se os conceitos de produção



economicamente viável e ecologicamente sustentável. Para se obter sucesso na criação de emas, é importante que o criador conte com respaldo técnico-científico nas áreas de nutrição, reprodução, genética, sanidade, ambiência, etologia e manejo, denominados fatores produtivos, os quais fornecem subsídios para melhorar os desempenhos reprodutivo e produtivo dos sistemas de criação (Morata et al., 2006).



Avestruz (*Struthio camelus*)



Ema (*Rhea americana*)



Emú (*Dromaius novaehollandiae*)

**Figura 1.** Principais ratitas criadas comercialmente: Avestruz (*Struthio camelus*), Ema (*Rhea americana*) e Emú (*Dromaius novaehollandiae*).

Fonte: Google.

No Brasil, em um passado não muito distante, o mercado mais favorável era o comércio de reprodutores de avestruz, contudo, nos últimos tempos, a indústria está atingindo um patamar em que o aumento da disponibilidade de aves resultou em um decréscimo no preço destes animais, criando um mercado para o abate, necessário para o amadurecimento da indústria. Atualmente, os principais produtos da indústria de

ratitas são a carne, o couro e as plumas (Toledo & Tavares, 2003). Todavia, para ser considerado um animal economicamente viável, é preciso caracterizar os rendimentos de seus produtos, como carne magra, gordura e ossos (Sales et al., 1997). Além disso, a carne de ratitas não possui oferta constante e sobretudo tem que competir com a carne de bovinos, aves, suínos para aceitação do consumidor. É muito importante pesquisar as opções de mercado e considerar tais fatores como a estabilidade, custo de produção incluindo ambos os custos fixos e variáveis, e regulamentações estaduais e federais.

A criação de emas e avestruzes de maneira racional poderia aumentar as opções da avicultura brasileira e a produção alternativa de proteína animal; a evolução no desempenho zootécnico verificado em aves totalmente domesticadas, como a galinha por exemplo, indica que se partiu de índices produtivos semelhantes ao observados ainda na condição selvagem da ave e, por meio da atuação multidisciplinar das diferentes áreas da zootecnia e veterinária, concentrou-se esforços numa única direção, tornando a atividade economicamente viável (Peixoto, 2002).

### **1. Classificação e características da espécie**

O avestruz (*Struthio camelus* Linnaeus, 1758), pertence ao grupo das ratitas, ordem Struthioniformes (Cooper et al., 1992). Dentro da família Struthionidae são descritas seis subespécies de avestruzes, porém apenas quatro delas existem na atualidade. As subespécies se distinguem por características fenotípicas dos indivíduos adultos como tamanho corporal, coloração da pele, tamanho e porosidade do ovo, presença ou ausência de uma área desnuda na cabeça, e uma banda de plumas brancas ao redor do colo (Buxade, 1999; Bezuidenhout, 1999). As subespécies existentes de *Struthio camelus* são as seguintes: *Struthio camelus australis*, Gurney; *Struthio camelus camelus*, Linnaeus; *Struthio camelus massaicus*, Neumann e *Struthio camelus molybdophanes*, Reichenow. Utiliza-se *Struthio camelus domesticus* para referir-se aos animais que são explorados para produção e que têm sido domesticados (Giannoni, 1996).

A criação comercial de avestruzes é denominada Estrutiocultura, proveniente do seu nome de origem *Struthio camelus*. No meio comercial, o avestruz está classificado em três raças: Red Neck, Blue Neck e African Black. Este último originário do cruzamento de três subespécies (*australis*, *camelus* e *syriacus*). Esta classificação das raças se baseia na coloração da pele dos animais adultos, pois todos apresentam a mesma coloração de plumas. No âmbito mundial, o líder indiscutível no setor de

estruturocultura é a África do Sul, com cerca de 80% da produção mundial (Van Zyl, 1999).

O avestruz é a maior ave viva não voadora no mundo, pois um animal macho adulto pesa entre 100 a 130 kg, e a fêmea de 90 a 110 kg (Dunning, 1993). São bem adaptados a vida no deserto e em regiões áridas, sendo que aparentam não ser dependentes de água, mas em cativeiro bebem água freqüentemente. São mais ativos no início da manhã e no fim da tarde, entretanto são muito tolerantes ao calor e raramente procuram sombra. Sua temperatura corporal pode aumentar apreciavelmente durante a exposição ao sol sem demonstrarem aparente calor, uma adaptação fisiológica adquirida (Ullrey & Allen, 1996).

O macho quando adulto é maior que a fêmea e tem plumagem diferenciada, com plumas pretas pelo corpo e brancas nas pontas das asas e cauda. A fêmea possui plumagem acinzentada ou amarronzada. O dimorfismo sexual torna-se evidente dos seis aos 10 meses de idade. Atingem a maturidade sexual dos dois aos quatro anos de vida, observando vários fatores que afetam a maturidade, tais como: subespécie, estação, condição nutricional, condições ambientais e instalações. São aves dependentes do fotoperíodo, entrando na estação de reprodução durante períodos de aumento de luz. No hemisfério norte, o início do acasalamento se dá em março e termina entre agosto e setembro (Leuthold, 1977), e no hemisfério sul, começa entre julho e agosto e finaliza em março (Jarvis et al., 1985). Segundo Tully & Shane (1996), iniciam a reprodução em maio até setembro nos EUA. Em média, o período de acasalamento varia de seis a oito meses no ano, sendo dependente da latitude e altitude (Shanawany, 1988).

Os ovos do avestruz pesam em média 1.500g (variação de 1.300 a 1.900), e o peso da casca corresponde a 20% do peso do ovo. A casca do ovo é composta principalmente por carbonato de cálcio e as concentrações de cálcio ficam por volta de 40% (Ullrey & Allen, 1996). Os machos, no período reprodutivo, são mais agressivos, apresentando as plumas mais brilhantes e com a canela de cor avermelhada. Realizam um cortejo típico e assentam-se no solo na presença da fêmea, ou mesmo do tratador ou de visitantes (Souza, 2004). As fêmeas adultas iniciam a postura por volta dos 2 aos 3 anos de idade e permanecem férteis por cerca de 40 anos; durante este período, a produção anual varia de 20 a 70 ovos (Cooper, 2001).

Para ganhar competitividade na arena da agricultura comercial, a indústria do avestruz deve focar no aumento da sobrevivência dos filhotes, maximizando o

crescimento e reduzindo custos associados à alimentação (Giannoni, 2000). Os fatores que afetam o crescimento em avestruzes são similares aqueles que afetam outras espécies de aves e incluem a dieta, ambiente de criação, potencial genético, manejo e “status” sanitário. Porém, a influência do ambiente de criação sobre o crescimento de avestruzes ainda não está documentado ainda. Atualmente, os avestruzes são criados sobre uma variação grande de densidades de estocagem, variando entre 16 a 40 m<sup>2</sup>/ave (Verwoed et al., 1999). Em outras espécies de aves, a quantidade de espaço disponível altera o comportamento (Lewis & Hurnick, 1990; Andrews et al., 1997; Carmichael et al., 1999) e influencia a saúde e a performance individual do animal (Proudfoot et al., 1979; Shanawany, 1988). Pesquisas focadas em espaço adequado podem levar a alterações de manejo que podem diminuir o estresse e subseqüentemente levar ao aumento da sobrevivência e crescimento dos avestruzes (Neri, 2007).

Segundo Cooper (2001), os maiores obstáculos da estrutiocultura são ovos inférteis, mortalidade embrionária e deformidades nas patas após o nascimento e, portanto, a seleção de reprodutores e nutrição adequada são vitais para garantir um bom desempenho de produção de ovos, embrionário e dos filhotes. Van Schalkwyk et al (1996) demonstraram correlação fenotípica entre a produção total de ovos e a produção de ovos eclodidos, com valores para produção de ovos ( $r^2 = 0,81$ ), eclodibilidade ( $r^2 = 0,73$ ), mortes embrionárias ( $r^2 = -0,21$ ) e infertilidade ( $r^2 = -0,58$ ).

## **2. Incubação artificial**

O embrião nas fases iniciais do desenvolvimento age como um organismo de sangue frio (poiquilotermo), sofrendo influência direta da temperatura do meio ambiente. Segundo Drent (1975), para a maioria das aves, a temperatura para o início do desenvolvimento embrionário encontra-se por volta de 25-27°C. Gonzales & Cesario (2003) indicam que temperaturas abaixo de 24°C paralisam o desenvolvimento embrionário das aves e, dessa forma, é denominada de zero fisiológico. Contudo, de acordo com Horbanczuk (2002), o “zero fisiológico” para o avestruz é 21°C.

O armazenamento de ovos para posterior incubação deve ser em ambientes com temperaturas inferiores ao zero fisiológico para assegurar a parada completa do desenvolvimento embrionário até o momento do início da incubação. Essa prática permite que se obtenha nascimentos mais uniformes, uma vez que assegura a incubação de ovos com desenvolvimento embrionário similares. Nesse período, para conservar a

integridade do embrião, é importante manter a umidade relativa, a ventilação adequada e a temperatura (Nilipour et al., 1995).

O manejo dos ovos de ratitas é peça fundamental para uma incubação com resultados satisfatórios desde a coleta até a chegada ao incubatório. Segundo Dani (1993), são necessários cuidados básicos durante a coleta, como utilização de sacos plásticos descartáveis, coletar o ovo com rapidez, transporte adequado em caixas revestidas com isopor e em condições de temperatura não muito elevadas.

Muitos fatores além do armazenamento e das condições de incubação, afetam a eclodibilidade, dentre eles a seleção da fêmea e do macho reprodutor, nutrição do plantel reprodutor, doenças de transmissão vertical ou que indiretamente afetam a qualidade do ovo (porosidade da casca, forma do ovo), idade das matrizes e porcentagem de postura (Decuypere et al., 2003). Narushin & Romanov (2002) demonstraram que a porosidade e a espessura da casca são os fatores de maior influência sobre o desenvolvimento embrionário, e ovos com maior espessura de casca tiveram melhores índices na incubação. Condições ambientais antes e durante a incubação incluindo o tempo de estocagem, temperatura, umidade, níveis de CO<sub>2</sub> e a orientação dos ovos influenciam a eclodibilidade de ovos de avestruz (Meijerhof, 1992; Mellet, 1993). Já o tempo de incubação sofre influencia de diversos fatores como a temperatura e a umidade usada no processo (Flôres, 2004). Temperatura acima do ideal encurta o tempo de incubação, enquanto a temperatura abaixo do ideal estende tal período (Souza, 2004). A temperatura é o fator ambiental mais importante e crítico que afeta diretamente a eclodibilidade (Decuypere et al., 2003). Barott (1937) sugeriu que a variação na temperatura não deve ser superior a  $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$ , determinando assim os limites superior e inferior da temperatura de incubação. Uma questão a ser considerada é que o padrão de crescimento dos órgãos, bem como dos sistemas funcionais, não são idênticos durante o desenvolvimento embrionário. Isso implica que variações na temperatura e na velocidade do desenvolvimento embrionário, que são limitados pelo tempo, não alteram a eclodibilidade, mas podem afetar o crescimento proporcional e/ou os processos funcionais do embrião e das aves adultas em uma via diferencial, dependendo do período no qual a variação de temperatura é aplicada (Decuypere et al., 2003).

A tolerância para variações de temperatura a partir da temperatura padrão (36,5°C) para avestruzes e emas, segundo Tully & Shane (1996) está diretamente relacionada com a duração da exposição, sendo menor a tolerância para temperaturas acima do que abaixo desta. Entretanto, a umidade relativa do ar (URA) pode variar

muito mais quando comparada às variações da temperatura. Um ovo poderá perder entre 11 a 13% de água durante a incubação, e caso a umidade (URA) no interior da incubadora seja muito baixa, ocorrerá perda excessiva ou atraso na eclosão e redução na eclodibilidade. Já umidade relativa muito alta, os embriões eclodem precocemente, molhados e pegajosos, ou até mesmo sem atingir seu desenvolvimento completo (Decuypere et al., 2003).

A redução da temperatura de incubação durante os últimos dias é uma prática comum, o que pode aumentar a eclodibilidade, pois sabe-se que a produção de calor do embrião aumenta a temperatura do ovo em aproximadamente dois graus acima da incubadora (Romijn & Lokhorst, 1960). De acordo com Giannoni (2000), os ovos de ema são menos susceptíveis às infecções do que os ovos de avestruz pois sua porosidade é menor; ainda, a espessura da casca e tamanho também permitem maior umidade relativa do ar (URA) na incubação em relação ao avestruz.

Foggin & Honywill (1992), indicaram bons resultados incubação de produtores de avestruzes no Zimbábue com temperatura de 36 a 36,5°C e umidade relativa de 20 a 30%. Philbey et al. (1991), demonstraram que a eclodibilidade aumentou na incubação de ovos de 20 a 40% de umidade relativa. A temperatura da incubadora foi baseada em medidas naturais realizadas no ambiente do ninho, variando de 32,9 a 37,1°C, e a média da temperatura do ar de 36,1°C (Swart et al., 1987).

Observações feitas por Sick (1997) determinaram um período de variação no período de incubação natural grande, de 27 a 42 dias para ovos de emas, sendo estas diferenças devidas ao sincronismo na eclosão dos ovos, provocado pela vocalização emitida pelos embriões prontos pra sair de dentro deles. Conforme Huchzermeyer (2000), na natureza o comportamento de vocalização serve para sincronizar o nascimento, pois na incubação artificial o barulho mecânico da incubadora pode impedir que tais sinais sejam transmitidos ou ouvidos, o que poderá levar a necessidade de auxílio no processo de nascimento. Di Campos et al. (2005), sugeriram que o nascimento deve ocorrer o mais naturalmente possível, já que durante este processo, o filhote absorve o saco vitelínico para o interior do abdomen.

### **3. Comportamento animal**

As técnicas de criação como um processo de adaptação a uma condição artificial (cativeiro), implica muitas vezes em negligência às necessidades básicas dos animais e desconsideração do repertório comportamental dos mesmos (Peixoto, 2002). A

preocupação com o bem-estar animal abriu novas linhas de estudo que levaram a obtenção de conhecimentos mais profundos sobre os mesmos, com pesquisas que podem fazer muita diferença no processo produtivo (Tholon, 2002). Levando-se em consideração que a adaptação ao cativeiro é uma condição para a produção em escala de produtos e sub-produtos de origem animal, pode levar os animais a situação de desconforto, induzindo-os ao estresse, com demonstrações comportamentais medo e/ou agressão (Peixoto, 2002). O fato dos animais em cativeiro serem mantidos em grupos maiores quando em situação de natureza, os induzem a um excesso de interações sociais (Francois et al., 1998).

Paranhos da Costa & Cromberg (2001) citaram que os animais possuem sistemas funcionais de controle que atuam na manutenção do equilíbrio do organismo, mantendo estável, a temperatura corporal, o balanço hídrico e as interações sociais; as constantes estimulações do meio agindo sobre os animais acionam esses sistemas, levando-os a buscar os recursos e os estímulos necessários para a manutenção do seu controle. Tholon (2002) afirmou que pouco se sabe sobre o comportamento reprodutivo dos animais e de como este é afetado pelas condições de estresse a que as aves são submetidas em cativeiro. Obtenção de dados coletados na natureza devem ser visto com cuidado, pois podem ser erroneamente interpretados na situação em cativeiro (Francois et al., 1998).

Durante o processo de domesticação, se faz necessário decidir entre investir em comportamentos típicos da espécie e adaptá-los às condições de cativeiro, ou selecionar animais que apresentem respostas comportamentais novas impostas pelo cativeiro, uma vez que o manejo dos animais de produção altera seu comportamento social (Dawkins, 1980). A domesticação correlaciona-se à adaptação ao cativeiro através de combinações de mudanças genéticas ocorridas sobre sucessivas gerações, incluindo as alterações induzidas pelo ambiente no desenvolvimento de cada geração (Peixoto, 2002). As práticas de manejo ou eventos ambientais, influenciam o desenvolvimento de tratos biológicos específicos, o que pode facilitar a adaptação (Price, 1984).

A comparação de estudos de comportamento de aves selvagens e domesticadas em ambientes controlados pelo homem indica que o repertório comportamental das aves em ambientes não-confinados, em geral, é preservado, havendo mudanças na frequência e na intensidade das características comportamentais (Craig, 1992). Barbosa Filho et al. (2007) verificaram que o horário exerce influencia sobre a expressão dos

comportamentos, pois as aves seguem um biorritmo e este está ligado principalmente ao fotoperíodo.

### **3.1 Comportamento reprodutivo e sistemas de acasalamento**

O conjunto de estratégias e interações sociais que ocorrem entre os indivíduos de uma população e formam um contexto dentro do qual tem lugar a união dos gametas denomina-se sistema de acasalamento (Carranza, 1994). Dinamicamente, o acasalamento é a aceção de duas fases sucessivas na reprodução, o pareamento e a cópula. Pode haver ainda uma terceira fase: a corte nupcial que se situa cronologicamente entre as duas já mencionadas (Davis, 1955).

Os vertebrados sociais exibem uma de duas grandes categorias de sistema de acasalamento, a monogamia ou poligamia. A monogamia refere-se a uma ligação de parceiros entre um macho e uma única fêmea, onde ambos os pais participam dos cuidados dos filhotes, e a poligamia refere-se a situação na qual um indivíduo tem mais de um parceiro na estação reprodutiva (Peixoto, 2002). A monogamia é o sistema de acasalamento dominante entre as aves, mais de 90% (Del Hoyo et al., 1992).

Em espécies monogâmicas os parceiros de sexos diferentes são normalmente semelhantes em tamanho e cor, e geralmente os papéis desempenhados por machos e fêmeas durante o cortejo são também comparáveis. Reciprocamente, quase todas as espécies poligâmicas apresentam dimorfismo sexual, com um ou outro parceiro, sendo maiores e de cores mais intensas, invariavelmente os machos em espécies poligínicas e as fêmeas em espécies poliândricas. Este é o resultado previsível de seleção sexual claramente imposto por estes sistemas de acasalamento (Peixoto, 2002).

### **3.2 Comportamento reprodutivo do avestruz**

O avestruz é uma espécie poligâmica; os machos podem se acasalar com todas as fêmeas que adentrem o seu território, bem como as fêmeas podem visitar territórios distintos dominados por machos distintos (Hicks-Allredge, 1998). A postura se organiza com uma ninhada em comum, por dizer, várias fêmeas põe ovos em um mesmo ninho, e a fêmea dominante incubará todos os ovos do ninho (seu e de outras fêmeas) durante o dia, e o macho a noite, e depois de nascido, todos os filhotes serão



cuidados em grupos (Kimwele et al., 1998; Hicks-Allredge, 1998). Estes animais convivem mediante um estabelecimento de relações sociais fortes e ativas, baseadas em dominância e hierarquia (Perez, 1999).

Os avestruzes adultos apresentam um claro dimorfismo sexual em sua plumagem, sendo os machos negros com plumas brancas na extremidade da asa e na cauda. As fêmeas apresentam uma plumagem mais uniforme, marrom e cinza. A cor de suas plumas se explica por mecanismos de adaptação relacionados com a camuflagem, já que o macho incuba os ovos a noite e as fêmeas durante o dia (Anderloni, 1998).

#### **4. Extração de DNA e sua aplicação na Estruticultura**

Um programa de avaliação genética permite a separação de efeitos de resultado de origem genética daqueles de origem ambiental, possibilitando uma adequada identificação de reprodutores e de matrizes a serem utilizados para a multiplicação do rebanho comercial (Caprio & Carrer, 1999). Na estruticultura, as ligações entre características físicas e desempenho precisam de investigação (Huchzermeyer, 2000). Neto & Bered (1998) citaram que, para a obtenção eficiente de ganhos genéticos, é necessário um conhecimento detalhado da constituição e da variabilidade genéticas das espécies. A utilização de técnicas moleculares aplicadas à genética, aliadas às técnicas tradicionais de melhoramento animal poderão proporcionar maior ganho genético, pois podem determinar o potencial do animal, antes mesmo que seu fenótipo seja expresso, pois o grande problema na prática da criação é descobrir indícios das modificações no nível dos progressos da seleção o mais cedo possível, para que se possa modificar o sistema de melhoramento antes que o mesmo se torne ultrapassado.

Marcadores genéticos são características de herança simples que permitem a inferência do genótipo a partir do fenótipo do indivíduo, fornecendo informações importantes para a análise genética de uma espécie (Regitano, 1998). O marcador genético serve para relacionar, favoravelmente, alelos de características quantitativas identificadas no mesmo cromossomo, e sua detecção propicia informações sobre o modo de ação gênica individual e suas interações, auxiliando na compreensão da variação quantitativa e sua utilização prática na produtividade animal (Faria et al., 1999). O desenvolvimento dos marcadores moleculares de DNA foi um grande impacto no estudo genético de animais e plantas; a análise do genoma e a criação de uma mapa genético de alta resolução está se desenvolvendo em grande velocidade graças ao uso

destes marcadores. Um dos principais objetivos da investigação na produção animal é a identificação de regiões do genoma dos animais associadas a características de interesse, sendo estes genes os responsáveis por controlar a expressão de características de importância econômica ou associados a enfermidades (Pigem, 2001).

O uso de técnicas moleculares permite identificar o polimorfismo diretamente do DNA e associar a genes de grande efeito (caracteres qualitativos) (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A associação de diferentes fenótipos tem sido utilizada há longo tempo nos programas de melhoramento (Mitra et al., 1995). Entretanto, com marcadores moleculares, será possível ter, para cada gene de grande efeito, um ou mais marcadores que podem ser utilizados para a identificação do fenótipo desejado (Federizzi, 1998). As tecnologias de marcadores moleculares ou genéticos são vistas como as de maior promessa para uso no melhoramento genético (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Além disso, a utilização de marcadores polimórficos tem tornado o processo de identificação de parentesco mais compreensivo e preciso, além de permitir a rápida eliminação de genes recessivos deletérios de populações (Ledur e Schmidt, 1998).

O reconhecimento de ligação entre efeitos gênicos e segmentos cromossômicos que apresentem herança Mendeliana é muito importante, pois podem aumentar a acurácia na determinação de valores genéticos e tornar mais eficiente a manipulação genética de características que não são facilmente mensuradas tais como: resistência à doenças, características limitadas pelo sexo e de baixa herdabilidade (Rocha et al., 1997).

Com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA. Inicialmente, a utilização de enzimas de restrição permitiu a análise de polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição do DNA (“Restriction Fragment Length Polymorphism” – RFLP) (Grodzicker et al., 1974). Mais recentemente, o desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia utilizando uma DNA polimerase (Polimerase Chain Reaction) levou à descrição de outras classes de marcadores (Mullis et al., 1997).

Por tudo que se tem visto ao longo da história da domesticação do avestruz, a aparição dos híbridos comerciais e a troca dos critérios de seleção dos animais em função do produto primário: plumas, carne e couro, se deduz que a identidade genética dos animais domesticados se perdeu a décadas, e que agora se faz necessário sua recuperação (Pigem, 2001). Os primeiros estudos para a identificação genética das subespécies de avestruzes se realizaram através da análise do DNA mitocondrial (Freitag, 1992; Freitag & Robinson, 1993), e mais recentemente com marcadores

nucleares tipo RAPDs (Bezuidenhout, 1999) e microsátélites (Kumari & Kemp, 1998; Kimwele et al., 1998).

O sangue do avestruz, como das demais aves, possui os glóbulos vermelhos nucleados e, portanto contém DNA (Ganon, 1990). Um mililitro de sangue de avestruz contém aproximadamente a mesma quantidade de células nucleadas que 400ml de sangue humano (Ganon, 1990; Spinu et al., 1999), o que o converte em material biológico para a obtenção do DNA genômico da espécie (Pigem, 2001). Porém, a metodologia se apresenta inadequada em aves com idade inferior a seis meses, devido o tamanho dos vasos sanguíneos, se faz necessário experiência para obter uma quantidade suficiente de sangue sem causar injúrias ao animal. Em adultos, a dificuldade surge devido a problemas de captura e induzir o animal a uma conduta agressiva e perigosa das aves em época reprodutiva. Pigem (2001) citou como vantagem o uso de plumas ao invés da coleta de sangue, três pontos: a facilidade em recolher o material, o fato de poder ser conservada à temperatura ambiente e a análise pode ser realizada mesmo na ausência do animal (por exemplo morte).

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ANDERLONI, G. **La cria del avestruz**. Editorial Mundi-Prensa, 1998. 177p.
- ANDREWS, S. M.; OMED, H. M.; PHILLIPS, C. J. C. The effect of a single or repeated period of high stocking density on the behavior and response to stimuli in boiler chickens. **Poultry Science**, v.76, p.1655-1660, 1997.
- ASOCIACION URUGUAYA DE CRIADORES DE ÑANDÚ. **El Ñandú en números: Datos obtenidos al 10-8-2000**. AUCRIÑA, Boletín Informativo, v.1, n.1, 2000 p.2.
- BARBOSA FILHO, J.A.D.; SILVA, I.J.O.; SILVA, M.A.N.; SILVA, C.J.M. Avaliação dos comportamentos de aves poedeiras utilizando seqüência de imagens. **Engenharia Agrícola**, v. 27, n.1, p.93-99, 2007.
- BAROTT, H. G. **Effect of temperature, humidity, and other factors on hatch of hen's eggs and on energy metabolism of chick embryos**. U.S. Den. Auric. Technical Bulletin, 1937, n.553, p.145.
- BEZUIDENHOUT, C.C. **Studies of population structure and genetic diversity of domesticated and wild ostriches**. South Africa: Rhodes University, 1999. 192p. Thesis (PhD Thesis) – Rhodes University, 1999.
- BURCHER, E. H.; NORES, M. Present status of birds in steppes and savannas of northern and central Argentina. In: Goriup, P. D. (editor) **Ecology and conservation of grassland birds**. ICBP Tech. Publ., n.7, 1998, p.71–79.
- BUXADE, C. **Explotaciones cinérgicas y de avestruces**. Editorial Mundi-Prensa. Madri, 1999.
- CAPRIO, A.; CARRER, C.C. Genética e Melhoramento. In: CARRER, C.C.; KORNFIELD, M.E. (Ed.) **A criação de avestruzes no Brasil**. Pirassununga: Brasil Ostrich, 1999. cap. 1, p. 211-232.

- CARBAJO, G. E.; CASTELLÓ, F. F.; CASTELLÓ, L. J. A. Historia y origen de la producción del avestruz. In: Real Escuela de Avicultura (ed): **Cría de avestruces, emús y ñandúes**. Grinver-Arts Gráficas, Barcelona, 1997, p.19–40.
- CARMAN, R. L. El Ñandú y su extinción en la Provincia de Buenos Aires. In: MAZZINI, V. (Ed). **Apuntes sobre fauna Argentina**. Buenos Aires, 1988, p.107–125.
- CARMICHAEL, N. L.; WALKER, A. W.; HUGHES, B. O. Laying hens in large flocks in a perchery system: influence of stocking density on location, use of resources and behavior. **British Poultry Science**, v.40, p.165-176, 1999.
- CARRANZA, J. **Introducción a la ciencia del comportamiento**. Cáceres: Universidade de Extremadura, Servicio de Publicaciones, 1994.
- CASTELLÓ, F. La cría del avestruz, de dónde venimos y a dónde vamos. **Jornadas Profesionales del Avestruz**, Callella: Spain, p.1,1–1,6, 1998.
- CHAPMAN, H.; BASS, F. **Modern Concepts for commercial Rhea production**. Porter Professional Publ.: Palm City, 1994.
- COOPER, A.; MOURER-CHAUVIRE, C.; CHAMBERS, G.K et al. Independent origins of New Zeland moas and kiwis. **Proceedings on the National Academy of Science**, v.89, p.8741-8744, 1992.
- COOPER, R.G. Handling, incubation, and hatchability of ostrich (*Struthio camelus var. Domesticus*) – Eggs: a review. **Journal Applied of Poultry Research**, v.10, p.262-273, 2001.
- CRAIG, J.V. Measuring social behavior in poultry. **Poultry Science**, Savoy, v.71, p.650-657, 1992.
- DANI, S. **A ema (*Rhea americana*): biologia, manejo e conservação**. Belo Horizonte: Fundação Acangaú, 1993.
- DAVIS, D.E. Breeding biology of birds. In: WOLFSON, S. **Avian Biology**, Urbana: University of Illinois Press, 1955, p.264-308.
- DAWKINS, M.S. Animal Suffering. In: CHAPMAN and HALL (Ed) **The Science of Animal Welfare**, New York, 1980.
- DECUYPERE, E.; MALHEIROS, R.D.; MORAES, V.M.B. et al. Fisiologia do embrião. In: MACARI, M.; GONZALES, E. (Ed.) **Manejo da Incubação**, Campinas, SP: FACTA, 2003. p.67-94.
- DEEMING, D. C.; ANGEL, C. R. Introduction to the ratites and farming operations around the world. In: Deeming, D. C. (ed.): **Proceedings of International Conference: Improving our understanding of Ratites in a farming environment**. Ratite Conference, Manchester: U.K., p.1–4, 1996.
- DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A.; SARGATAL, J. Order Struthioniformes. In: **Handbook of the birds of the world**, Barcelona: Lynx Edicions, v.1, p.75–110, 1992.

- DEY, D. [1998]. Commercial Rhea industry. **Alberta Agriculture, Food and Rural Development**. Disponível em: <[http://agric.gov.ab.ca/agdex/400/484\\_830-3.html](http://agric.gov.ab.ca/agdex/400/484_830-3.html)> Acesso em 09/03/2000.
- DI CAMPOS, M.S.; CARVALHO, I.D.; BRAGA FILHO, A.C. et al. Estimativa de correlações entre medidas morfométricas, peso do ovo e peso de filhotes de emas criados em cativeiro. **Ciência Rural**, v.35, n.3, p.678-683, 2005.
- DRENT, R.H. Incubation. In: FARNER, D.S. & KING, J.R. (Eds) **Avian biology**. London: Academic Press, v.5, p.333-420, 1975.
- DUNNING Jr., J.B. **Handbook of Avian Body Masses**. CRC Press, Boca Raton: Florida, 1993.
- FARIA, F.J.C.; GUIMARÃES, S.E.F., LIMA, R.M.G. et al. Análise de polimorfismo do gene kcaseína em fêmeas da raça nelore e efeito sobre o peso à desmama de suas progênes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.51, n.4, p.377-382, 1999.
- FEDERIZZI, L.C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILACH, S.C.K. (Ed.) **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Sandra Milach, 1998, p. 3-15.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília:Embrapa-Cenargen, 1998,220p.
- FLÔRES, M.L. Avaliação do peso médio de ovos e filhotes de emas (*Rhea americana*) recém-nascidos, em cativeiro, no município de Santa Maria – RS. **A Hora Veterinária**, ano 24, n.139, p.59-61, 2004.
- FOGGIN, C.M.; HONYWILL, J. Observations on the artificial incubation of ostrich (*Struthio camelus* var. *Domesticus*) eggs with special reference to water loss. **Zimbabwe Veterinary Journal**, v.23, p.81-89, 1992.
- FRANÇOIS, N.; MILLS, A.D.; FAURE, J.M. Place preferences of Japanese quail given a permanent choice between a social or a non-social but enriched situation. **Behavioural Processes**, v.43, p.163-170, 1998.
- FREITAG, S. **Intraspecific mitochondrial DNA phylogeography of the ostrich, *Struthio camelus***. South Africa: University of Pretoria, 1992. 91p. Master of Science - University of Pretoria, 1992.
- FREITAG, S.; ROBINSON, T.J. Phylogeographic patterns in mitochondrial DNA of the ostrich (*Struthio camelus*). **The Auk**, v.110, n.3, p.614-622, 1993.
- GANON, W.F. **Fisiologia Médica**, 12ªed. Editorial el Manual Moderno: México, 1990.
- GIANNONI, M. L. Viabilidade da exploração de ratitas em São Paulo. **Biológico**, São Paulo, v.1, n.2, p.91-96, jul./dez, 1998.

- GIANNONI, M.L. Criação de animais silvestres em cativeiro. **I Congresso Brasileiro de conservação e Manejo da Biodiversidade**. Teatro Pedro II Ribeirão Preto, 16 a 19 de agosto de 1999. HOLOS ed. especial, p.129-135.
- GIANNONI, M.L. **Emas & Avestruzes, uma alternativa para o produtor rural**. Jaboticabal, FUNEP,1996, 49p.
- GIANNONI, M.L. Melhoramento Genético de Emas e Avestruzes (Mejoramiento genético del Nandu Y avestruz) In: SEMINÁRIO MANEJO Y PATOLOGIA DEL AVESTRUZ Y OTROS RATITES. **Anais...** Santiago, 26 y 27 de Septiembre, 2000 p.50-62.
- GILLESPIE, J. M.; SCHUPP, A. R. Ratite production as an agricultural enterprise. **Veterinary Clinics of North America**, v.14, p.373–386, 1998.
- GONZALES, E.; CESARIO, M.D. Desenvolvimento Embrionário. In: MACARI, M.; GONZALES, E. Ed. **Manejo da incubação**. Campinas-SP:FACTA, 2003, p.51-64.
- GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P. et al. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. Cold Sping Harbor Symp. **Quantitative Biology**, v.39, p.439-446, 1974.
- HICKS-ALLDREDGE, K. Ratite reproduction. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.14, n.3, p.437-453, 1998.
- HORBANCZUK, J.O. Incubation and hatching. In: The Ostrich, p. 85-117, 2002.
- HUCHZERMAYER, F.W. **Doenças de avestruzes e outras ratitas**. Jaboticabal: Funep, 2000.
- JARVIS, M.J.F.; KEFFEN, R.H.; JARVIS, C. Some physical requirements for ostrich egg incubation. **Ostrich**, v.56, p.42-51, 1985.
- KIMWELE, C.N.; GRAVES, J.A.; BURKE, T. et al. Development of microsatellite markers for parentage typing of chicks in the ostrich, *Struthio camelus*. **Molecular Ecology**, v.7, p.247-255, 1998.
- KUMARI, P.; KEMP, S.J. Polymorphic microsatellite markers in the ostrich (*Struthio camelus*). **Molecular Ecology**, v.7, p.133-140, 1998.
- LEDUR, M.C.; SCHMIDT, G.S. Genética molecular na avicultura. Embrapa, Concórdia, 1998. Disponível em: <http://www.bichoonline.com.br/artigos.htm>  
Acesso em: 17/08/2001.
- LEUTHOLD, W. Notes on the breeding biology of the ostrich *Struthio camelus* in Tsavo East National Park, Kenia. **Ibis**, v.119, p.541–544, 1977.
- LEWIS, N. J; HURNIK, J. F. Locomotion of broiler chickens in floor pens. **Poultry Science**, v.69, p.1087-1093, 1990.
- MARTELLA, M. B.; NAVARRO, J. L.; LIZURUME, M. E. et al.. La percepción del productor patagónico respecto a la conservación y uso sustentable del Choique. In:

- ROBLES, C. A. & NAVARRO, J. L. (eds.): **Conservación y manejo del Choique en Patagonia**, 2000. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria: Bariloche/ Argentina, p.37-40, 2000.
- MEIJERHOF; R. Pre-incubation holding of hatching eggs. **Wild Poultry Science Journal**, v.48, p.57-68, 1992.
- MELLET, F.D. Ostrich production and products. In: Livestock production systems; Principles and practice. Eds. Maree, C. & Casey, N.H., Agri Development Foundation, Pretoria. p.187-194. 1993.
- MITRA, A.; SCHELEE, P.; BALAKRISHNAN, C.R. et al. Polimorphisms at growth-hormone and prolactin loci in indian cattle and buffalo. **Journal of Animal Breeding Genetic**, v.112, n.1, p. 71-74, 1995.
- MORATA, R.L.; MACHADO, T.M.M.; ALBINOK, L.F.T. et al. Técnicas de avaliação dos valores energéticos e dos coeficientes de digestibilidade de alguns alimentos para emas (*Rhea americana*) em crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1381-1388, 2006.
- MULLIS, P.E.; WAGNER, J.K.; EBLE, A. et al. Regulation of human growth hormone receptor gene transcription by human growth hormone binding protein. **Molecular Cellular Endocrinology**, v.131, n.1, p.89-96, 1997.
- NARUSHIN, V.G.; ROMANOV, M.N. Egg physical characteristics and hatchability. **World's Poultry Science Journal**, v.58, n.3, p.297-303, 2002.
- NAVARRO, J. L. Producción y conservación de las dos especies de ñandúes presentes en Argentina. **Libro de Resúmenes del VI Congreso de Ornitología Neotropical. Sociedad de Ornitología Neotropical**, Monterrey y Saltillo: México, p.214, 1999.
- NERI, M.F.A. **Avaliação do comportamento de avestruzes (*Struthio camelus*) de 10 a 150 dias de vida em sistemas de produção**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2007. 42p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2007.
- NETO, J.F.B.; BERED, F. Marcadores moleculares e diversidade genética no melhoramento de plantas. In: MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Sandra Milach, 1998. p. 29-40.
- NILIPOUR, A.H.; BUTCHER, G.D.; SAVAGE, T.F. Effects of hatchery holding times on broiler economic performance parameters. **Poultry Science**, v.74, n.1 (supplement), 1995.
- PARANHOS DA COSTA, M.J.R.; CROMBERG, V.U. Ambiência na produção de bovinos de corte a pasto. **ANUALPEC**, p. 68-73, 2001.
- PEIXOTO, J.E. **Aspectos comportamentais de Perdiz (*Rhynchotus rufescens*) em cativeiro durante a fase reprodutiva. Um estudo de caso**. Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo,



- 2002, 131p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2002.
- PEREZ, J. **La reproducción del avestruz II**. Mundo Ganadero, 1999, p.70-72.
- PHILBEY, A.W.; BUTTON, C.; GESTIER, A.W. et al. Anasarca and myopathy in ostrich chicks. **Australian Veterinary Journal**, v.68, p.237-240, 1991.
- PIGEM, N.B. **Desarrollo de Marcadores Moleculares en el Avestruz (*Struthio camelus*)**. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona – Facultad de Veterinaria, 2001, 97p. Tesis (Doctoral) - Universidad Autónoma de Barcelona, 2001.
- PRICE, E.O. **Behavioural aspects of Animal Domestication - The Quarterly Review of Biology**, v.59, 1984, p.1-32.
- PROUDFOOT, F. G.; HULAN, H.W.; RAMEY, D.R. The effect of four stocking densities on broiler carcass grade, the incidence of breast blisters and other performance traits. **Poultry Science**, v.58, p.791-793, 1979.
- ROCHA, J.L.; BAKER, J.F.; WOMARK, J.E. et al. Statistical associations between restriction fragment length polymorphisms and quantitative traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.21, n.2, p.189-92, 1997.
- ROMIJN, C.; LOKHORST, W. Foetal heat production in the fowl. **Journal of Physiology**, v.150, p.239-249, 1960.
- SALES, J.; NAVARRO, J.L.; BELLIS, L. et al. Carcase and components yields of rheas. **British Poultry Science**, v. 38, n. 4, p. 378-380, 1997.
- SHANAWANY, M. M. Broiler performance under high stocking densities. **British Poultry Science**, v.29, p. 43-52, 1988.
- SICK, H. Ordem Rheiformes – emas: família Rheidae. In: SICK, H. (Ed.). **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. p. 168-171.
- SOUZA, J.S. **Criação de avestruzes**. Viçosa, Aprenda Fácil, 221p. 2004.
- SPINU, M.; SPINU, O.; DEGEN, A.A. Hematological and immunological variables in a domesticated and wild subspecies of ostrich (*Struthio camelus*). **British Poultry Science**, v.40, p.613-618, 1999.
- SWART, D.; RAHN, H.; DeROCK, J. Nest microclimate and incubation water loss of eggs of the African ostrich (*Struthio camelus var. domesticus*). **J. Exp. Zool. Suppl.**, v.1, p.239-246, 1987.
- THOLON, P. Avaliação da adaptação de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) ao cativo. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Paulista, 2002. 54p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2002.
- TOLEDO, L. R.; TAVARES, D. Emas: opção nativa. **Globo Rural**, v.18, n.208, p. 28-37, 2003.

- TULLY, T.N.Jr.; SHANE, S.M. **Ratite: management, medicine, and surgery**. Malabar, Florida: Krieger Publishing Company, 1996. 188p.
- ULLREY, D. E.; ALLEN, M. E. Nutrition and feeding of ostriches. **Animal Feed Science Technology**, v.59, p.27–36, 1996.
- VAN SCHALKWYK, S.J.; CLOETE, S.W.P.; DE KOCK, J.A. Repeatability and phenotypic correlation for bodyweight and reproduction in commercial ostrich breeding pairs. **British Poultry Science**, v.37, p.953-962, 1996.
- VAN ZYL, P. [1999]. Department of Agriculture, Oudtshoorn, South Africa. Disponível em: <http://www.nopsa.com/p0000465.htm>. Acesso em: 01/12/2007.
- VERWOED, D.J. et al. Rearing environments around the world. In: DEEMING, D.C. **The Ostrich: biology, production and health**. Cambridge: CABI Publish, 1999, p. 163-206.

## OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do presente estudo foi realizar uma avaliação reprodutiva e molecular de ratitas através da:

- 1) Avaliação da influência das variáveis climáticas sobre o perfil de incubação de ovos de avestruzes (*Struthio camelus*) e a qualidade da casca dos ovos.
- 2) Avaliação do comportamento e de índices reprodutivos de avestruzes (*Struthio camelus*);
- 3) Avaliar o método de coleta de sangue de acordo com o período de estocagem, para obtenção de DNA genômico de avestruzes (*Struthio camelus*).

**Influência do ambiente na incubação e qualidade de casca de ovos de avestruzes**  
(*Struthio camelus*).

**RESUMO**

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do clima sobre os índices reprodutivos de avestruzes. Foram coletados 300 ovos de avestruzes no período de julho a outubro de 2007 e anotadas as condições do ninho no momento da coleta. Ao total, 31 matrizes realizaram postura, com média de 11 ovos postos/matriz e variação de 1 a 25 ovos postos/matriz durante todo o período. O perfil de incubação para ovos de avestruzes coletados em ninhos secos ou úmidos foram, respectivamente, 66,0 e 54,5 para ovos férteis, 45,0 e 54,5% para ovos eclodidos, 20,5 e 18,2% para ovos inférteis, 21,0 e 0% para mortalidade embrionária total, 13,5 e 27,3% para ovos contaminados. As médias da temperatura do ar foram de 29 e 25°C, e peso dos ovos foram de 1,298 e 1,276 kg para ninho seco e úmido, respectivamente. Os valores obtidos para qualidade da casca de ovos de avestruzes foram de 1,84 mm para espessura média, 93% para matéria mineral, 23% para concentração de cálcio e de 12,79 poros/cm<sup>2</sup> para número de poros. Os índices reprodutivos aumentaram durante o período de observações, porém não atingiram seu pico considerando que as matrizes ainda não haviam atingido seu pico reprodutivo. À medida que a temperatura aumentou, também aumentou o índice de postura das matrizes.

**Palavras-chave:** Avaliação da casca, avestruz, incubação, *Struthio camelus*.

**Influence of environment in incubation and eggshell quality of Ostrich (*Struthio camelus*) eggs.**

**ABSTRACT**

The objective of this study was to assess climate effect towards the Ostrich reproductive indexes. It was collected 300 Ostrich's eggs between July/2007 and October/2007 and its nets' conditions documented at the moment of each collection. Totaling 31 females were in laying season, with the average of 11 eggs layed/female and its variation ranging from 1 to 25 eggs layed/female during this timeframe. Incubation's profile to the Ostrich's eggs collected in dry or wet nests were, respectively, 66.00 and 54.5 for fertile eggs; 45.0 and 54.5% for hatched eggs; 20.5 and 18.2% for infertile eggs; 21.0 and 0% to the total embryonary mortality; 13,5 and 27,3% to contaminated eggs. Weather averages were between 29°C and 25°C, and egg's weight were 1.298 and 1.276 kg to dry and wet nests, respectively. Numbers achieved of the quality to Ostrich's eggs peel were 1.84 mm for the average thickness, 93% for mineral material, 23% to calcium concentrate and 12.79 poros/cm porous number. Reproductive's rates increased during the observation period, however did not achieve its peak considering that the females had not yet achieved its reproductive peak. As the temperature increased, the females indexes of laying increased.

**Key-words:** Evaluation of eggshell, incubation, ostrich, *Struthio camelus*.

## INTRODUÇÃO

Ratitas são aves precoces que movimentam-se desde o nascimento, e apesar de suas similaridades com outras aves, possuem características únicas, como utilização do pró-ventrículo como órgão de estocagem, separação das fezes e urina na cloaca, ausência da glândula uropigiana e do papo (Angel, 1996). As espécies mais exploradas comercialmente são o Avestruz (*Struthio camelus*), o Emú (*Dromaius novaehollandiae*) e a Ema (*Rhea americana*) (Giannoni, 1999). O avestruz (*Struthio camelus* Liinnaeus, 1758) é uma ave de planície e prados abertos áridos e semi-áridos, mas se adapta a uma grande variedade de climas - desde os invernos chuvosos e a neve até as condições extremamente quentes dos verões no deserto africano (Giannoni, 1996). A ema (*Rhea americana*), que é originária da América do Sul, é explorada comercialmente na Europa e América do Norte, e recentemente despertou o interesse dos pecuaristas da América do Sul (Giannoni, 2001). As áreas da caatinga, cerrado e campos concentram a maior parte destes animais no Brasil (Toledo, 2003).

Os ovos de avestruzes pesam em média 1.500g (variação de 1.300 a 1.900), o peso da casca corresponde a 20% do peso do ovo, sendo que os meses da postura afetam o peso do ovo, pois, os ovos produzidos nos meses intermediários são mais pesados do que os ovos dos primeiros e últimos meses do mesmo período de postura (Di Meo et al., 2003). A casca do ovo é composta por volta de 40% de cálcio (Ullrey & Allen, 1996) e a produção de ovos anual varia de 20 a 70 ovos (Cooper, 2001). Iniciam a reprodução de maio até setembro nos Estados Unidos (Tully & Shane, 1996) e no Hemisfério Sul, começa em julho e finaliza em março (Jarvis et al., 1985).

A incubação artificial de ovos é uma das etapas mais críticas dentro de uma cadeia de produção e pode inviabilizar economicamente todo processo de criação (Hoffelder et al., 2006). Fatores como a temperatura e umidade podem influenciar o tempo de incubação (Flôres, 2004), por exemplo, temperaturas acima do ideal encurtam o tempo de incubação enquanto a temperaturas abaixo do ideal estendem esse período (Souza, 2004).

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar a influência das variáveis climáticas sobre a incubação e a qualidade da casca de ovos de avestruzes (*Struthio camelus*).

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Sítio Santo Antônio, no município de Marilena, Estado do Paraná. Os casais de avestruzes com idade entre dois a três anos, foram alojados em piquetes de 45m<sup>2</sup> (9 x 5m) separados entre si por cerca de arame liso, a uma altura de 1,5m. Cada piquete possuía um comedouro e um bebedouro de polietileno, e pastagem do tipo *Coast cross*. O manejo das aves consistia em fornecimento de 1,5kg de ração/animal/dia e água “ad libitum”, fornecido no período da manhã.

Foram coletados 300 ovos de avestruzes no período de julho a outubro de 2007, sendo registrado no momento de coleta as condições do ninho (seco ou úmido) realizadas sempre no período da tarde, além de serem pesados, limpos e identificados.

A limpeza e desinfecção dos ovos foi feita com álcool comum, higienizante Kilol<sup>®</sup> e papel toalha. A fumigação com formaldeído (5%) foi realizada por 10 minutos em uma câmara de fumigação da marca Avicomave<sup>®</sup>. Os ovos foram identificados, anotando-se a data da postura, data da incubação, localizada a câmara de ar com auxílio de ovoscópio e marcada com lápis. Os ovos permaneceram em uma sala climatizada, com temperatura variando entre 15 a 20°C e umidade relativa de 70%, por um período máximo de sete dias.

Os ovos de avestruzes foram incubados a temperatura de 36,5°C e umidade relativa de 45%, e a incubadora e o nascedouro utilizados foram da marca Avicomave<sup>®</sup>. O acompanhamento do desenvolvimento embrionário foi realizado através de ovoscopia e a confirmação da fertilidade ou mortalidade embrionária diagnosticada para posterior descarte dos ovos, sendo a classificação realizada aos 15, 30 e 45 dias após a incubação. Durante todo o período experimental, os ovos que apresentaram sinal de contaminação como exsudação pela casca ou odor forte e característico foram imediatamente retirados e descartados em fossa séptica, com sua identificação anotada para posterior avaliação dos índices de produtividade.

Quando os ovos apresentavam câmara de ar com volume aumentado em relação ao início, com a bicada interna realizada e o pintainho apresentando movimentação, eram transferidos para o nascedouro com temperatura de 36,5°C e umidade relativa de 45%. O nascimento foi assistido para auxiliar os pintainhos com dificuldade de eclodir. Aos 48 dias, o pintainho que não apresentasse movimentos ou bicada interna da câmara de ar, tiveram seus ovos abertos para diagnosticar o motivo pelo qual não eclodiram. Alguns ovos que apresentaram a bicada interna, mas após 24 horas ainda não haviam

eclodido, tiveram auxílio no rompimento da casca e liberação da membrana interna, com o pescoço posicionado de forma a facilitar os seus movimentos.

As aves tiveram seus umbigos tratados com álcool iodado após a eclosão e permaneceram no nascedouro por 24 horas ou até que estivessem completamente secos e prontos para serem transferidos para o berçário, onde foram pesados e identificados, e o resíduo da casca e das membranas coletadas para posteriores análises.

Os pintainhos de avestruz permaneceram por apenas 3 dias no berçário, recebendo suplemento vitamínico fornecido via oral, ração pré-inicial (22% de PB e 2.700 kcal de EM/kg de ração) e água fornecida à vontade, com aquecimento artificial de campânulas com luz infravermelho.

Para as medidas realizadas para qualidade da casca, foram coletadas amostras aleatoriamente. A mensuração da espessura da casca dos ovos foi realizada com um paquímetro em fragmentos retirados da região equatorial em três pontos distintos, obtendo-se a espessura média/ovo. O número de poros das cascas foi avaliado na região equatorial, utilizando-se o método de Rahn et al. (1981); as amostras das cascas foram imersas em uma solução de água e detergente neutro durante 12 horas para retirada das membranas internas e externas. Em seguidas foram secas à temperatura ambiente e as amostras foram coradas com solução aquosa de azul de metileno (1%) por 5 minutos, lavadas rapidamente em água e secas à temperatura ambiente.

A matéria mineral da casca de ovos de avestruzes foi realizada segundo a metodologia descrita por Harris (1970) citado por Campos (2004); foram moídas 25 amostras de cascas em moinho de bola e estocadas a temperatura ambiente; em seguida pesou-se 1,5g das amostras em cadinhos previamente calcinados em mufla a temperatura de 600°C por três horas; desligou-se a mufla e quando a temperatura interna atingiu 200°C, transferiu-se o cadinho para o dessecador até atingir a temperatura ambiente, quando então foram pesados em balança analítica de precisão.

Para a análise de cálcio, os cadinhos foram condicionados em uma bandeja de areia em chapa aquecida a 250°C com 5mL de HCl cada na proporção 1:1. Após a evaporação do conteúdo, foi adicionado a mesma quantidade de HCl e quando a solução atingiu 1mL de HCl 1:1, retirou-se o cadinho da bandeja para resfriar. A solução foi filtrada com água deionizada e transferida para um balão volumétrico (100mL) (AOAC, 1997).

Foram coletados dados climáticos e os índices de produtividade do plantel que consistiram nas porcentagens de matrizes em postura, número de ovos



produzidos/matriz e o total do plantel, número de ovos inférteis, taxa de nascimento, taxa de mortalidade e causa da mortalidade, peso dos ovos antes da incubação. As medidas tomadas foram: condições climáticas (nublado, ensolarado, chuvoso, ventos fortes) e as condições do ninho (seco ou úmido) nos horários em que se realizou a coleta dos ovos, as quais foram sempre no período da tarde.

A média do número de ovos postos/matriz foi calculado através da razão número de postos por matriz/número total de ovos postos. O perfil de incubação foi obtido pelo seguinte critério: para o índice ovos férteis foi considerado o somatório do número total de ovos eclodidos mais a mortalidade embrionária total; a mortalidade embrionária total foi calculada somando-se as três mortalidades inicial (0 a 15 dias de incubação), intermediária (de 15 a 30 dias de incubação) e final (de 30 a 45 dias de incubação ou nascimento); para o número total de ovos foi considerado a soma dos ovos férteis, dos ovos inférteis e dos ovos contaminados. Quando os dados não apresentaram distribuição normal, utilizou-se os Modelos Lineares Generalizados (Dobson, 2002), através do procedimento GENMOD do SAS (2008). Os demais dados que apresentaram distribuição normal, foram analisados através do procedimento GLM do SAS (2008).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de julho a outubro de 2007 foram coletados 300 ovos de 31 matrizes; o número de ovos postos/matriz teve média de 11 ovos, com variação de 1 a 25 ovos/postos por matriz durante o período. A Tabela 1 apresenta o perfil de incubação do plantel de avestruzes (*Struthio camelus*) durante o período de julho de 2007 a outubro de 2007.

**Tabela 1.** Influência das condições do ninho sobre os índices da incubação dos ovos de avestruzes (*Struthio camelus*).

Índices da incubação (%)	Condição do ninho durante a coleta		
	Seco	Úmido	Total
Ovos férteis	66,0	54,5	65,4
Ovos eclodidos	45,0	54,5	45,6
Ovos inférteis	20,5	18,2	20,3
Mortalidade embrionária total	21,0	0	19,8
Mortalidade embrionária inicial	0,6	0	0,6
Mortalidade embrionária intermediária	1,7	0	1,6
Mortalidade embrionária final	18,7	0	17,6
Ovos contaminados	13,5	27,3	14,3

Dos índices apresentados na Tabela 1, a maioria dos parâmetros estudados apresentou variação quando considerado a condição do ninho no momento da coleta, sendo que os índices das mortalidades embrionárias foram maiores na condição de ninho seco em relação a ninho úmido.

Hoffelder et al. (2006), observaram que a causa mais freqüente de descarte dos foi a contaminação bacteriana, quando os ovos foram coletados em ninhos que se apresentavam úmidos. De acordo com Stewart (1996) e Huchzermeyer (2000), os ovos de avestruzes são postos geralmente durante à tarde e ao anoitecer e se deixados no ninho durante a noite, a casca ficará exposta à umidade sendo um veículo para a entrada de bactérias pelos poros. Feser (2005) através de medidas de manejo, reduziu o número de ovos contaminados determinando que a coleta dos mesmos seria feita em dois períodos: uma pela manhã e outra pela tarde. Segundo Huckzermeyer (2000) a morte embrionária em ovos de avestruz pode ter como principal etiologia a contaminação bacteriana através da casca devido ao manejo incorreto.

Na ovoscopia, as mortes embrionárias precoces geralmente não podem ser diferenciadas dos ovos inférteis. Contudo, quando os ovos são abertos, pode-se encontrar um embrião muito pequeno, embora, ocasionalmente, no momento em que o ovo é examinado ele já tenha se dissolvido (Hoffelder et al., 2006). Os mesmos autores afirmam que o embrião pode morrer em qualquer período da incubação, mas geralmente a morte acontece em estágios finais. A fertilidade dos ovos está relacionada a vários fatores como idade, estado corpóreo, proporção de machos e fêmeas, as anormalidades espermáticas, a genética, a nutrição, o “status” sanitário, o desinteresse sexual e os piquetes de reprodução (Almeida, 2003).

Os valores médios da temperatura do ar e peso dos ovos de avestruzes (*Struthio camelus*) são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Valores médios da temperatura do ar e peso dos ovos de avestruzes (*Struthio camelus*).

Parâmetro	Condição do ninho durante a coleta		CV (%)
	Seco	Úmido	
Temperatura média do ar (°C)	29 <sup>A</sup>	25 <sup>B</sup>	11,18
Peso dos ovos (kg)	1,298 <sup>A</sup>	1,276 <sup>A</sup>	10,75

Os valores médios para peso dos ovos está abaixo dos valores obtidos por Alvarenga et al. (2008) de 1,34 kg, Superchi et al. (2002) de 1,44 kg e Zoccarato et al.

(2004) obtiveram pesos médios variando de 1,52 a 1,53 kg. Munhóz (2006) encontrou valor médio de 1,31 kg e coeficiente de variação de 11,26%. Diversas variáveis podem interferir no tamanho dos ovos como fase de postura, idade da fêmea e seqüência de postura (Deeming & Ar, 1999; Magrath et al., 2003). Entretanto, há uma relação direta entre o tamanho do ovo e seus constituintes (Alvarenta et al., 2008), e que ovos maiores possuem maior proteção contra microorganismos devido à viscosidade e as enzimas proteolíticas presentes no albúmen mais volumoso (Superchi et al., 2002).

Os valores médios da espessura da casca, matéria mineral e cálcio dos ovos de avestruzes (*Struthio camelus*) são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Valores médios da espessura da casca, matéria mineral e porcentagem de cálcio de ovos de avestruzes (*Struthio camelus*).

Parâmetro	Média	CV (%)
Espessura da Casca (mm)	1,84	7,76
Matéria Mineral (%)	93	3,72
Cálcio (%)	23	13,38

A espessura média de ovos de avestruzes (1,84mm) está acima do valor encontrado por Munhóz (2006) de 1,46mm e por Christensen et al. (1996) de 1,7mm, e inferior ao valor obtido por Sahan et al. (2003) de 1,95mm, em ovos de avestruzes. Os valores de matéria mineral estão dentro dos valores descritos por Souza-Soares & Siewerdt (2005) de 0,79% para perus, 0,94 para galinhas, 1,08 para gansos, 1,14 para patos e 1,10% para codornas. Costa et al. (2007), encontraram valores entre 27% a 30% de cálcio na casca de ovos de codornas japonesas. De acordo com Gonzales et al. (1999), a qualidade da casca influencia diretamente a eclodibilidade dos ovos. Além disso, da casca provém o cálcio necessário para o desenvolvimento fetal (Grizzle et al., 1992). Na Tabela 4 são apresentados os valores do número de poros de ovos de avestruzes (*Struthio camelus*).

**Tabela 4.** Média observada e estimada, distribuição de probabilidade e intervalo de confiança do parâmetro número de poros dos ovos de avestruzes (*Struthio camelus*).

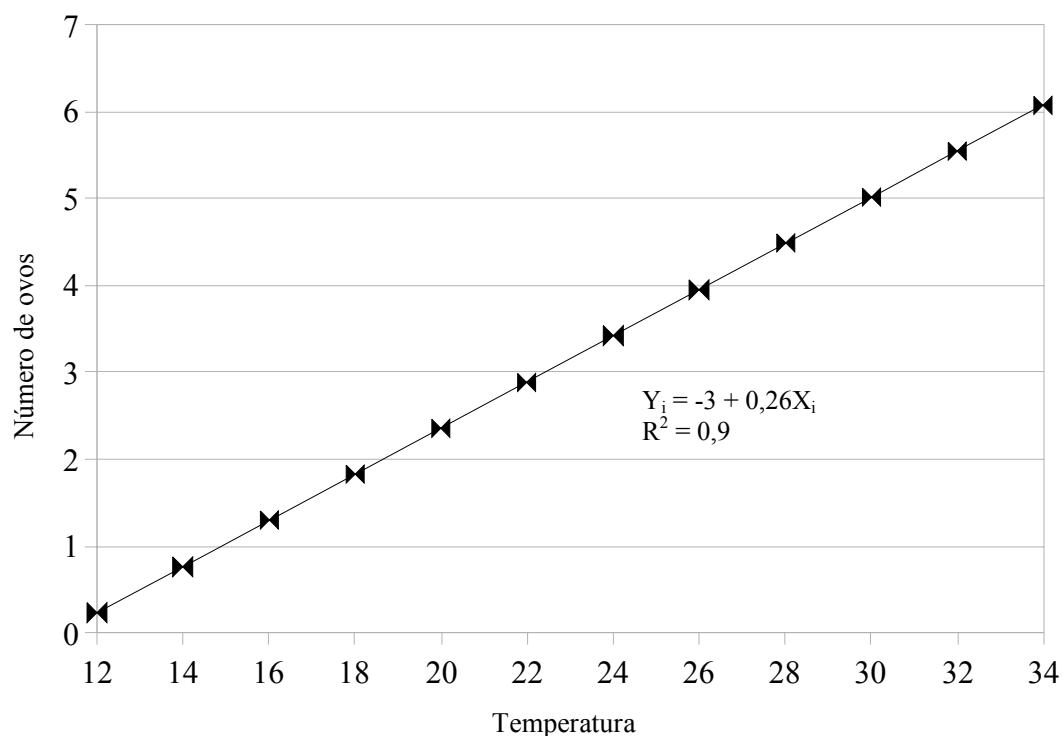
Variáveis	Número de poros dos ovos (/cm <sup>2</sup> )
Média Observada	12,79
Média Estimada	12,79
Distribuição de probabilidade	Poisson
Intervalo de confiança	11,31 a 14,46
Pr > $\chi^2$	1,1

De acordo com Nakage et al. (2002), o número de poros obtidos em perdizes recebendo diferentes ração (farelada e peletizada) variou de 3,17 a 6,69/25mm<sup>2</sup> na região equatorial do ovo. Munhóz (2006) encontrou uma média de 11,09 poros/cm<sup>2</sup> em ovos de avestruzes.

Satteneni & Satterlee (1994) constataram que a mortalidade embrionária foi menor em ovos com cascas lisas e com poucos poros. Deeming (1995), encontrou que ovos de avestruz que perderam menos de 10%, ou mais de 20%, de sua massa inicial foram de menor eclodibilidade. De acordo com Munhóz (2006), as características da casca afetam diretamente a mortalidade embrionária de ovos de avestruz, e a umidade na incubação conjuntamente com a porosidade da casca são fatores que desempenham um papel importante na explicação da mortalidade de embriões.

Sahan et al. (2003) concluíram que existe uma correlação entre a porosidade e a eclodibilidade, sendo esta última 50% inferior em ovos de avestruzes de baixa porosidade. Satteneni & Satterlee (1994), observaram que as baixas taxas de eclosão estão aparentemente relacionadas com elevadas perdas de massa e com peso dos ovos que apresentam médias de poros grandes e pequenos, com contagem de 10 e 6 poros por cm<sup>2</sup>, respectivamente; concluíram ainda que não há correlação entre número de poros e espessura da casca, sugerindo que estas duas características afetam a eclodibilidade de forma independente.

A Figura 1 apresenta a análise de regressão dos índices de postura do período de 16 de julho de 2007 a 22 de outubro de 2007 em função da temperatura do ar.



**Figura 1.** Relação entre o índice de postura e da temperatura do ar em avestruzes.

A postura apresentou uma tendência linear crescente em relação à temperatura do ar; apesar de em condições extremas, a reprodução ser inibida (Tully & Shane, 1996), a temperatura máxima atingida durante o período foi de 34°C, o que não pode ser denominado de condição extrema, confirmando a grande capacidade de adaptação desta espécie para viver em regiões áridas. A quantidade de ovos coletados variou muito no decorrer do período, sugerindo que as matrizes ainda não haviam atingido o pico de postura, considerando um intervalo entre postura de 2 a 3 dias. A atividade reprodutiva, em muitas espécies de aves, é controlada por estímulos ambientais que sincronizam as estações reprodutivas com o período do ano favorável à sobrevivência da prole; a duração dos dias regula as estações reprodutivas de modo que a atividade sexual diminui nos dias mais curtos e aumenta naqueles mais longos (Souza-Soares & Siewerdt, 2005).

## CONCLUSÕES

O número de ovos postos/matriz variou muito entre as matrizes revelando a necessidade de realização de um programa de melhoramento genético, uma vez que todas as matrizes tinham idade por volta dos três anos, receberam as mesmas condições de tratamento, tanto alimentar quanto de manejo. Dentro os índices de incubação, destaca-se o índice de infertilidade que se apresentou muito elevado comparado às demais criações de aves comerciais. A contaminação também foi maior em ovos coletados em ninho úmido quando comparados a ninho seco, devido a alta umidade a que foram expostos e maior susceptibilidade às infecções bacterianas. O peso dos ovos, apesar de abaixo das médias encontradas na literatura, isto pode estar associado a variações devido a subespécie e não necessariamente a uma deficiência nutricional.

Os índices de incubação, em conjunto com as variáveis da qualidade da casca, demonstram a carência em estudos para aprimoramento da técnica e a necessidade de se obter uma maior homogeneidade dos lotes de ovos que apresentaram variação em relação a espessura da casca e número de poros que influenciaram diretamente nos padrões de eclodibilidade.

## LITERATURA CITADA

- ALMEIDA, M.A. **Influências dos Sistemas Artificial e Natural de Incubação e Criação de Emas (*Rhea americana*) no índices produtivos de Criadouros do Estado de São Paulo.** São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2003. 75p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2003.
- ALVARENGA, A.B.B.; BOERE, V. O tamanho do ovo não prediz o desenvolvimento físico de avestruzes (*Struthio camelus*) aos quinze dias de idade. **Ciência Rural**, v. 38, n.3, p. 802-806, 2008.
- ANGEL, C.R. A review of ratite nutrition. **Animal Feed Science Technology**, v.20, p.241-246, 1996.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International.** 16ed. Gaitheersburg: AOAC, 1997.
- CAMPOS, F.P. **Método de análise de alimentos.** Piracicaba: FEALQ, 2004. 135p.
- CHRISTENSEN, V.L.; DAVIS, G.S.; LUCORE, L. A. Eggshell conductance and other functional qualities of ostrich eggs. **Poultry Science**, v.75, p.1404-1410, 1996.

- COOPER, R.G. Handling, incubation, and hatchability of ostrich (*Struthio camelus var. Domesticus*) – Eggs: a review. **Journal Applied of Poultry Research**, v.10, p.262-273, 2001.
- COSTA, C.H.R.; BARRETO, S.L.T.; MOURA, W.C.O. et al. Níveis de fósforo e cálcio em dietas para codornas japonesas em postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.2037-2046, 2007.
- DEEMING, D.C. Factors affecting hatchability during comercial incubation of ostrich (*Struthio camelus*) eggs. **British Poultry Science**, v.36, p. 51-65, 1995.
- DEEMING, D.C.; AR, A. Factors affecting success of commercial incubation. In: DEEMING, D.C. **The Ostrich: biology, production and health**, Cambridge: CABI, 1999. p. 159-190.
- DI MEO, C.; STANCO, G.; CUTRIGNELLI, MI. Physical and chemical quality of ostrich eggs during the laying season. **British Poultry Science**, v.44, n.3, p.386-390, 2003.
- DOBSON, A.J. **An introduction to generalized linear models**. Boca Raton, CRC Press, 2002. 225p.
- FESER, M. Análise de índices reprodutivos de avestruzes de um criatório no Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v.24, n.143, p.48-50, 2005.
- FLÔRES, M.L. et al. Avaliação do peso médio de ovos e filhotes de emas (*Rhea americana*) recém-nascidos, em cativeiro, no município de Santa Maria – RS. **A Hora Veterinária**, ano 24, n.139, p.59-61, 2004.
- GIANNONI, M.L. **Avestruz – Reprodução, Cria e Recria**. Versão atualizada. Viçosa: CPT, Manual Técnico, n.361, 2001. 136p.
- GIANNONI, M.L. Criação de animais silvestres em cativeiro. **I Congresso Brasileiro de conservação e Manejo da Biodiversidade**. Teatro Pedro II Ribeirão Preto, 16 a 19 de agosto de 1999. HOLOS ed. especial, 1999. p.129-135.
- GIANNONI, M.L. **Emas & Avestruzes: uma alternativa para o produtor rural**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 49 p.
- GONZALES, A.; SATTERLLE, D.G.; MOHARER, F. Factors affecting ostrich egg hatchability. **Poultry Science**, v.78, p.1257-1262, 1999.
- GRIZZLE, J.; IHEANACHO, M.; SAXTON, A. et al. Nutritional and enviromental factors involved in egg shell quality of laying hens. **British Poultry Science**, v.33, p. 781-794, 1992.
- HOFFELDER, J.B.; ALLGAYER, M.C.; FESER, M. et al. Bactérias isoladas de ovos de avestruz descartados no período de incubação. **Veterinária em Foco**, v.4, n.1, p.13-20, 2006.
- HUCHZERMEYER, F. W. **Doenças de avestruzes e outras ratitas**. Jaboticabal: Funep, 2000.

- JARVIS, M.J.F.; KEFFEN, R.H.; JARVIS, C. Some physical requirements for ostrich egg incubation. **Ostrich**, v.56, p.42-51, 1985.
- MAGRATH, M. J. L., et al. J. Egg size and laying order in relation to offspring sex in the extreme sexually size dimorphic brown songlark, *Cinclorhamphus cruralis*. **Behavioral Ecology Sociobiology**, Berlin, n.54, p.240–248, 2003.
- MUNHÓZ, A.L.F. **Correlações fenotípicas de características do ovo de avestruz**. Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de mestre em ciência animal pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. 2006. 52p.
- NAKAGE, E. S.; CARDOSO, J. P.; PEREIRA, G. T. et al. Efeito da forma física da ração sobre a porosidade, espessura da casca, perda de água e eclodibilidade de ovos de perdizes (*Rhynchotus rufescens*). **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.4, n.3, 2002.
- RAHN, H.; CHRISTENSEN, V.L.; EDENS, F.W. Changes in shell conductance, pores, and physical dimensions of egg and shell during the first breeding cycle of turkey hens. **Poultry Science**, v. 60, p.2536-2541, 1981.
- SAHAN, U.; ALTAN, O.; IPEF, A.; YLMAZ, B. Effects of some egg characteristics on the mass loss and hatchability of (*Struthio camelus*) eggs. *British Poultry Science*, v.44, n.3, p.380-385, 2003.
- SAS INSTITUTE. **Statistical Analysis System**. Users guide. Cary: 2008.
- SATTENENI, G.; SATTERLEE, D.G. Factors affecting hatchability of ostrich eggs. *Poultry Science*, v.73, p.38, 1994
- SOUZA-SOARES, L.A.; SIEWERDT, F. **Aves e Ovos**. Rio Grande do Sul: Pelotas, Ed. da Universidade UFPEL, 2005. 138p.
- SOUZA, J.S. Criação **de avestruzes**. Viçosa, Aprenda Fácil, 221p. 2004.
- STEWART, J. S. Hatchery management in ostrich production. In: TULLY, T. N.; SHANE, S. M. *Ratite: management, medicine and surgery*. Florida: Krieger, 1996.
- SUPERCHI, P.; SUSSI, C.; SABBIONI, A. et al. Italian ostrich (*Struthio camelus*) eggs: physical characteristics and chemical composition. **Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma**, v. 22, p. 155-162, 2002.
- TOLEDO, L.R. Emas, opção nativa. **Revista Globo Rural**. Edicao 208. p. 28-37, fev. 2003.
- TULLY, T.N.Jr.; SHANE, S.M. **Ratite: management, medicine, and surgery**. Malabar, Florida: Krieger Publishing Company, 1996. 188p.
- ULLREY, D. E.; ALLEN, M. E. Nutrition and feeding of ostriches. **Animal Feed Science Technology**, v.59, p.27–36, 1996.



ZOCCARATO, I.; GUO, K.; GASCO, L. et al. Effect of egg weight on ostrich (*Struthio camelus*) chick weight and growth. **Italian Journal of Animal Science**, Bologna, v. 3, p. 7-17, 2004.

## **Aspectos Comportamentais e Reprodutivo de Avestruzes (*Struthio camelus*).**

### **RESUMO**

O presente estudo avaliou influência das variáveis climáticas sobre comportamento de avestruzes (*Struthio camelus*). Os casais de avestruzes foram mantidos em piquetes em um criatório comercial no Município de Marilena, Paraná, observados durante os meses de maio de 2007 a janeiro de 2008. O método utilizado para medir o comportamento foi o scan por um período de 9 horas consecutivas, com intervalos de 5 minutos. Os comportamentos mais freqüentes foram o pastando e em pé/parado, seguidos de correndo/caminhando e ropiando/fugindo, comendo ração e deitado. O comportamento pastando teve sua maior freqüência (43%) no fim do dia, enquanto comendo ração aumentou gradativamente até atingir o seu pico ao entardecer (9%), apesar da ração ser fornecida no período da manhã. Os comportamentos que apresentaram maior freqüência, em ordem decrescente, foram Pastando e Em pé/parado (43%), Correndo/caminhando (34%), Comendo ração (9%), Deitado (7%) e Rodopiando/fugindo (2%). Os animais diminuíram suas atividades nas horas mais quente do dia, permanecendo mais ativos ao amanhecer e entardecer.

**Palavras-chave:** avestruz, comportamento, reprodução, variáveis climáticas.

## **Behavioral and Reproductive Aspects of Ostriches (*Struthio camelus*).**

### **ABSTRACT**

This study assessed the influence of climate variables in behavior and reproductive indexes in ostriches (*Struthio camelus*). Ostrich pairs were kept on a commercial farm in Marilena city, Paraná, Brazil, and observed during may/2007 to january/2008. The method used to assess the behavior was the “scan” during 9 hours, in intervals of 5 minutes. The most frequent behaviors were grazing and standing/stopped, followed by running/walking and escaping, feeding on concentrate food and lay down. Grazing has higher frequency (43%) at end of the day, and feeding on concentrate food increase till reach the most higher frequency (9%), in despite of concentrate ration being delivered during the morning. Both feeding and grazing combined took up over 50% of the time and running about 40%. Behaviors whom shown major frequency, in decrease order, were Grazing and Standing/stopped (43%), Running/walking (34%), feeding on concentrate food (9%), Lay down (7%) and Escaping (2%). Animals demonstrated being less actives during hot periods in the day, increasing their activities at dusk.

**Key-words:** ostrich, behavior, reproduction, climate variables.

## INTRODUÇÃO

O avestruz é a maior ave do planeta, atingindo até 2,5 m de altura e 150 kg de peso adulto, dependendo da raça e localização geográfica. Sendo uma ave de origem africana, de regiões semi-áridas e planas, o avestruz tem grande capacidade de adaptação a climas adversos, de forma que sua criação comercial tem apresentado resultados positivos em países como o Canadá, Estados Unidos, Europa, Israel e Brasil (Souza, 2004). Apesar deste tipo de criação possuir uma longa trajetória e dispor de informações sobre a criação, pouco se sabe sobre o comportamento destas aves em cativeiro (Deeming et al., 1993).

A variedade doméstica do avestruz atinge maturidade sexual entre dois e três anos, sendo as fêmeas mais precoces que os machos. Possuem dimorfismo sexual evidente a partir dos 6 a 10 meses, sendo os machos pretos com a cauda branca e as fêmeas marrom acinzentadas (Deeming, 1998). As asas são utilizadas no comportamento de exibição (cortejo) na estação reprodutiva e na presença de humanos, além de possuírem propriedade isolante e térmica, impedindo a passagem do calor e tornando-os resistentes (Souza, 2004). A maturidade sexual depende da subespécie, estação, estado nutricional, condições ambientais e de alojamento; sua reprodução depende também do fotoperíodo, iniciando em estações com aumento de luz. Entretanto, o efeito da temperatura ainda permanece desconhecido, podendo-se dizer que condições extremas inibem a reprodução (Tully & Shane, 1996).

O comportamento da ave é resultado do modo como vários sistemas do animal interagem entre si e o mundo externo. Samson (1996) descreve alguns comportamentos considerados normais e anormais em avestruzes, citando como normais: ameaçar, chutar, a vocalização, submissão, cacarejar e sacudir, cortejar. O cortejo ocorre na estação reprodutiva, os machos se exibem para as fêmeas abrindo as asas e balançando o pescoço, de um lado para o outro. Quando a fêmea aceita o macho, após o macho efetuar a ronda, ela se abaixa e deixa ser montada, e o macho, por sua vez, realiza a monta abrindo as asas e balançando o pescoço até que o ato seja concluído (Souza, 2004).

Segundo Barbosa Filho et al (2007), o estudo do comportamento animal torna-se uma importante ferramenta para a avaliação dos sistemas de criação, além de fornecer muitas respostas a questões básicas da etologia. O objetivo do presente estudo foi avaliar o comportamento de avestruzes (*Struthio camellus*).

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Sítio Santo Antônio, no município de Nova Londrina (22,45° Latitude sul e 52,59° Longitude oeste), Estado do Paraná, no período de 11 de maio de 2007 a 11 de janeiro de 2008, dentro da época reprodutiva 2007/2008.

Vinte casais de avestruz (*Struthio camelus*) foram alojados em piquetes de 45m<sup>2</sup> (9 x 5m) cada um, separados entre si por cerca de arame liso, a uma altura de 1,5m. Cada piquete possuía um comedouro e um bebedouro de polietileno. O manejo das aves consistia em fornecimento de 1,5kg de ração/animal/dia e água “ad libitum”, fornecido no período da manhã.

A coleta de dados de comportamento foi realizada pelo método scan, avaliando-se por 9 horas consecutivas (9:00 as 18:00) em intervalos de 5 minutos. As observações foram registradas em planilhas confeccionadas a partir de categorias comportamentais, conforme indicadas no etograma, onde foram registrados a categoria comportamental e o horário em que o animal a manifestou.

Levando-se em consideração observações previamente realizadas por McKeegan & Deeming (1997), foi confeccionado um etograma dos padrões comportamentais, conforme segue abaixo:

(1) Pastando: o animal, em deslocamento ou parado, inclina o corpo a fim de que possa apreender a gramínea com o bico.

(2) Bebendo água: o animal para em frente ao bebedouro, inclina-se e bica o bebedouro.

(3) Comendo ração: o animal inclina a cabeça e bica as partículas de ração que estão no comedouro ou ao redor dele.

(4) Caminhando, correndo: o animal se desloca calmamente com a cabeça erguida através de áreas do piquete, sem apreender nenhum alimento, ou corre em direção retilínea ou em zigue-zague.

(5) Cortejando: consiste em um ritual que é precedido pelo macho que mantém suas asas abertas e constantemente em movimentos, o pescoço inclinado, de forma prostrada. Ainda nesta posição, desloca o pescoço para trás com movimentos alternados para o lado direito e esquerdo.

(6) Montando/copulando: o macho se aproxima por detrás da fêmea que se encontra deitada, projeta o seu corpo acima do corpo do outro animal, e introduz o

órgão reprodutor masculino na cloaca da fêmea repetidamente, movimentando as asas e bicando a região dorsal do animal.

(7) Postura: a fêmea senta sobre os seus tarsos e permanece no local previamente escolhido para o ninho, consistindo em um declive em determinado local do piquete que poderá conter gravetos e plumas, permanecendo no local até que esteja completa a oviposição.

(8) Deitado: o corpo do animal encontra-se em contato com o chão, sentado sobre os seus tarsos ou com as patas estendidas para trás.

(9) Rodopiando/fugindo: quando o animal se sente ameaçado, rodopia ao redor de um eixo projetado pelo seu corpo, pode também se deslocar em maior velocidade, em zigue-zague ou retilineamente, com as asas unidas na parte superior do corpo, e indo de encontro com a cerca, chocando-se contra ela.

(10) Em pé ereto/parado: o animal apresenta imobilidade em posição ereta ao menos por 5 segundos.

As observações foram realizadas do alto de um mirante para que não houvesse nenhuma interferência no comportamento dos animais. Foram realizadas 4 repetições de períodos de 9 horas distribuídos ao longo do período reprodutivo.

As análises estatísticas foram realizadas no pacote estatístico SAS, utilizando-se o procedimento modelos lineares generalizados (Proc GLM), através de análise de regressão (SAS, 2008). A porcentagem dos registros de cada comportamento foi transformada para uma distribuição normal utilizando a transformação arco-seno da raiz quadrada.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Dentre os 10 comportamentos avaliados, seis apresentaram diferença ( $P < 0,05$ ) pela análise de regressão em função do horário, dentre eles: pastando, em pé ereto/parado, deitado, comendo ração, correndo/caminhando e rodopiando/fugindo. Os comportamentos bebendo água, cortejando, monta/cópula e postura não apresentaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ); apesar das aves estarem dentro do período de reprodução, os comportamentos relacionados a reprodução tiveram uma frequência muito baixa. Os valores percentuais e os transformados em Arcseno da raiz quadrada dos comportamentos observados, e submetidos à análise de regressão, são apresentados na Tabela 1.

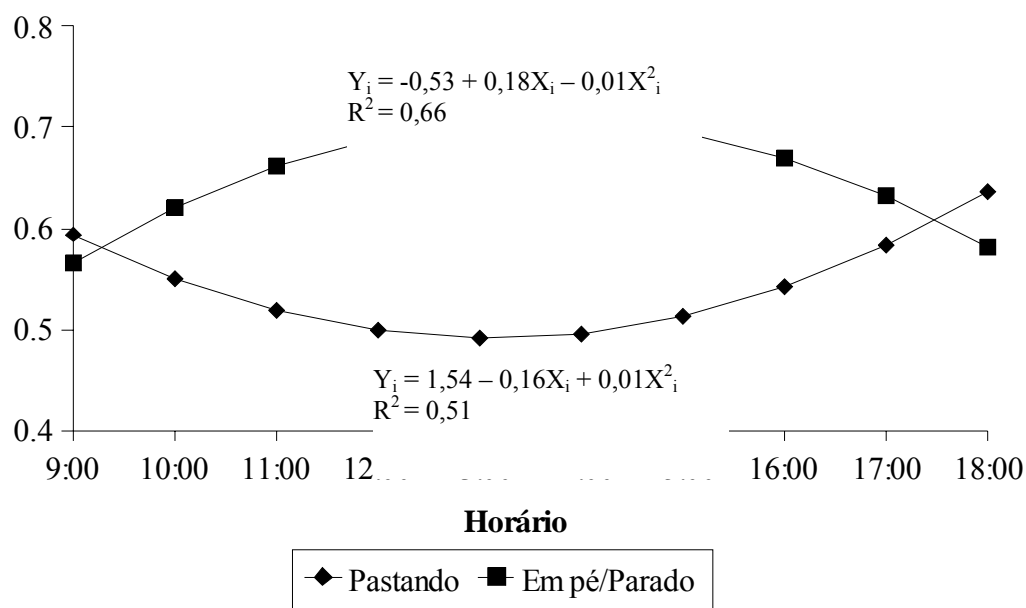
**Tabela 1.** Média dos valores percentuais e transformados (Arcsen  $\sqrt{X\%}$ ) das frequências dos comportamentos observados durante o período das 9:00 até as 18:00 horas.

Hora	Comportamento											
	Pastando		Em pé ereto/ Parado		Comendo ração		Deitado		Caminhando, correndo		Rodopiando/Fugindo	
	%	Arcsen	%	Arcsen	%	Arcsen	%	Arcsen	%	Arcsen	%	Arcsen
9	30	0,59	28	0,57	4	0,19	0	0,08	34	0,6	2	0,14
10	31	0,55	28	0,62	3	0,2	1	0,1	33	0,58	2	0,13
11	37	0,52	29	0,66	3	0,21	0	0,12	28	0,56	1	0,12
12	29	0,5	38	0,69	6	0,22	4	0,14	21	0,54	0	0,11
13	24	0,49	39	0,7	7	0,23	4	0,16	23	0,52	0	0,1
14	18	0,5	43	0,71	7	0,24	5	0,18	24	0,5	2	0,09
15	30	0,51	31	0,7	5	0,25	5	0,2	24	0,48	0	0,08
16	36	0,54	30	0,67	6	0,26	4	0,22	20	0,46	0	0,07
17	38	0,58	31	0,63	5	0,27	7	0,24	17	0,44	0	0,06
18	43	0,64	25	0,58	9	0,28	4	0,26	18	0,42	0	0,05

Peixoto (2002), observando perdizes, verificou uma baixa frequência em comportamentos relacionados a cópula, como subir/montar os animais do mesmo sexo ou sexo oposto, apesar dos animais estarem dentro do período de acasalamento. Segundo Sambraus (1994), avestruzes adultos utilizam apenas 1,1% do seu tempo de atividade para ingerir água. Deeming (1998), estudando os efeitos do sexo e período do dia durante o inverno, observou sete comportamentos dominantes: sentado (cabeça levantada), em pé (cabeça levantada), andando (de lado a lado do piquete), marchando (em torno do perímetro do piquete), pastando, comendo (ração concentrada) e procurando (cabeça para baixo e olhando para o chão).

Samson (1996), descreveu como comportamentos normais em avestruzes aqueles que pertencem a atividades diárias como comportamentais (rodopio, termorregulação, bicar, limpar e tremer), atividades sociais (ameaçar, chutar, vocalização, submissão) e comportamentos sexuais (cacarejar, sacudir, realizar o display). Para Neri (2007), os comportamentos que apresentaram diferenças significativa foram: parado, andando, correndo, litofagia (consumir pedras), coprofagia (ingerir fezes), bicar e agressão. Peixoto (2002), encontrou diferenças nos comportamentos deslocamento, ciscar, comer,

parado, arrumar e sentado imóvel, em ordem decrescente, respectivamente. A relação entre os comportamentos pastando e em pé ereto/parado é demonstrada na Figura 1.



**Figura 1.** Relação entre os comportamento pastando e em pé ereto/parado durante o período das 9:00 às 18:00.

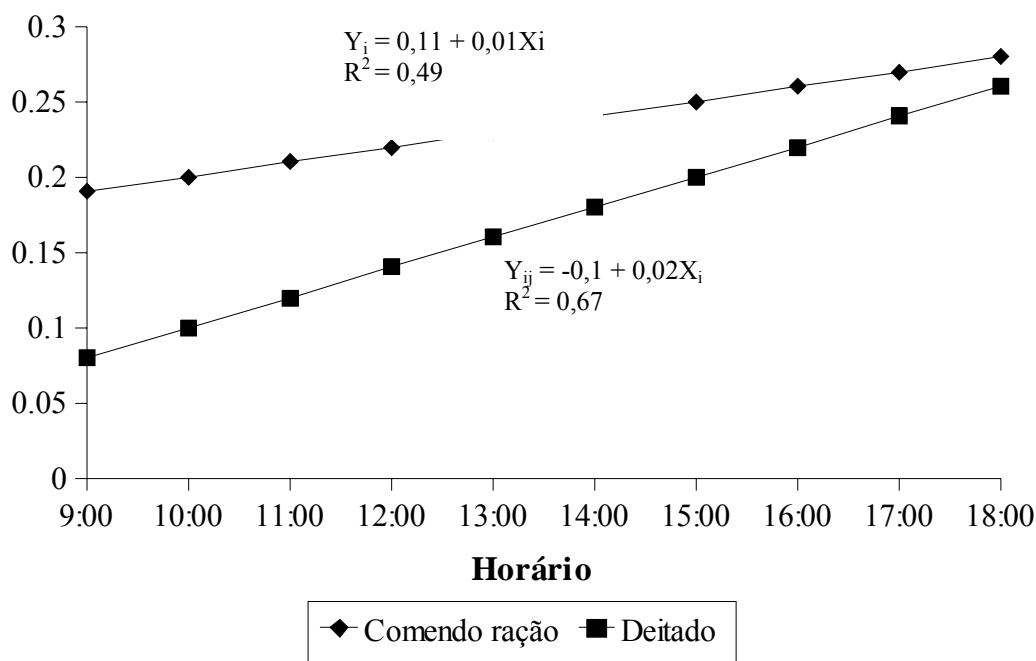
Ambos os comportamentos demonstraram uma evolução durante o período antagônico, onde o período de maior atividade dos animais em pé ereto/parado apresentou maior frequência (43% do tempo) às 14:00 horas, ao contrário do comportamento pastando, que teve sua menor frequência (18%) neste horário, e sua maior frequência (43%) foi verificada no horário das 18:00 horas. Estes resultados discordam dos encontrados por Neri (2007), onde os avestruzes permaneceram mais tempo parados nos primeiros horários do dia. Hernández (2007) observou o maior tempo de pastejo no período entre 9:00 a 12:00h (45,77% dos animais observados), demonstrando uma alternância entre o pastejo e a ingestão de concentrado. Deeming (1998), estudando as respostas de avestruzes adultos às condições específicas de tempo durante os meses no inverno, encontrou que os machos permaneceram 20% e 16,2%, enquanto as fêmeas permaneceram 18,3% e 18,0% do tempo em pé, no período da manhã (10:00 às 13:00 horas) e da tarde (13:00 às 16:00 horas), respectivamente.

Segundo Smith et al. (1995), por apresentarem alimentação onívora, dedicam grande parte do tempo ao pastejo e na busca de insetos. Os avestruzes permanecem a maior parte do tempo erguidas e vigilantes como posição estratégica (Esquivel et al.,



1997; Keeling, 2004). A ingestão de pasto ocorre para manter um ritmo constante e estável, em horas de calor intenso, demonstrando uma maior resistência térmica dos adultos que são capazes de pastar em horas de meio-dia, como adaptação evolutiva às condições de vida silvestre, pois durante este período o perigo de predação é menor (Duke, 1994). Entretanto, o presente estudo observou as menores frequências do comportamento pastando dentro do horário das 12:00 às 14:00 horas.

Os comportamentos comendo ração e deitado estão apresentados na Figura 2.



**Figura 2.** Relação entre os comportamento comendo ração e deitado durante o período das 9:00 às 18:00.

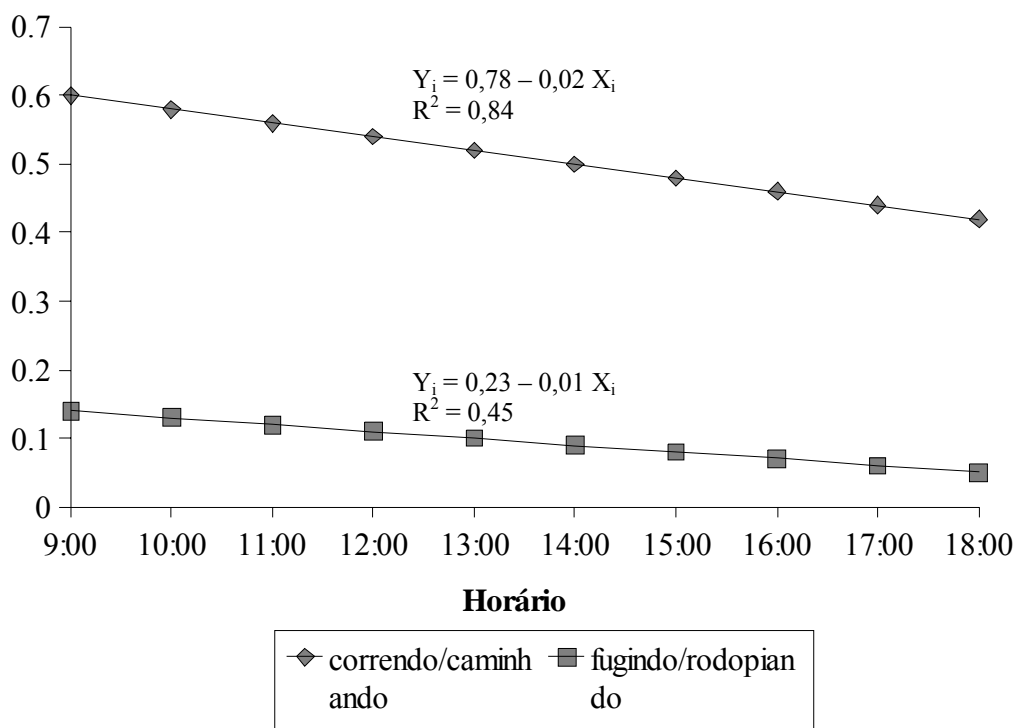
Os comportamentos comendo ração e deitado apresentaram frequências linearmente crescentes durante o decorrer do período das 9:00 às 18:00. A menor frequência para o comportamento comendo ração (3%) foi encontrada nos horários das 10:00 às 11:00 horas, enquanto deitado foi menor (0-1%) nos horários das 9:00 às 11:00 horas (Tabela 1). As maiores frequências observadas foram às 17:00 horas (7%) e 18:00 horas (9%) para os comportamentos deitado e comendo ração, respectivamente. Os dados obtidos do comportamento comendo ração discordam dos encontrados por Hernández (2007), onde a atividade de ingestão de concentrado foi maior entre as 9:00 e 12:00 horas (39,1%), buscando apreender o concentrado presente no comedouro e entre 12:00 e 14:00 horas, buscaram capturar os grânulos de concentrado em torno do comedouro (60,9%); porém no restante do período circadiano, não houve mais visitas ao comedouro. Peixoto (2002) relatou que as perdizes mantidas em cativeiro comeram

mais no início e no fim do dia. Irving et al. (1967) concluíram que aves que possuem o pico de ingestão durante a tarde, realizam tal procedimento para armazenar alimento no papo durante a noite, e caso ingerissem quantidade suficiente de alimento, teriam menos fome durante o início do outro dia. Neri (2007) verificou que o consumo de ração foi maior no primeiro horário do dia avaliado e os animais consumiram maior quantidade de ração quando o alimento foi fornecido pela manhã.

O aumento da frequência do comportamento comendo ração está de acordo com Savory (1976), que indica o pico de alimentação à tarde ocorre na maioria das aves em postura como resultado direto da oviposição e/ou formação do ovo e que aves com pico de alimentação ao final do dia consomem mais alimento em um dia do que as que têm o pico de ingestão no início do dia. Ainda, segundo Savory et al. (1978), as aves que vivem sob luz natural, que distinguem quando o dia termina, tem seu pico de ingestão geralmente no fim do dia, independente de estarem ou não em postura.

De acordo com Deeming & Bubier (1999), avestruzes em ambientes naturais passam a maior parte do tempo alimentando-se durante o dia, o que inclui pastar e outros alimentos (insetos, ingerindo pedras), o que provavelmente esteja relacionado com a busca constante do alimento com o intuito de sobreviver. Deeming (1998) relaciona a alimentação com a manutenção da temperatura corporal, sendo este o principal fator para taxas elevadas de consumo de ração pois ao observar animais nos meses de verão, o autor verificou um menor consumo nas horas mais quentes do dia.

A Figura 3 apresenta os comportamentos correndo/caminhando e rodopiando/Fugindo, que caracterizou uma reação decorrente de quaisquer fontes identificadas como estressante (presença de outra espécie animal, manejos dos animais, etc).



**Figura 3.** Relação entre os comportamento correndo/caminhando e rodopiando/fugindo durante o período das 9:00 às 18:00.

Ambas decresceram de forma linear no decorrer do período, sendo que o comportamento mais freqüentemente observado fora o comportamento correndo. A maior freqüência foi observada no período das 9:00 horas (34% para correndo/caminhando e 2% para Rodopiando/Fugindo) (Tabela 1). Neri (2007) encontrou diferença no comportamento andar, sendo maior nas primeiras horas do dia e no fim da tarde, devido a baixa temperatura neste período pois os animais diminuiram suas atividades físicas nas horas mais quente do dia. Mckeegan & Deeming (1996) relataram maior expressão deste comportamento na parte da manhã e a tarde em avestruzes machos. Quando observados os dados de em pé ereto/parado, observou-se que os animais permaneceram a maior parte do tempo parados nos horários mais quente do dia, e em horários mais amenos, o comportamento Correndo/caminhando foi maior apenas nas primeiras horas do dia, o que indica que os animais quando se movimentavam encontravam-se pastando.

O fato dos animais se movimentarem constantemente não indica, necessariamente, situações de estresse. Csermely et al. (2006) observaram que animais selvagens se locomovem com freqüência, e descartam a teoria de que animais em

cativeiro apresentam este comportamento em função da frustração que o ambiente restrito oferece. Samson (1996) descreveu como comportamentos anormais associados às condições estressantes: (1) bicar penas do pescoço e calda de forma agressiva, freqüentemente associado a super-população e longos meses de confinamento; (2) bicar os dedos e a face de forma excessiva podendo causar ferimentos graves; (3) comportamento de observar estrelas e está diretamente ligado ao confinamento em ambientes de tamanho e luminosidade muito reduzidos; (4) anorexia e adipsia por aversão aos recipientes onde estão a comida e água, ou até mesmo por algum tipo de contaminação da água ou da dieta; (5) ingestão de corpos estranhos que podem causar impactação ou outras enfermidades; (6) ingestão excessiva de fezes e (7) agressividade. Entretanto, observou-se lutas e brigas entre os casais ou entre animais de piquetes vizinhos, comportamentos estes relacionados ao período de reprodução onde a disputa pela demarcação territorial e o estímulo/aceite pela fêmea.

Para Stewart (1994), a dança é um comportamento presente nos avestruzes selvagens, como também nos em cativeiro; entretanto Deeming et al (1996) observaram este comportamento com maior freqüência quando os animais que estão presos, são liberados. Este comportamento foi maior das 14:00 às 17:00 horas, dançando nas horas mais frescas do dia (Neri, 2007). Alguns cuidados básicos devem ser tomados para amenizar situações de estresse que possam ocasionar doenças, evitando superlotação de piquetes, presença de outros animais, barulhos estranhos como automóveis, tratores, pessoas ou qualquer tipo de sons dos quais os animais não estão acostumados (Tuckwell, 1993).

## CONCLUSÃO

Como demonstrado pelos resultados da análise de regressão dos comportamentos, os animais demonstraram que permaneceram a maior parte do tempo em atividades como pastando ou em pé ereto/parado, ou seja, em posição de alerta como também pode-se observar na natureza, onde sempre permanecem alertas à presença de predadores. Comparando os comportamentos pastando e comendo ração, apesar da ração ser fornecida em único trato no período da manhã, os animais visitaram mais o comedouro no período da tarde, enquanto o pastejo foi mais freqüente nos horários de temperaturas mais amenas, no início da manhã e final da tarde. Tais observações

sugerem que o fornecimento de ração pode ser realizado no período da tarde sem nenhum prejuízo ao consumo, ou então ser dividido em dois tratos diários.

O comportamento fugindo/rodopiando não indica necessariamente que os animais estavam sobre estresse uma vez que comportamento de rodopio ou dança é comum em avestruzes que estão presas e posteriormente são liberadas.

### LITERATURA CITADA

- BARBOSA FILHO, J.A.D. et al. Avaliação dos comportamentos de aves poedeiras utilizando seqüência de imagens. **Engenharia Agrícola**, v. 27, n.1, p.93-99, 2007.
- CSERMELY, D.; GAIBANI, G.; DARDANI, E. Year-round behavioural sequences in captive ostrich (*Struthio camelus domesticus*) pairs. **Applied Animal Behavioural Science**. v.103, p.156-166, 2006.
- DEEMING, D.C. A note on effects of gender and time of day on the winter time-activity budget of adult ostriches (*Struthio camelus*) in a farming environment. **Applied Animal Behaviour Science**, v.59, p. 363-371, 1998.
- DEEMING, D.C.; AYRES, L.; AYRES, F.J. Observations on the first commercial production of ostrich (*Struthio camelus*) eggs in the UK: incubation. **Veterinary Record**, v.132, p.602-607, 1993.
- DEEMING, D.C.; BUBIER, N.E. Behaviour in Natural and Captive Environments. In: DEEMING, D.C. (Ed.) **The Ostrich: Biology, Production and Health**. CABI Publishing: Cambridge, 1999. p.83-101.
- DEEMING, D.C.; BUBIER, N.E.; PAXTON, C.G.M. et al. A review of recent work on the behaviour of young ostrich chicks with respect to feeding. **Ratite Conference**, Oxfordshire, p. 20-21. 1996.
- DUKE. G.E. Avian Gastrointestinal motor function - Handbook of Physiology. **The Gastrointestinal System. Journal**, p.1283, 1994.
- ESQUIVEL, P. J. et al. [1997]. **Etología del avestruz en la ciudad de Méjico**. FMVZ. UNAM. Méjico. Disponível em: <[http:// www.avestruz.com](http://www.avestruz.com)> Acesso em: 23/04/2004.
- HERNÁNDEZ, M.G. Comportamiento alimentario y excretor del Avestruz. Disponível em:<<http://www.monografias.com>>. Acesso em 27/08/2007.
- IRVING, L. et al. Winter feeding program of Alaska willow ptarmigan shown by crop contents. **Condor**, v.69, p.69-77, 1967.

- KEELING, L. Comportamiento del ave de corral y otros pájaros domésticos. En: Jensen. **Etología de los Animales Domésticos**. Zaragoza: Editora Acribia, 2004. p.109-126.
- McKEEGAN, D.E.F.; DEEMING, D.C. Effects of gender and group size on the time-activity budgets of adult breeding ostriches (*Struthio camelus*) in a farming environment. **Applied Journal Behaviour Science**, v. 51, p. 159-177, 1997.
- NERI, M.F.A. **Avaliação do comportamento de avestruzes (*Struthio camelus*) de 10 a 150 dias de vida em sistemas de produção**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2007. 42p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2007.
- PEIXOTO, J.E. **Aspectos comportamentais de Perdiz (*Rhynchotus rufescens*) em cativeiro durante a fase reprodutiva: Um estudo de caso**. Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP. 2002. 131p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, 2002.
- SAMBRAUS, H.H. The circadian rhythm in the behaviour of ostriches (*Struthio camelus*) kept in pens. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v.107, p.339-341, 1994.
- SAMSON, J. Behavioral problems of farmed ostriches in Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v.37, p. 412-414, 1996.
- SAS INSTITUTE. **Statistical Analysis System**. Users guide. Cary: 2008.
- SAVORY, C.J. Broiler growth and feeding behaviour in three different lighting regimes. **British Poultry Science**, v.17, p.557-560, 1976b.
- SAVORY, C.J.; WOODY-GUSH, D.G.M.; DUNCAN, I.J.H. Feeding behaviour in a population of domestic fowls in the wild. **Applied Animal Ethology**, v.4, p.13-27, 1978.
- SMITH, W. et al.. Ostrich production: A south African perspective. **Canadian Ostrich**, v., n.10, p 18-20, 1995.
- SOUZA-SOARES, L.A.; SIEWERDT, F. **Aves e Ovos**. Rio Grande do Sul: Pelotas, Ed. da Universidade UFPEL, 2005. 138p.
- SOUZA, J.D.S. **Criação de Avestruz**. Minas Gerais: Aprenda Fácil, 2004.
- STEWART, J.S. Ostrich behaviour and behavioral problems. In: ASSOCIATION OF AVIAN VETERINARIANS, **Proceedings...**, p.103-109, 1994.
- TUCKWELL, C.D. **The Ostrich Book**. Australia: Rural Industry Developments PTY LTD, 1993. 96p.

TULLY, T.N.Jr.; SHANE, S.M. **Ratite: management, medicine, and surgery.**  
Malabar, Florida: Krieger Publishing Company, 1996. 188p.

## Método alternativo de coleta e armazenamento de sangue para obtenção de DNA em avestruzes (*Struthio camelus*)

### RESUMO

Existem vários métodos de extração de DNA, entre eles os métodos alternativos têm se mostrado atrativos por apresentar menor custo e facilitar o processo de coleta e estocagem das amostras. Apesar da quantidade de DNA obtida por tais métodos normalmente ser baixa, isso não impossibilita que ocorra reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram coletadas amostras de sangue de avestruzes (*Struthio camelus*) em papéis tipo filtro e armazenadas a temperatura ambiente. As extrações de DNA foram realizadas após 24 horas da coleta e em intervalos de 7 dias, utilizando-se o protocolo com CTAB. Foram realizadas leituras de absorbâncias no comprimento de onda de 260 e 280 nanômetros, para determinar o grau de pureza ( $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ ) e a concentração de DNA. As ampliações foram realizadas utilizando *primers* para o gene do hormônio do crescimento de bovino (GHbovino). As leituras  $A_{260}$ ,  $A_{280}$  e concentração de DNA diminuíram no decorrer do período, e a razão  $A_{260}/A_{280}$  aumentou. Todas as amostras apresentaram DNA genômico íntegro e com ampliações positivas, concluindo-se portanto, que o método testado pode ser utilizado em processos moleculares de maneira eficiente.

**Palavras-chave:** CTAB, extração de DNA, papel filtro.



**Alternative method to collect and storage blood to obtain DNA in ostriches  
(*Struthio camelus*)**

**ABSTRACT**

There are many methods of DNA extraction; between them, alternative methods had shown more attractive to present lower costs and to be an easy process of samples collect and storage. In despite of the DNA amount obtained for such methods are low, it was not impossible to run amplicons in polymerase chain reaction (PCR). Were collected blood samples of ostriches (*Struthio camelus*) in *filter* papers and stored at room temperature. DNA extractions were made 24 hours after collected and each seven days period using CTAB protocol. Absorbance lectures were made at 260 and 280 nm and determined the degree of purity ( $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ ) and DNA concentration. Amplifications were made, using *primers* to bovine growth hormone gene (GHbovine). The lectures  $A_{260}$ ,  $A_{280}$  and DNA concentration decrease during the period, and ratio  $A_{260}/A_{280}$  increase. All samples shown genomic DNA and positive amplicons, so we conclude that method tested could be used in molecular process as an efficient way.

**Key-words:** CTAB, DNA extraction, filter paper.

## INTRODUÇÃO

As avestruzes (*Struthio camelus*), pertencem ao grupo das ratitas, ordem Struthioniformes (Cooper et al., 1992). O avestruz está ganhando cada vez mais interesse como um animal de criação, devido ao seu potencial de produzir carne vermelha saudável, com um baixo teor de gordura (Cooper & Horbañczuk, 2002). Um fator importante para que o criador tenha sucesso em sua criação é o respaldo técnico-científico na área de biologia molecular, pois tal fator pode fornecer subsídios para melhorar os desempenhos reprodutivo e produtivo dos sistemas de criação (Morata et al., 2006).

Diversas técnicas de biologia molecular estão hoje disponíveis para a detecção da variabilidade genética ao nível de seqüência do DNA na detecção de polimorfismos genéticos, permitindo a obtenção de um número ilimitado de marcadores moleculares, cobrindo todo o genoma do organismo (Valentim et al., 2003). Tais marcadores podem ser utilizados para as mais diversas aplicações, tanto no estudo de genética, quanto na prática de melhoramento de plantas e de animais (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Uma importante ferramenta utilizada na biologia molecular é a reação em cadeia da polimerase (PCR). As técnicas de otimização da extração de DNA para a utilização na reação em cadeia da polimerase têm permitido a investigação de diferentes amostras biológicas mesmo quando o DNA está presente em pequenas quantidades (Bueno, 2004). A análise com marcadores em espécies pouco estudadas enfrenta barreiras no processo de extração do DNA, pois para se obter um DNA com qualidade, diferentes protocolos precisam ser testados.

A boa qualidade do DNA é essencial para se obter bom resultado em experimentos (Hoy, 1994), especialmente no uso da reação da polimerase em cadeia, nos quais os excessos de estruturas celulares e proteínas podem inibir o processo de amplificação (Saiki, 1990). O método de estocagem do DNA também influencia e pode promover a degradação do material obtido (Coelho et al., 2004). Protocolos extremamente simplificados podem fornecer DNAs parcialmente degradados ou contaminados que, apesar de possibilitar amplificações por PCR, podem comprometer a reprodutibilidade das reações, resultando muitas vezes em falsos negativos (Romano, 1998).

A extração do DNA tem sido realizada em diferentes tecidos de animais como sangue, sêmen e pêlos de touros de diferentes raças zebuínas (Coelho et al., 2004),

sangue de aves (Campos et al., 2003), folículos pilosos da espécie caprina (Mendonça & Araújo, 2003) e tecido muscular em suínos (Sollero et al., 2004). De modo geral, um dos protocolos de extração de DNA mais utilizados para as diferentes espécies é o CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) padrão, ou CTAB com algumas modificações e variações daquele descrito por Dellaporta et al. (1983).

A técnica de extração com o uso de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) é muito aplicada em tecidos vegetais, e também a uma variedade de outros materiais biológicos como sangue, sêmen, folículo piloso e tecidos orgânicos. Além disso, essa técnica permite facilmente acomodar uma grande variação de quantidades iniciais de tecido, até mesmo miligramas de tecido mumificado, fossilizado ou herbarizado (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O presente trabalho teve como objetivo testar o protocolo de extração de DNA do sangue de avestruzes (*Struthio camelus*) com CTAB em diferentes períodos de estocagem do material e capacidade de amplificação.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Reprodução e Biotecnologia da Universidade Estadual de Maringá, Maringá - Paraná e no Criatório Kingstruz, localizado no município de Marilena - Paraná.

Foram coletadas amostras de sangue (5 mL) da veia braquial de dois avestruzes (*Struthio camelus*) da raça African Black, utilizando seringas e agulhas descartáveis, e posteriormente transferidos para tubos de ensaio contendo como anticoagulante citrato de sódio (18%). Foram distribuídas gotas de aproximadamente 5 µl, em papel tipo filtro, totalizando um número de 30 amostras (gotas)/animal. Estas amostras foram divididas em cinco grupos totalizando 6 amostras/animal/grupo, estocadas a temperatura ambiente. A extração do DNA foi realizada no grupo 1, 24 horas após a coleta, e repetindo-se nos demais grupos no intervalo de sete dias, conforme abaixo:

**Grupo 1** – extração realizada 24 horas após a coleta;

**Grupo 2** – extração realizada 7 dias após a coleta;

**Grupo 3** – extração realizada 14 dias após a coleta;

**Grupo 4** – extração realizada 21 dias após a coleta;

**Grupo 5** – extração realizada 28 dias após a coleta.

Para extração do DNA foi utilizado o protocolo com CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio): foram cortadas amostras de papel contendo 5 µl de sangue

distribuídas em micro tubos. Adicionou-se 500 µl de CTAB (200 mL de solução de CTAB: 160 mL de água ultra-pura; 16,36 g de NaCl; 400 µl de β-mercapto-etanol; 200 mL de 1 M de Tris-HCl, pH 8,0; 8 mL 0,5 M de Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0; 4 g de CTAB) e 5 µl de proteinase K (200µg/mL). As amostras foram agitadas e incubadas à 60°C em banho-maria durante 4 horas. Posteriormente foram adicionados 500 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), agitadas novamente e centrifugadas por 20 minutos a 12.900 g. Retirou-se o sobrenadante sendo o mesmo depositado em um novo tubo, onde adicionou-se 250 µl de isopropanol. As fases foram cuidadosamente misturadas por inversão do tubo observada a presença de *pellets*. Incubou-se a -20°C *overnight*. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.100 g por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. Realizou-se lavagens do *pellet* com 500 µl de etanol (70%), e sendo centrifugado a 12.100 g por 3 minutos e o etanol descartado. Esse procedimento foi repetido por 3 vezes consecutivas. Após a terceira lavagem, as amostras foram secas em estufa (37°C) por aproximadamente 40 minutos. Adicionou-se 50 µl de TE e 5 µl de RNase (30µl/ml), incubadas em banho-maria à 37°C por aproximadamente 40 minutos e foram estocadas à -20°C.

Para determinar a concentração de DNA e proteína, o grau de pureza das amostras (relação 260 nm/ 280 nm), estas foram submetidas à leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 260nm (DNA) e 280 nm (proteína) de comprimento de onda, sendo realizada sempre em duplicatas. O fator de diluição utilizado nas amostras de DNA foi 100 (10 DNA:990 água ultra-pura autoclavada).

A integridade do DNA extraído foi analisada através de eletroforese em gel de agarose (0,8%), em tampão TBE 1X (Tris, Ácido Bórico e EDTA) com tempo de corrida de 40 minutos a 100 volts. Os géis foram revelados em solução de brometo de etídeo (3 µl/L) durante 20 minutos, e visualizados em transiluminador ultravioleta, sendo as imagens capturadas por um sistema da EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

O DNA genômico foi amplificado em um volume de reação de 25 µl, sendo 23 µl de mistura e 2 µl de DNA molde (45 ng). O *mix* utilizado foi constituído por: tampão Tris-KCl 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,50 µM de *primer* (oligonucleotídeos), 0,25 mM de dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados) e uma unidade de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen). As reações foram amplificadas em termociclador “Eppendorf Mastercycler® Gradient” programado para 35 ciclos, com um passo inicial de desnaturação a 95°C por quatro minutos e um passo final de

extensão a 72°C por quatro minutos. Cada ciclo foi constituído por 30 segundos a 95°C, dois minutos a 59°C e um minuto e 30 segundos a 72°C.

Para amplificação foi utilizado 1 par de primer (GHbovino), este foi desenhado utilizando como referência a sequência gênica (número de acesso: [M57764.1](#)) depositada no Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 0,8% sob eletroforese conduzida a 40 volts por duas horas e 30 minutos em tampão TBE 1X (500mM de Tris-HCl, 60mM de ácido bórico e 83mM de EDTA). O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL) e visualizado em transiluminador ultravioleta, sendo as imagens capturadas por um sistema da EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com o padrão 100pb DNA Ladder. Na Tabela 1, são apresentadas as seqüências do par de primer do hormônio do crescimento (GH), baseado na seqüência do gene GH de bovinos.

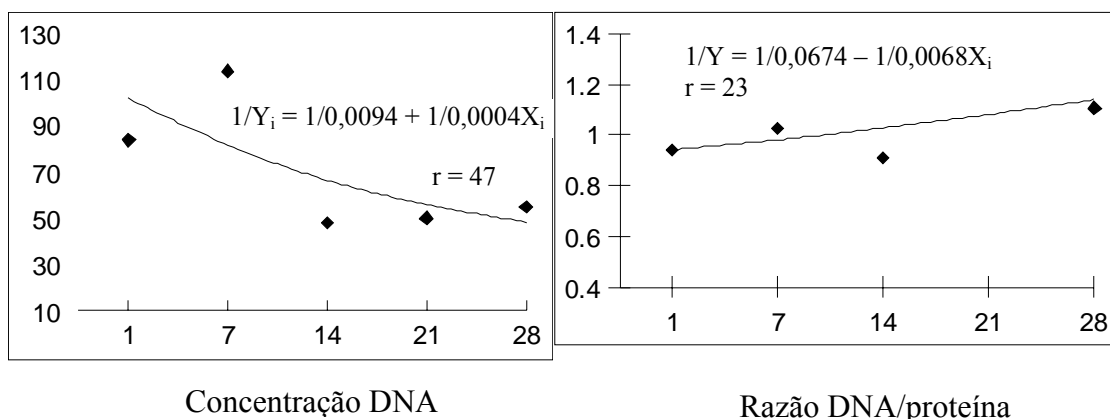
**Tabela 1.** Seqüência dos primers do hormônio do crescimento (GH) desenhados de acordo com a seqüência do gene GH em bovinos.

<b>Primer</b>	<b>Seqüência</b>
Direto	3' GCTGCTCCTGAGGGCCCTTCG 5'
Reverso	GCGGCGACACTTCATGACCCT

Os dados foram submetidos a análise estatística utilizando o procedimento GENMOD do programa SAS (2008), considerando que os erros possuíam diferentes distribuições de probabilidade, com função de ligação canônica. O ajuste foi avaliado utilizando a correlação de Pearson.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das leituras das absorvâncias a 260 nm e 280 nm, obteve-se a concentração de DNA das amostras (ng/µL) e a razão entre DNA/proteína ( $A_{260}/A_{280}$ ). O resultado dos dados submetidos à análise estatística estão apresentados na Figura 1.

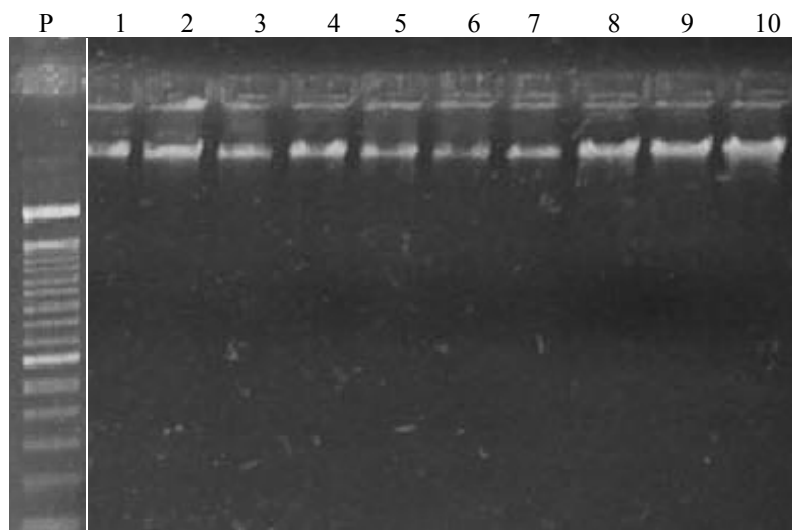


**Figura 1.** Concentração de DNA (ng/μL) e razão DNA/proteína (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>), no sangue de avestruzes (*Struthio camelus*).

A concentração de DNA genômico é uma das variáveis mais importantes. O excesso de DNA pode reduzir ou inibir a atividade da Taq polimerase, devido à altas concentrações de impurezas, resultando na ausência da amplificação ou, por outro lado, o DNA em concentrações muito baixas pode dar origem a padrões de amplificação não-reprodutíveis, podendo ocorrer acréscimo ou diminuição de bandas, mesmo entre repetições (Fungaro, 2002).

A concentração de DNA (Figura 1) apresentou valores decrescentes, e a razão DNA/proteína apresentou valores crescentes no decorrer do período de armazenamento, sem interferir no padrão de amplificação.

A Figura 2 apresenta o gel de agarose (0,8%) contendo as amostras de DNA genômico nos períodos de 24 horas, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias após a coleta, respectivamente.



**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose (0,8%) contendo amostras de DNA genômico nos períodos de armazenamento. Linhas 1 e 2 – 24 horas, 3 e 4 – 7 dias, 5 e 6 – 14 dias, 7 e 8 – 21 dias, 9 e 10 – 28 dias.

Como demonstrado na Figura 2, as amostras de todos os períodos apresentaram DNA genômico o que foi confirmado pelas leituras de absorvância.

A quantidade de DNA contaminado com proteína é fornecida pela razão entre os comprimentos de onda a 260nm/280nm na leitura feita pelo espectrofotômetro. Ferreira & Grattapaglia (1998), recomendam que esta variação esteja entre o intervalo 1,8 a 2,2 e que valores não condizentes com este intervalo não apresentariam uma grau de pureza aceitável. Contudo, de acordo com Sambrook et al. (1989), os valores abaixo de 1,8 representam um DNA livre de contaminação, inclusive por proteínas. No presente estudo, a razão variou entre 1,2 a 1,3, indicando assim que a quantidade de proteína presente nas amostras não impossibilitou a amplificação do DNA.

Os valores médios das variáveis  $A_{260}$ ,  $A_{280}$ , razão ( $A_{260}/A_{280}$ ) e a concentração de DNA, são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Médias das variáveis: comprimento de onda 260nm e 280nm, razão ( $A_{260}/A_{280}$ ) e concentração de DNA (ng/ $\mu$ L) em função do período de armazenamento.

Período (dias)	$A_{260}$ (nm)	$A_{280}$ (nm)	Razão ( $A_{260}/A_{280}$ )	Concentração de DNA (ng/ $\mu$ L)
1	0,0426	0,0372	1,23	213
7	0,0632	0,0576	1,27	316
14	0,0247	0,0211	1,32	123,5
21	0,0209	0,0180	1,18	104,5
28	0,0288	0,0229	1,28	144

Houve diferença significativa em relação a concentração de DNA variando de 104,5 ng/ $\mu$ L para o período de 21 dias a 316 ng/ $\mu$ L para o período de 7 dias de armazenamento após coleta do material. O nível de contaminação medido pela razão  $A_{260}/A_{280}$  apresentou diferença significativa ( $P < 0,03$ ), sendo o período que demonstrou menor nível de contaminação foi o de 21 dias e o maior de 14 dias. Os valores encontrados para Razão  $A_{260}/A_{280}$  estão abaixo dos valores encontrados por Marengoni et al. (2006) de 1,7 a 1,8 para razão  $A_{260}/A_{280}$ , ao contrário da concentração de DNA que apresentou valores de acordo com a variação encontrada pelos autores, exceto no período de 21 dias, os quais utilizando o método CTAB para extração de DNA de peixes teleósteos, encontraram uma variação de 1,7 a 1,8 na razão  $A_{260}/A_{280}$ , e a concentração variou de 117,15 $\mu$ g/mL a 1.727,09 $\mu$ g/mL. Sollero et al. (2004), extraíndo DNA de tecido muscular de suínos, utilizando o método com CTAB, também encontraram valores de 887,6 até 1828,2 ng/ $\mu$ L para a concentração de DNA e a razão DNA/proteína variou de 1,85 a 1,93, considerando que o DNA obtido apresentou boa qualidade e quantidade.

Coelho et al. (2004) avaliando diferentes métodos de extração de DNA de sangue, sêmen e pêlo de bovinos e diferentes períodos de estocagem, encontraram valores de concentração de DNA de 264,58 a 828,75 $\mu$ g/ml, 96,67 a 440,83 $\mu$ g/ml e 295,42 a 582,5 $\mu$ g/ml em amostras de sangue, sêmen e pêlos, respectivamente. Os mesmos autores verificaram os valores médios de razão DNA/proteína de 1,08 a 1,55; 0,60 a 0,91 e 1,11 a 1,42 em amostras de sangue, sêmen e pêlos, respectivamente.

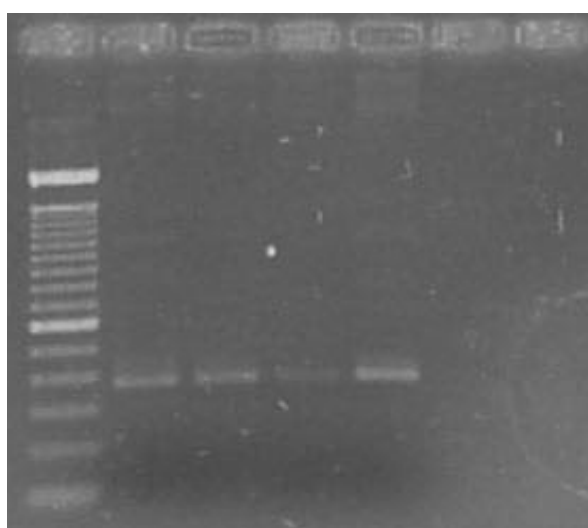
A forma de coleta e conservação também são fatores de grande importância para a obtenção do DNA em concentração e qualidade adequadas (Sollero et al., 2004). Feres et al. (2005), realizando testes com o tempo de armazenamento, extração e qualidade do DNA extraído de folhas, verificaram que o procedimento mais eficiente e de maior facilidade em condições de campo, foi do material coletado e mantido a temperatura ambiente por um período de 7 dias. Grutzmacher et al. (2006) confirmaram a possibilidade de extração do DNA de formigas em etanol 75% mantidos em temperatura ambiente no período de 24 horas até 10 meses, sendo a maior quantidade de DNA obtida em amostras frescas; quando submetidos a técnica de RAPD, apenas as amostras de até 8 meses de conservação amplificaram.

Ferreira & Grattapaglia (1998) recomendam a utilização do material para extração de DNA o mais fresco possível, uma vez que a condição de estocagem da amostra afeta a concentração do DNA obtido. Porém, na maioria das vezes não é possível realizar a



extração logo após a coleta da amostra nos casos onde estas são obtidas longe dos centros de pesquisa. Segundo Feres et al. (2005), utilizar uma amostra seca ao invés de amostras conservadas sobre refrigeração em um estudo molecular, tem como vantagem o fato do material ser rompido com maior facilidade e a qualidade do DNA é muito satisfatória. Além disso, no estado desidratado, o DNA é menos susceptível à degradação química ou enzimática (Murray & Thompson, 1980).

A Figura 3 apresenta o gel de agarose (1,5%) contendo as amostras amplificadas com o *primer* GHbovino, no período de 24 horas após a coleta.



**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% das amplificação com o *primer* GHbovino. Linhas 1,2,3,4,5,6: amostras de DNA genômico, do período de 24 horas após a coleta; P: marcador de peso molecular de 100pb.

Com exceção das linhas 5 e 6, todas as demais amostras apresentaram amplificação como pode ser constatado na Figura 3, apresentando o fragmento esperado, com tamanho aproximado de 400pb.

É importante destacar que apesar do *primer* utilizado não ser específico e ser baseado na seqüência de uma outra espécie (bovino), isto revela que o GH é um gene que possui alto índice de conservação o que permite utilizá-lo em experimentos futuros como gene candidato em avestruz.

## CONCLUSÃO

O protocolo de conservação de sangue em papel a temperatura ambiente demonstrou que é possível a coleta e o armazenamento de amostras de sangue através deste procedimento, confirmado pelo bom padrão de amplificação obtido através do gene do hormônio do crescimento bovino.

## LITERATURA CITADA

- BUENO, V. DNA e aperfeiçoamento das técnicas de extração. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoter.**, v.26, n.4, p.233-234, 2004.
- CAMPOS, R. L. R; AMBO, M.; NONES, K. et al. Otimização e comparação de protocolos para extração de DNA de sangue de aves. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 49., 2003. Águas de Lindóia. **Anais...Águas de Lindóia**: SBG, 2003. p.282.
- COELHO, E.G.A.; OLIVEIRA, D.A.A.; TEIXEIRA, C.S. et al. Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pêlos e entre técnicas de extração. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.1, p,111-115, 2004.
- COOPER, A.; MOURER-CHAUVIRE, C.; CHAMBERS, G.K et al. Independent origins of New Zeland moas and kiwis. **Proceedings on the National Academy of Science**, v.89, p.8741-8744, 1992.
- COOPER, R.G.; HORBAŃCZUK, J.O. Anatomical and physiological characteristics of ostrich (*Struthio camelus var. domesticus*) meat determine its nutritional importance for man. **Animal Science Journal**, v. 73, p. 167-173, 2002.
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS. J. B. A plant minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Report**. v.1, p. 19-20, 1983.
- FERES, F.; SOUZA, A.P.; AMARAL, M.C.E. et al. Avaliação de métodos de preservação de amostras de planta de Savanas Neotropicais para a obtenção de DNA de alta qualidade para estudos moleculares. **Revista Brasileira de Botânica**, v.28, n.2, p.277-283. 2005
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília:Embrapa-Cenargen, 1998, 220p.
- FUNGARO, M.H.P. **Diagnóstico e Análise de Variabilidade**. Londrina, 2002. Disponível em: <[http://www.biocologia.com.br/bio/bio14/14\\_c.htm](http://www.biocologia.com.br/bio/bio14/14_c.htm)> Acesso em: 23/07/2007.

- GRUTZMACHER, D.D.; LOECK, A.E.; OLIVEIRA, A.C. Efeito do período de armazenamento em etanol sobre a qualidade e quantidade de DNA extraído de *Acromyrmex heyeri* (Forel, 1899) (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Brasileira Agrociência**, v.12, n.1, p.105-106. 2006.
- HOY, M. A. DNA amplification by the Polymerase Chain Reaction: molecular biology made accessible. In: **Insect molecular genetics: an introduction principles and applications**. San Diego: Academic Press, 1994. p.203-244.
- MARENGONI, N.G.; MACHADO, M.R.F.; GASPARINO, E. Extração de DNA genômico em tecidos sólidos de peixes teleosteos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n.1, p.99-106, 2006.
- MORATA, R.L.; MACHADO, T.M.M.; ALBINOK, L.F.T. et al. Técnicas de avaliação dos valores energéticos e dos coeficientes de digestibilidade de alguns alimentos para emas (*Rhea americana*) em crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1381-1388, 2006.
- MURRAY, M.G. & THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, p.4321-4325. 1980.
- ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília. EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEN. 1998. p.163-177.
- SAIKI, R. K. Amplification of genomic DNA. In: IINNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKI, J. J.; WHITE, T. J (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p.13-20
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p.E.5-E.7.
- SAS INSTITUTE. **Statistical Analysis System**. Users guide. Cary: 2008.
- SOLLERO, B. P.; FARIA, D. A.; PAIVA, S. R. et al. Método rápido de extração de DNA utilizando CTAB em tecidos musculares de suínos. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 6., CONGRESSO NACIONAL DE ZOOTECNIA, 13., 2004. Brasília. **Anais...** Brasília: SBZ, 2004. CD-ROM.
- VALENTIM, M.; VARGAS, L.; MOREIRA, H. L. M. Comparação de protocolos para extração do DNA de *Lernaea* sp. (Copepoda: Cyclopoida). **Acta Scientiarum**, v.25, n.2, p.219-222, 2003.

## CONCLUSÕES GERAIS

No estudo que objetivou avaliar a influência do clima sobre os índices reprodutivos de avestruzes, verificou-se que o índice de contaminação dos ovos de avestruzes (*Struthio camelus*) foi maior quando os ovos foram coletados em ninho úmido quando comparados a ninho seco, devido à alta umidade a que foram expostos e maior susceptibilidade às infecções bacterianas. Os índices de incubação, em conjunto com as variáveis da qualidade da casca, demonstram a carência em estudos para aprimoramento da técnica e a necessidade de se obter uma maior homogeneidade dos lotes de ovos que apresentaram variação em relação a espessura da casca e número de poros que influenciaram diretamente nos padrões de eclodibilidade.

Em relação aos aspectos comportamentais, os animais permaneceram a maior parte do tempo em atividades como pastando ou em pé ereto/parado, ou seja, em posição de alerta como também pode-se observar na natureza, onde sempre permanecem alertas à presença de predadores. Comparando os comportamentos pastando e comendo ração, apesar da ração ser fornecida em único trato no período da manhã, os animais visitaram mais o comedouro no período da tarde, enquanto o pastejo foi mais freqüente nos horários de temperaturas mais amenas, no início da manhã e final da tarde. Tais observações sugerem que o fornecimento de ração pode ser realizado no período da tarde sem nenhum prejuízo ao consumo, ou então ser dividido em dois tratos diários.

Já o protocolo de conservação de sangue em papel a temperatura ambiente demonstrou que é possível a coleta e armazenamento de amostras de sangue, confirmado pelo bom padrão de amplificação com o *primer* Ghbovino. A concentração de DNA no decorrer do período diminuiu, mas a razão DNA/proteína aumentou ao longo dos 30 dias.