



**Análises genético-populacionais em arara-azul-grande
(*Anodorhynchus hyacinthinus*) baseadas em marcadores
mitocondriais: contribuições à conservação biológica da espécie**

TALITA ROBERTO ALEIXO DE ALMEIDA

**Botucatu/SP
2015**

**Análises genético-populacionais em arara-azul-grande
(*Anodorhynchus hyacinthinus*) baseadas em marcadores
mitocondriais: contribuições à conservação biológica da espécie**

Aluno: Talita Roberto Aleixo de Almeida

Orientador: Profa. Dra. Adriane Pinto Wasko

Coorientador: Dra. Flávia Torres Presti

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Botucatu/SP

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Roberto Aleixo de Almeida, Talita.

Análises genético-populacionais em arara-azul-grande
(*Anodorhynchus hyacinthinus*) baseadas em marcadores
mitocondriais : contribuições à conservação biológica da espécie
/ Talita Roberto Aleixo de Almeida. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Adriane Pinto Wasko
Coorientador: Flávia Torres Presti
Capes: 20200005

1. Arara-azul. 2. Genética de populações. 3. Diversidade
genética. 4. Biodiversidade - Conservação. 5. DNA. 6. Atividades
lúdicas - Educação.

Palavras-chave: *Anodorhynchus hyacinthinus*; Atividades
educacionais; Conservação; Estrutura populacional;
Variabilidade genética.

*Aos meus pais,
pelo amor incondicional*

*À minha irmã,
pelo exemplo de bondade e amizade*

*Ao Paulo,
pelo amor e companheirismo*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Adriane Pinto Wasko, pelo acolhimento e oportunidade de desenvolver esse trabalho, por me orientar com dedicação e carinho, pelo exemplo de profissional e pela contribuição para meu crescimento profissional e pessoal. Muito obrigada por tudo.

À Dra. Flávia Torres Presti, pela orientação, paciência, confiança, pelo exemplo de profissional, pela grande amizade e por ser uma pessoa pela qual tenho enorme admiração. Flá, eu sou grata por tudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) e seus funcionários, pelo auxílio na realização desse trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Genética por toda colaboração e suporte oferecidos durante esse tempo de trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

À Profa. Dra. Cristina Yumi Miyaki por gentilmente ceder algumas amostras biológicas para que esse trabalho pudesse ser desenvolvido.

Ao Prof. Dr. Cesar Martins, pelo apoio e pela infraestrutura cedida para que eu pudesse realizar uma parte desse trabalho.

A todos os professores que tive em minha vida e que muito contribuíram para eu chegar até aqui, com destaque para minha professora do Ensino Fundamental, Profa. Mara, a qual me inspirou a cursar Biologia.

À Profa. Dra. Sílvia Mitiko Nishida e ao Dr. Guilherme José da Costa Silva por todas as contribuições como banca examinadora do exame geral de qualificação.

Aos professores Danillo Pinhal e Lígia Mota e todos os amigos do Laboratório de Genética Animal, atuais e ex-integrantes, Marcos, Helder, Pedro, Messi, Renata, Paula, Bianca, Flávia,

Valquíria e Bruna, pela troca de experiências, ensinamentos e por tudo o que vivemos nesses dois anos.

Aos amigos Laboratório de Genômica Interativa, especialmente Adauto, Érica, Natália, Bruno e Diego, pelo apoio teórico e prático, discussões e muitas risadas.

Ao Prof. Dr. Claudio Oliveira e aos amigos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes de Botucatu pelos auxílios teóricos e práticos, em especial Sâmia, Natália, Vanessa e Jeferson.

À minha amiga Bruna, por toda colaboração, pelas discussões e risadas em todos os momentos. Obrigada por me ouvir e me ajudar com tanto carinho em tudo. Espero um dia retribuir.

Aos queridos amigos de casa, Samuel, Camila, Ana Paula, Andrea e Thaís, pela divertidíssima convivência diária, pela amizade, carinho e por todo o apoio.

Às meninas da República Micasa, minha família durante a graduação e da qual sinto muita saudade. Obrigada pelo apoio durante a fase inicial do mestrado, pelo companheirismo e amizade.

A toda minha família, especialmente a meus pais, Célia e Donizete, e minha irmã, Tatiana, pelo amor, apoio e incentivo. Muito obrigada pelos conselhos, ensinamentos, valores familiares e pelo exemplo de honestidade e trabalho. Amo vocês.

Ao meu namorado e amigo Paulo, por todo o apoio, pelo amor, carinho e pelas horas de estudos juntos em toda fase desse mestrado. Não consigo descrever o quanto você me ajudou nesses dois anos. Amo você.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

Resumo

A arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) é uma espécie considerada vulnerável à extinção em consequência, especialmente, da perda do seu habitat e do intenso tráfico ilegal. O número estimado de indivíduos em vida livre no Brasil é de 6.500 animais, distribuídos em três regiões: no Pará, no nordeste do país e no Pantanal Matogrossense, onde se encontra a maioria dos exemplares de *A. hyacinthinus*. Informações sobre a biologia, ecologia e variabilidade genética dessa espécie são fundamentais para subsidiar e elaborar estratégias de conservação de suas populações naturais e cativas. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a estrutura genética de diferentes populações de *A. hyacinthinus* e investigar a dinâmica populacional entre as áreas de distribuição da espécie. Amostras de DNA foram obtidas de 100 exemplares de diferentes localidades e análises genéticas associadas ao primeiro domínio da região controladora do DNA mitocondrial foram realizadas em todos os indivíduos. Um segmento de 498 pares de bases desta região de DNA mitocondrial foi utilizado para caracterizar a estrutura genética populacional dos espécimes de *A. hyacinthinus* amostrados. As análises evidenciaram a existência de diferenciação genética significativa entre amostras do Pantanal Norte e as demais regiões de distribuição da espécie. Menor grau de diferenciação genética, embora significativo, foi evidenciado entre Pantanal Sul e Pará, Pantanal Sul e Nordeste e entre Nordeste e Pará. O nível de diversidade genética encontrado para a espécie estudada se mostrou similar ao descrito em trabalhos anteriores para *A. hyacinthinus* e mais baixo do que valores reportados para outras espécies de psitacídeos não ameaçados. A rede haplotípica gerada, em formato de estrela, sugere que a espécie tem passado por expansão recente, cenário também apontado pela curva unimodal obtida para as populações do Pará e Nordeste. Entretanto, a curva bimodal das populações do Pantanal Norte e Pantanal Sul sugere que estas não estão passando por mudanças no tamanho populacional. Os resultados obtidos demonstram que estratégias direcionadas a maximizar o tamanho de apenas algumas populações de *A. hyacinthinus*, em detrimento de outras, e viabilizar planos de manejo e conservação comuns a todas as regiões de distribuição geográfica da espécie não seriam as ações conservacionistas mais adequadas. O presente trabalho também incluiu, como objetivo complementar, o desenvolvimento de estratégias educativas, dado que a aquisição de conhecimentos a respeito das causas ambientais associadas à extinção de espécies é capaz de induzir mudanças comportamentais e, portanto, contribuir à conservação da diversidade biológica. Dessa forma, um jogo de tabuleiro e uma cartilha com informações lúdicas sobre os riscos de extinção e propostas para conservação de *A. hyacinthinus* foram elaborados e posteriormente aplicados em atividades de educação

ambiental para 283 alunos do Ensino Fundamental I e II de escolas públicas da região do mosaico de Carajás, no Pará. Tais materiais e atividades mostraram-se adequados como instrumentos de maior consciência sobre a importância da conservação de *A. hyacinthinus*. Os resultados obtidos poderão melhor subsidiar programas e ações para conservação das diferentes populações de arara-azul-grande encontradas no país.

Palavras-chave: *Anodorhynchus hyacinthinus*, conservação, estrutura populacional, variabilidade genética, estratégias educacionais.

Abstract

Hyacinth macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*) is considered as a threatened species, classified as vulnerable, especially due to the habitat loss and intense illegal trade. The total estimated number of wild individuals in Brazil is around 6,500 animals, distributed in three regions: Pará State, Northeast Brazil, and Pantanal of Mato Grosso and Pantanal of Mato Grosso do Sul, where most of the hyacinth macaws can be found. Data about the biology, ecology, and genetic variability of this species are fundamental to support and develop conservation strategies of its natural populations. Therefore, the present study primarily aimed to analyze the genetic structure of different populations of *A. hyacinthinus* and examine the population dynamics among the distribution areas of the species. DNA samples were obtained from 100 individuals from distinct areas and genetic analyses associated to the first domain of the mitochondrial control region were performed for all samples. A segment of 498 base pairs of this mitochondrial DNA region was used to characterize the genetic population structure of the sampled hyacinth macaws. The analyses showed the existence of a significant genetic differentiation between samples of North Pantanal and the other distribution regions. A low differentiation level, although also significant, was evidenced between South Pantanal and Pará, between South Pantanal and Northeast, and between Northeast and Pará regions. The genetic diversity index for the studied species was similar to reported data in previous studies of hyacinth macaw and lower than those values described for other non-threatening species of parrots. The generated haplotype network, with a star shape, indicates a recent population expansion, a scenery that was also evidenced by the unimodal shape of the populations from Pará and Northeast. However, the obtained bimodal curve for the populations from North Pantanal and South Pantanal suggests that they are not undergoing changes on the population size. The obtained results indicate that strategies focused on maximizing the size of just some populations of *A. hyacinthinus*, rather than the others, and the development of management and conservation plans that are common to all the geographic distribution regions of the species would not be the best conservation actions. As the acquisition of information about the environmental causes that are associated to species extinction can induce behavioral changes and, therefore, contribute to biodiversity conservation, the present work also included, as an additional objective, the achievement of education strategies. Therefore, a board game and a primer book with playful information about the risks of extinction and proposals for conservation of hyacinth macaw were prepared and further applied, throughout environmental education activities, to 283 students of public elementary grade schools of the

Carajás mosaic region, Pará State. These materials and activities were suitable tools to elucidate the importance of the hyacinth macaw's conservation. The obtained results could better support conservation programs and actions for distinct hyacinth macaw populations in Brazil.

Key words: *Anodorhynchus hyacinthinus*, conservation, genetic structure, diversity index, education strategies.

Lista de Ilustrações

- Figura 1:** Exemplares de *Anodorhynchus hyacinthinus* (arara-azul-grande). Foto: João Marcos Rosa.....27
- Figura 2:** Mapa de distribuição de *Anodorhynchus hyacinthinus*. As regiões em destaque indicam os registros de indivíduos da espécie (adaptado de Birdlife International, 2014). A: Pantanal Sul, B: Pantanal Norte, C: Pará e D: Nordeste.....28
- Figura 3:** Rede de relacionamento de haplótipos de um segmento de 498 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial de exemplares de *Anodorhynchus hyacinthinus* de quatro regiões geográficas distintas. O número de indivíduos de cada localidade com um determinado haplótipo encontra-se indicado na figura. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo. As linhas representam a ligação dos haplótipos por passo mutacional.....42
- Figura 4:** Árvore de haplótipos de *Anodorhynchus hyacinthinus* construída pelo método de máxima parcimônia. O suporte estatístico dos nós é dado pelo valor de *bootstrap* utilizando 1000 replicações. A espécie *Anodorhynchus leari* foi utilizada como grupo externo. ^x: Pantanal Sul; □: Pantanal Norte; ○: Pará; •: Nordeste.....43
- Figura 5:** Gráfico de distribuição *mismatch* para haplótipos encontrados em amostras de *Anodorhynchus hyacinthinus* para as quatro populações amostradas. A distribuição esperada de diferenças par a par, de acordo com o modelo de expansão populacional súbita, é mostrada em linha contínua e a distância observada, pela linha pontilhada 47
- Figura 6:** Imagem do jogo “Conhecendo a arara-azul-grande” contendo um tabuleiro e peças (pinos) para uso de cada jogador.....56
- Figura 7:** Porcentagem de respostas dos alunos participantes das atividades de educação ambiental às seguintes questões: 1 - Você conhece a arara-azul-grande?; 2 - Você já viu uma arara-azul-grande?; 3 - A arara-azul-grande é uma espécie atualmente ameaçada de extinção?; 4 - É crime pegar araras-azuis-grandes na natureza? 59

Figura 8: Número de acertos (%) em relação ao questionário inicialmente e posteriormente preenchido pelos participantes das atividades de educação ambiental. Os números no gráfico referem-se às questões: 1 -“Quais das aves abaixo são classificadas como psitacídeos?”; 2 - “Em quais regiões do Brasil a arara-azul-grande pode ser encontrada?”; 3 - “Qual é o principal alimento da arara-azul-grande?”; 4 - “Em que árvore da região de Carajás a arara-azul-grande faz seu ninho?”.....60

Figura 9: Resultados da avaliação dos alunos participantes das atividades de educação ambiental em relação à palestra realizada. Os dados encontram-se apresentados em porcentagem. NR - porcentagem dos alunos que não responderam à pergunta.....61

Figura 10: Resultados da avaliação dos alunos participantes das atividades de educação ambiental em relação ao jogo aplicado. Os dados encontram-se apresentados em porcentagem.....61

Figura 11: Resultados da avaliação dos alunos participantes das atividades de educação ambiental em relação à atuação dos mediadores (monitores). Os dados encontram-se apresentados em porcentagem.....62

Figura 12: Resultados da avaliação dos alunos participantes das atividades de educação ambiental em relação ao assunto abordado. Os dados encontram-se apresentados em porcentagem.....62

Lista de Tabelas

Tabela 1: Sítios variáveis em 498 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial e número de indivíduos de <i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> por região geográfica que possuem os haplótipos encontrados.....	40
Tabela 2: Valores de índices de diversidade genética associados à sequência nucleotídica da região controle do DNA mitocondrial de 100 indivíduos de <i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> ...	41
Tabela 3: Valores de F_{ST} calculados na comparação par a par das populações de <i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> . Todos os valores obtiveram significância estatística ($p < 0.05$)	44
Tabela 4: Valor de F_{ST} calculado na comparação para a par de dois agrupamentos de populações de <i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> (Valor com significância estatística $p < 0,05$)	44
Tabela 5: Valor de Φ_{ST} , calculado pela AMOVA, considerando todos os indivíduos de <i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> das quatro regiões geográficas em um único agrupamento, levando em consideração um valor com significância estatística $p < 0.05$	45
Tabela 6: Resultado da AMOVA para dois grupos de <i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> (Pantanal Sul + Pantanal Norte e Nordeste + Pará), valores atribuídos à diferenciação dentro de cada população (Φ_{SC}), de toda a população (Φ_{ST}) e entre as populações (Φ_{CT}). Em negrito, resultado com significância estatística $p < 0.05$	45
Tabela 7: Índices de neutralidade D de Tajima, F_s de Fu, D^* , F^* e R_2 para cada população amostrada e para <i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> como um todo. Em negrito, valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).....	46
Tabela 8: Nome da escola, data da atividade educativa realizada, série de vínculo ao Ensino Fundamental I ou II e número de participantes por turma.....	58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE	20
1.2. GENÉTICA APLICADA A CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIES	21
1.3. MARCADORES MOLECULARES	22
1.4. DNA MITOCONDRIAL	22
1.6. FAMÍLIA PSITTACIDAE	25
1.7. ARARA-AZUL-GRANDE (<i>ANODORHYNCHUS HYACINTHINUS</i>).....	26
1.8. EDUCAÇÃO AMBIENTAL	30
2. OBJETIVOS	31
2.1. OBJETIVO I	31
2.2. OBJETIVO II.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. ANÁLISES GENÉTICAS	31
3.1.1. AMOSTRAGEM BIOLÓGICA	31
3.1.2. EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL	32
3.1.3. QUANTIFICAÇÃO DO DNA TOTAL.....	33
3.1.4. REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO (PCR) E PURIFICAÇÃO DO PRODUTO	33
3.1.5. SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO	34
3.2. ANÁLISE DOS DADOS	34
3.2.1. EDIÇÃO E ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS	34
3.2.2. VARIABILIDADE ENTRE AS SEQUÊNCIAS.....	35
3.3. ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL	36
3.3.1. F_{ST} E AMOVA	36
3.3.2. INFERÊNCIA DEMOGRÁFICA	36
3.4. ATIVIDADES EDUCACIONAIS	37
3.4.1. CONFECÇÃO DE MATERIAL DIDÁTICO	37
3.4.2. EDUCAÇÃO AMBIENTAL	38
3.4.3. PÚBLICO ALVO	38
4. CAPÍTULO I.....	39
4.1. RESULTADOS	39
4.1.1. ISOLAMENTO DE DNA.....	39
4.1.2. ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA.....	39
4.1.3. ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL.....	41
4.1.4 INFERÊNCIA DEMOGRÁFICA	45

4.2. DISCUSSÃO	47
4.2.1. VARIABILIDADE GENÉTICA	47
4.2.2. REDE DE HAPLÓTIPOS.....	49
4.2.4. INFERÊNCIA DEMOGRÁFICA	51
4.3 CONCLUSÕES	54
 5. CAPÍTULO II.....	 55
5.1. RESULTADOS	55
5.1.1. JOGO DE TABULEIRO	55
5.1.2. CARTILHA	56
5.1.3. ATIVIDADES DE EDUCAÇÃO AMBIENTAL.....	57
5.2. DISCUSSÃO	62
5.3. CONCLUSÕES	64
 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	 65
 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 65
 8. ANEXOS	 76

1. Introdução

1.1. Conservação da Biodiversidade

A diversidade biológica refere-se à extensão total de espécies vivas, à variação genética entre os indivíduos da mesma espécie, às comunidades biológicas nas quais as espécies vivem e às interações no nível do ecossistema da comunidade com o ambiente físico e químico (Primack & Rodrigues, 2002; Ridley, 2006; Frankham *et al.*, 2008). Embora esta diversidade seja resultante de milhares de anos de evolução (Ridley, 2006), esta vem decaindo extraordinariamente nas últimas décadas devido a alterações antrópicas associadas, especialmente, à devastação dos ecossistemas naturais, alterações climáticas e poluição atmosférica (Primack & Rodrigues, 2002).

As ameaças atuais à existência dessa biodiversidade são reflexos do aumento gradativo das demandas de uma população humana crescente e dos contínuos avanços tecnológicos (Primack & Rodrigues, 2002). Nunca antes na história da Terra, uma única espécie afetou tão profundamente a abundância e, até mesmo, a perspectiva da sobrevivência de outras espécies (Pough *et al.*, 2008). Atualmente, um grande número de espécies já se encontra extinto e muitas outras têm tamanhos populacionais reduzidos que as colocam em risco (Frankham *et al.*, 2008; IUCN, 2015).

A união de esforços para reverter ou minimizar os efeitos deste processo ainda é incipiente e deve envolver iniciativas integradas por diversos ramos do conhecimento como economia, política, ciências sociais e muitos ramos das ciências biológicas, as quais constituem uma área relativamente nova conhecida como Biologia da Conservação (Eizirik, 1996). Trata-se de uma ciência que emergiu durante a década de 1980 (Soulé & Wilcox, 1980), sob uma estrutura multidisciplinar, como resposta da comunidade científica aos impactos humanos sobre a biodiversidade (Soulé, 1985; Eizirik, 1996; Franco, 2013).

O Brasil é um dos países mais ricos do mundo em biodiversidade, pois abriga pelo menos 20% das espécies do planeta, com altas taxas de endemismo para diferentes grupos taxonômicos (Mittermeier *et al.*, 2005). Por outro lado, além de ser um país de ampla extensão territorial, existe ainda pouca disponibilidade de recursos para conservação de nossa biodiversidade. Muitas de suas perdas ocorrem através do desmatamento, da conversão de paisagens naturais em reflorestamentos, culturas agrícolas e pastagens, e também da expansão industrial e urbana (Mittermeier *et al.*, 2005). Dessa forma, encarar as dificuldades para conservar espécies no Brasil, como destacado por Rodrigues (2002), significa lidar com áreas extensas, muitas espécies, poucos recursos e um grande número de pessoas sem acesso à

nutrição, educação e saúde, o que frequentemente se reflete em mais problemas de conservação.

Embora as ameaças à vida silvestre e às paisagens naturais do país sejam dramáticas, o Brasil possui grande potencial para o desenvolvimento de estratégias bem-sucedidas para conservação da biodiversidade, principalmente embasadas por uma comunidade forte de cientistas e profissionais da área de Biologia da Conservação (Mittermeier *et al.*, 2005).

1.2. Genética aplicada à conservação de espécies

A biodiversidade não é apenas a variabilidade taxonômica ou ecológica (número de espécies de uma comunidade e suas interações), sendo principalmente oriunda da diversidade genética existente entre os indivíduos de uma mesma população ou de populações geograficamente distintas, a qual é fundamental para a seleção natural e, por sua vez, para o processo evolutivo das espécies (Ridley, 2006; Begon *et al.*, 2007).

A variabilidade genética potencializa o valor adaptativo das populações em resposta aos eventos estocásticos sofridos pelo ambiente garantindo o sucesso reprodutivo dos indivíduos em longo prazo (Primack & Rodrigues, 2002; Ridley, 2006; Ricklefs, 2010). Portanto, a redução da diversidade genética diminui o potencial de adaptação das populações em resistir às variações ambientais via seleção natural (Primack & Rodrigues, 2002). Populações de espécies raras têm, em geral, menor variação genética em relação às mais comuns e, por isso, são mais vulneráveis à extinção em locais de baixa resistência ambiental (Ridley, 2006). Com isso, um novo ramo científico reconhecido como Genética da Conservação emergiu para empregar teorias e técnicas da genética em programas de conservação com o objetivo de reduzir os riscos de extinção, principalmente em espécies ameaçadas (Frankham *et al.*, 2008).

O conhecimento sobre a biologia de espécies ameaçadas é essencial para o planejamento de estratégias de conservação. Estudos que reúnem dados de natureza taxonômica, ecológica, comportamental e demográfica, aliados a informações genéticas, são imprescindíveis para compreender a dinâmica das populações (Sherwin *et al.*, 2000). Os dados de origem genética são ferramentas potenciais, que fornecem informações de diversas naturezas, os quais permitem estimar, por exemplo, a estrutura genética entre populações de uma mesma espécie (Faria, *et al.*, 2007; Presti, 2011), identificar o sexo de espécies que não apresentam dimorfismo sexual aparente (Bantock *et al.*, 2007), verificar a origem geográfica de um indivíduo, dar suporte ao controle do tráfico ilegal de animais (Miyaki, 2001; Solé-Cava, 2001; Presti, 2011), revelar espécies crípticas (Toledo Filho *et al.* 2002), permitir

escolhas de locais para reintrodução (Caparroz *et al.*, 2013) e também delinear a relação filogenética ou filogeográfica de um determinado grupo (Tavares *et al.*, 2006). Tais informações genéticas são atualmente obtidas por meio de diferentes marcadores moleculares, associados tanto ao genoma nuclear quanto ao genoma mitocondrial. O uso desses marcadores, associado a análises estatísticas, tem se mostrado extremamente eficiente em estudos direcionados à conservação e uso de recursos genéticos.

1.3. Marcadores moleculares

Com o advento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a manipulação de ácidos nucleicos, o que levou à análise de diferentes tipos de marcadores moleculares na década de 1980. Tais marcadores moleculares podem corresponder a qualquer loco gênico, ou seu próprio produto, que apresente polimorfismos inerentes e que possam ser aplicados em estudos que buscam compreender um problema biológico. De maneira mais ampla, marcadores moleculares podem ser definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de qualquer outro segmento específico de DNA (Awise, 2004).

As tecnologias atualmente disponíveis para isolamento e análise de marcadores moleculares, tanto de origem nuclear como mitocondrial, permitem a identificação de um grande número de polimorfismos intra ou interpopulacionais distribuídos ao longo do genoma (Awise, 1994). Os dados resultantes de análises genéticas embasadas em diferentes tipos de marcadores moleculares podem fornecer informações sobre a estrutura genética populacional, níveis de fluxo gênico, relações filogenéticas, biogeografia de grupos definidos e análise de parentesco (Awise, 1994). Dessa forma, os marcadores genéticos são ferramentas poderosas e informativas para ecólogos e geneticistas da conservação definirem, por exemplo, a escala geográfica e a área adequada para realização de monitoramento e manejo das populações (Feral, 2002).

1.4. DNA mitocondrial

O genoma mitocondrial em animais é constituído de uma única molécula circular covalentemente fechada de pequeno tamanho, que possui em média 16 kb de comprimento, sendo herdado maternalmente e geralmente não apresenta recombinação gênica (Awise *et al.*, 1994). Este está organizado em 37 genes codificantes, dos quais 22 resultam em RNAs transportadores, 2 são para RNAs ribossomais e 13 são transcritos em RNAs mensageiros e

traduzidos, principalmente, nos complexos proteicos responsáveis pela dinâmica da cadeia transportadora de elétrons (Avisé, 2000).

Embora o DNA mitocondrial (DNAm_t) seja relativamente bem conservado entre distintas espécies animais, sua ordem e estrutura gênica têm mostrado variação em diferentes grupos de aves e um exemplo dessas diferenças está relacionado à região controladora. Embora a maioria das aves apresente uma única cópia da região controle mitocondrial, alguns grupos possuem esta região duplicada (Eberhard *et al.*, 2001). Estudos em diversos representantes de psitacídeos neotropicais, incluindo espécies do gênero *Anodorhynchus*, demonstraram a presença de apenas uma região controle no DNA mitocondrial deste grupo de aves (Tavares, 2001).

A região controle é caracterizada por apresentar alta variabilidade, devido, principalmente, a substituições de nucleotídeos, presença de curtas deleções e inserções e variação no número de repetições *em tandem*. A região controle pode ser dividida em três principais domínios: Domínio I - rico em adenina e citosina, corresponde à região adjacente ao tRNA^{Glu} na ordem gênica típica das aves, possui sequências associadas com o término de replicação da fita H e frequentemente inclui repetições de números variáveis *em tandem* (VNTRs - *Variable Number of Tandem Repeats*); Domínio II - rico em citosina e guanina, é caracterizado por ser o domínio mais conservado; e Domínio III - rico em adenina e timina, se localiza próximo ao tRNA^{Phe} na ordem gênica típica das aves. É considerado o domínio mais variável, porém contém sequências conservadas de importância funcional, como a presença de promotores de transcrição das fitas leve e pesada, origem de replicação da fita H e curtas sequências de blocos conservados (Baker & Marshall, 1997).

Os marcadores mitocondriais são indicadores de variabilidade em estudos de estrutura genética populacional de diversos grupos de animais, incluindo os vertebrados, por serem polimórficos e possuírem altas taxas de mutação (Collet, 2004; Presti, 2006). A região controle do DNA mitocondrial vem sendo analisada para determinar o nível da estrutura genética em diversas espécies de aves, como *Dendroica petechia* (mariquita-amarela) (Browne *et al.*, 2008), *Phalacrocorax auritus* (biguá de crista dupla) (Mercer *et al.*, 2013), *Larus dominicanus* (gaivotão) (Dantas, 2012), *Harpia harpyja* (harpia) (Banhos *et al.*, 2008), e diversas espécies de psitacídeos (Eberhard *et al.*, 2001; Caparroz, 2009; Caparroz, 2013; Presti, 2006; Faria, 2007; Presti, 2011). Tais informações mostram-se úteis na proposição e desenvolvimento de estratégias conservacionistas e planos de manejo populacional, especialmente aquelas associadas a espécies e/ou populações ameaçadas de extinção.

1.5. Estrutura genética populacional

O conhecimento da estrutura genética populacional é uma informação importante para o desenvolvimento e manutenção de planos de manejo e conservação. O manejo adequado de grupos deve preservar tanto a diversidade local quanto as adaptações em decorrência da partilha geográfica da variabilidade genética de uma espécie (Haig, 1998). Por outro lado, se as populações não são diferenciadas geneticamente, pode ser viável concentrar a proteção da espécie em apenas uma área, usando indivíduos dessa área para eventual recolonização de outras regiões, caso necessário (Haig, 1998). Com isso, informações sobre a estrutura genética de populações fomentam esforços eficientes de conservação e condicionam melhoria no manejo dos recursos disponíveis, permitindo traçar a história natural das espécies e compreender melhor a ação das forças evolutivas sobre suas populações (Presti, 2011).

O isolamento e a fragmentação de populações naturais podem aumentar os riscos de extinção local devido à redução do potencial genético associado à perda de variabilidade (Frankham, 2003). Nesse sentido, o isolamento geográfico resultante do surgimento de barreiras pode interferir no deslocamento de indivíduos, dificultando o encontro entre as populações e tendendo a acentuar diferenças genéticas entre estas. Em contrapartida, o fluxo gênico entre os indivíduos permite a homogeneização da composição genética da população, reduzindo suas diferenças genéticas existentes (Crochet, 1996).

Eventos moleculares como recombinação gênica, mutação, deriva genética e seleção natural alteram frequências alélicas e genotípicas entre populações isoladas de tal modo que, em longo prazo, estas populações acumulam mudanças que podem refletir profundamente na compreensão de sua posição sistemática, adaptação ecológica e, também, na condução do processo evolutivo da espécie (Ridley, 2006). Assim, a estrutura genética pode ser agravada pela perda de diversidade. Os alelos que são únicos para uma população provavelmente são perdidos por deriva genética em relação àqueles oriundos de uma grande população panmítica (Hartl & Clark, 1997).

Adicionalmente aos estudos de populações naturais, programas que visam a reprodução em cativeiro também podem ser beneficiados por dados de diversidade genética, por intermédio da identificação precisa de populações potenciais para evitar a depressão endogâmica e exogâmica (Presti, 2011). O manejo de uma espécie em cativeiro, sem considerar a origem geográfica dos indivíduos para reprodução, pode acarretar em problemas biológicos, como a perda da capacidade adaptativa dos indivíduos ao ambiente e baixa fertilidade (Alacs *et al.*, 2007; Frankham, 2008; Templeton, 2011).

O emprego de um manejo equivocado de populações, principalmente em espécies ameaçadas de extinção, favorece o aumento dos riscos de extinção local, já que boa parte de sua variedade genética pode ser perdida por eventos como endogamia ou gargalo populacional recente. Desse modo, é importante estudar a diferenciação genética entre populações de uma espécie e verificar sua estrutura populacional.

1.6. Família Psittacidae

A Família Psittacidae compreende um grupo de aves popularmente conhecidas como araras, papagaios e periquitos (Collar, 1997; Sick, 1997). É composta por aproximadamente 150 espécies distribuídas em 30 gêneros (Collar, 1997), apresentando distribuição global, concentrando-se principalmente nas zonas tropicais (Sick, 1997). Essas aves são globalmente reconhecidas por sua extraordinária plumagem, habilidade mímica e seu caráter carismático (Wright *et al.*, 2001). Sua principal característica é o formato do bico alto e recurvado, cuja maxila superior é curva e envolve a maxila inferior (Forshaw, 1989).

A maioria dos psitacídeos é frugívora e, embora algumas espécies, como *Aratinga solitaria jandaya* (jandaia-verdadeira) e *Aratinga aurea* (jandaia-coquinho), se alimentem da polpa de frutas, muitas selecionam as suas sementes. Ainda que muitos psitacídeos triturem os caroços, destruindo as sementes, a dispersão de sementes por estas aves é uma atividade ecológica comum e fundamental nas florestas tropicais do mundo todo (Galetti, 1992; Sick, 1997; Galetti, 2002).

Com intensa vocalização, característica utilizada para identificação taxonômica, os psitacídeos são aves sociais e ruidosas (Souza, 2004). Sua complexidade de cantos também se associa com a realização de duetos entre casais, como já descrito para os gêneros *Brotogeris* (periquitos) e *Triclaria* (papagaios), e com a largamente conhecida capacidade de imitar sons, como observado em *Amazona*, *Aratinga* e *Brotogeris* (papagaios e periquitos) (Sick, 1997).

A maioria das espécies é considerada monogâmica e o casal divide as tarefas de cuidado da prole, permanecendo no ninho a maior parte do tempo. Utilizam principalmente ocos em troncos de árvores para a reprodução. Algumas espécies também utilizam cavidades nas encostas de morros e montanhas, como *Ara chloroptera* (arara-vermelha) e *Anodorhynchus leari* (arara-azul-de-lear), ou cupinzeiros, como *Aratinga cactorum* (periquito-da-caatinga) e *Amazona aestiva* (papagaio-verdadeiro). *Myiopsitta monachus* (caturrita) é o único psitacídeo que constrói seus ninhos utilizando gravetos (Sick, 1997). O período reprodutivo destas aves, no Brasil, se estende de julho até março e pode variar de acordo com a espécie e com as condições ambientais. Normalmente machos e fêmeas são

semelhantes, com pouco ou nenhum dimorfismo sexual. Porém, mesmo no caso de espécies sem grande diferenciação morfológica externa entre os sexos, podem ocorrer diferenças na cor da íris, porte físico, tamanho da cauda e coloração das penas (Sick, 1997).

Segundo Wright *et al.* (2001), a família Psittacidae está entre as mais ameaçadas dentre as famílias de aves - cerca de 31% das espécies de psitacídeos neotropicais encontram-se sob risco de extinção em nível global. Além de apresentarem baixas taxas de reprodução, ninhadas pequenas, baixa sobrevivência de indivíduos juvenis e maturidade sexual tardia (Wright *et al.*, 2001), a interferência antrópica nos ecossistemas naturais tem levado a um acentuado declínio de suas populações. O tráfico ilegal de animais e seus subprodutos também têm causado grande impacto sobre as populações de psitacídeos. Adicionalmente, a caça para alimentação humana e para coleta de penas também representa uma ameaça para as espécies de maior porte, especialmente para as araras (Eckstrom, 1994).

No Brasil, várias espécies de psitacídeos apresentam diferentes graus de ameaça, como *Anodorhynchus glaucus* (arara-azul-pequena), que se encontra extinta na natureza e cativeiro, *Cyanopsitta spixii* (ararinha-azul), a qual se encontra extinta na natureza, *Anodorhynchus leari* (arara-azul-de-lear), que é atualmente classificada como em perigo de extinção, e *Anodorhynchus hyacinthinus* (arara-azul-grande), espécie foco do presente estudo, que se encontra na categoria vulnerável de extinção (IUCN, 2014).

1.7. Arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*)

Anodorhynchus hyacinthinus (Latham, 1790), popularmente conhecida como arara-azul-grande (Figura 1), é considerada a maior representante da família Psittacidae, atingindo até um metro de comprimento da ponta do bico à ponta da cauda (Sick, 1997). Possui bico desmesurado, parecendo ser maior que o próprio crânio, com um entalhe pouco pronunciado na mandíbula. A plumagem é totalmente azul-cobalto com amarelo em volta do anel perioftálmico e da mandíbula (Sick, 1997). É uma ave social que vive aos pares, casais, famílias ou bandos, com populações consideradas sedentárias, uma vez que fazem apenas pequenas migrações diárias para alimentação e/ou reprodução (Guedes, 2009).



Figura 1: Exemplos de *Anodorhynchus hyacinthinus* (arara-azul-grande). Foto: João Marcos Rosa.

Estima-se que existam aproximadamente 6.500 indivíduos de *A. hyacinthinus* em vida livre, os quais estão distribuídos em três regiões principais no Brasil: no Pará (leste da região amazônica e oeste de Altamira), no nordeste e centro do país (região entre os estados do Tocantins, Piauí, Maranhão, Bahia, Minas Gerais e Goiás) e no Pantanal Matogrossense, região na qual se encontra a maioria dos indivíduos da espécie (Collar, 1997; Guedes *et al.*, 2008; Birdlife International, 2014) (Figura 2).

A condição de alta filopatria mantém os indivíduos fiéis aos seus locais de alimentação e sítios reprodutivos (Yamashita, 1992; Guedes, 1993). São aves consideradas predominantemente monogâmicas (Guedes, 1993; Miyaki *et al.*, 1995), com o casal permanecendo junto mesmo fora da estação reprodutiva, dividindo as tarefas de seleção, reforma e cuidado do ninho e dos filhotes (Guedes, 1993; Guedes & Harper, 1995), embora o acasalamento extra-par já tenha sido registrado (Schneider *et al.*, 2006; Presti, 2011).

A sazonalidade reprodutiva dos casais pode ser anual ou bianual, pois o investimento no cuidado parental persiste em média por um ano (Guedes, 1993). Sendo totalmente dependentes dos pais, os filhotes permanecem no ninho durante três meses e meio, período ao qual estão vulneráveis à predação e ao parasitismo (Guedes & Harper, 1995). Com isso, a taxa de mortalidade é maior em recém-nascidos e diminui ao longo dos anos, até atingirem a idade adulta (Guedes, 1993). Mesmo depois de alçarem voo, os jovens ainda dependem dos pais para obtenção de alimento, dispersando-se somente após 12 ou 18 meses. O tempo de separação do filhote está relacionado com a experiência e maturidade do casal (Guedes, 2004; Guedes *et al.*, 2008) - casais experientes reproduzem-se todos os anos, enquanto casais jovens e inexperientes se reproduzem a cada dois anos (Presti, 2006). Miyaki *et al.* (1999)

verificaram que a proporção de nascimentos entre machos e fêmeas em ambiente natural é próximo de 1:1.



Figura 2: Mapa de distribuição de *Anodorhynchus hyacinthinus*. As regiões em destaque indicam os registros de indivíduos da espécie (adaptado de Birdlife International, 2014). A: Pantanal Sul, B: Pantanal Norte, C: Pará e D: Nordeste.

A construção de ninhos nas populações do Pantanal e do Pará ocorre principalmente no gênero arbóreo *Sterculia*, sendo as espécies *Sterculia apetala* (manduvi) e *Sterculia pruriens* (axixá), respectivamente (Guedes, 1993; Pinho & Nogueira, 2003). A partir de cavidades no cerne exposto da árvore, muitas vezes iniciadas por espécies de pica-paus, ou pela quebra de um ramo lateral, ou ainda por atividades de fungos e cupins, *A. hyacinthinus* utiliza o bico para aumentá-las e assim estabelecer seu sítio reprodutivo (Presti *et al.*, 2009). Na região nordeste, os indivíduos nidificam preferencialmente em fendas ou aberturas naturais de paredões rochosos de arenito (Collar, 1997).

No Pantanal Matogrossense, a dieta de *A. hyacinthinus* é especializada no fruto de duas palmeiras: a bocaiúva (*Acrocomia totai*) e o acuri (*Scheelea phaleata*). Na região de encontro do Piauí, Tocantins, Maranhão e Bahia, os indivíduos obtêm alimento do endosperma e do mesocarpo da piaçava (*Atalea funifera*) e do catolé (*Syagrus cearensis*). Já na região de Carajás e Altamira, o inajá (*Maximiliana regia*), o babaçu (*Orbignya phalerata*),

o tucum (*Astocarym* sp.) e frutos de acuri ou bacuri (*Scheelea phalerata*) fazem parte da dieta comum de *A. hyacinthinus* (Munn *et al.*, 1989; Presti *et al.*, 2009).

As populações de *A. hyacinthinus* do Pantanal brasileiro são monitoradas desde a década de 1990 pelo Projeto Arara-Azul, o qual despende grandes esforços para a proteção e recuperação da espécie. A densidade das populações do Pantanal chegou a níveis críticos na década de 1980 e estima-se que, neste período, mais de 10 mil aves foram capturadas e comercializadas ilegalmente (Munn *et al.*, 1987). Na década seguinte, a situação se agravou ainda mais com a perda de seu habitat pelo desmatamento e queimadas, reduzindo o tamanho da população a cerca de 1.500 indivíduos. Muitos animais foram vendidos como “pets” e mortos por falta de cuidados básicos, principalmente relacionados com a dieta e à dificuldade em domesticar exemplares silvestres (Ferreira, 2010).

Devido principalmente à perda de habitat e à excessiva captura para o comércio ilegal, *A. hyacinthinus* é considerada ameaçada de extinção (Collar *et al.*, 1992; IUCN, 2015). De acordo com IUCN (2015), a espécie está incluída na categoria "vulnerável à extinção" e está listada no Apêndice I da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Silvestre Ameaçadas de Extinção (CITES, 1987).

Trabalhos prévios na área de genética da conservação ainda são escassos em populações de *A. hyacinthinus*. Faria (2006) analisou a região controladora do DNA mitocondrial de dois grupos de animais do Pantanal e de um grupo do Piauí, evidenciando que, embora não exista estruturação genética entre os animais do Pantanal, estes são geneticamente diferentes dos animais encontrados no Piauí. Em um trabalho posterior, baseado em marcadores microssatélites e de DNA mitocondrial (genes citocromo b, ND2 e ND5), quatro populações do Pantanal, uma do Pará e uma do nordeste do país foram analisadas. As diferenças genéticas identificadas permitiram propor a ocorrência de três unidades evolutivamente significativas - Pantanal Norte, Pantanal Sul e Norte-Nordeste (Presti, 2011). Tais dados mostram que tanto repetições microssatélites como regiões específicas do DNAm representam marcadores moleculares que permitem a identificação de níveis de diversidade genética suficientes para análises populacionais em *A. hyacinthinus*. Adicionalmente, estes também foram efetivos para evidenciar a estrutura genética populacional da espécie.

Novos estudos genéticos, em diferentes populações de *A. hyacinthinus* e com um maior número de marcadores moleculares, poderão melhor subsidiar programas conservacionistas efetivos para a espécie, incluindo a definição de metas e estratégias que evitem um maior risco de extinção para a espécie.

1.8. Educação Ambiental

A educação é o principal método oferecido pelas sociedades que viabilizam o posicionamento favorável dos indivíduos à manutenção e conservação do ambiente natural, pois a aquisição de conhecimentos a respeito das causas ambientais é capaz de induzir mudanças comportamentais. Uma forma adequada de compreender as interações no nível do ecossistema da comunidade com o ambiente físico e químico refere-se à educação ambiental (Guimarães, 2001). De acordo com a Política Nacional de Educação Ambiental, “entende-se por educação ambiental os processos por meio dos quais o indivíduo e a coletividade constroem valores sociais, conhecimentos, habilidades, atitudes e competências voltadas para a conservação do meio ambiente, bem de uso comum do povo, essencial à sadia qualidade de vida e sua sustentabilidade” (PNEA, Lei nº. 9795/1999, Artigo 1º). Dado que muitas pessoas não se sentem conectadas ao meio ambiente e, dessa forma, não sentem a necessidade de ajudá-lo, mudá-lo ou conservá-lo, o investimento em atividades de educação ambiental é imprescindível, especialmente se estas forem direcionadas aos jovens, uma vez que estes se encontram em fase de consolidação de ideais (Pedrini *et al.*, 2010). Adicionalmente, as Diretrizes Curriculares Nacionais para Educação Básica (Resolução Nacional nº 2, 2012) reconhecem a relevância da educação ambiental e seu papel visível diante do atual contexto nacional e mundial em que a preocupação com mudanças climáticas, a degradação da natureza, a redução da biodiversidade e os riscos socioambientais evidenciam-se na prática social.

As araras-azuis-grandes são excelentes candidatas para aplicação e desenvolvimento de atividades inerentes à educação ambiental. É uma ave carismática que desperta curiosidade nas pessoas por suas características, como sua aparência dócil, o colorido vivo e o arranjo das plumagens, o tamanho e a anatomia corpórea, a capacidade de voar, a vocalização e, principalmente, a habilidade mímica (Silva & Mamede, 2005). Além disso, atualmente, é considerada como espécie vulnerável à extinção, devido aos rápidos declínios populacionais causados pela perda permanente de habitat e captura para o comércio ilegal (IUCN, 2015).

Diante desse contexto, é imprescindível o incentivo à conservação das araras-azuis-grandes, especialmente junto às comunidades próximas aos locais de distribuição da espécie. Tal incentivo conservacionista pode ser alcançado mediante ações educacionais, com a finalidade de sensibilizar e de gerar inquietação sobre as ameaças à espécie, o que pode conduzir a medidas e estratégias de conservação mais viáveis e efetivas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo I

O presente projeto tem como objetivo principal verificar a estrutura genética de diferentes populações de *A. hyacinthinus* e investigar a dinâmica populacional de indivíduos de diferentes áreas de distribuição da espécie por meio da análise de sequências de DNA mitocondrial.

Visando atingir tal objetivo, este trabalho tem como metas:

- Identificar o número e a distribuição geográfica de haplótipos de *A. hyacinthinus* associados à região controladora do DNA mitocondrial.
- Caracterizar a estrutura populacional de *A. hyacinthinus* por meio da comparação dos níveis de variabilidade genética de diferentes regiões amostradas.
- Propor hipóteses a respeito da história demográfica da espécie.
- Propor medidas para a conservação da espécie com base nos dados gerados.

2.2. Objetivo II

O presente projeto tem como objetivo complementar desenvolver estratégias educativas direcionadas à conservação de *A. hyacinthinus*.

Visando atingir tal objetivo, este trabalho tem como metas:

- Gerar materiais didáticos direcionados ao ensino básico.
- Desenvolver atividades de educação ambiental para estudantes do ensino básico.
- Avaliar a aceitação das atividades propostas e seus possíveis impactos para conservação da espécie.
- Propor medidas para a conservação da espécie com base nos resultados obtidos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Análises Genéticas

3.1.1. Amostragem Biológica

De forma a utilizar procedimentos não-destrutivos de amostragem biológica, foram coletadas alíquotas de sangue de filhotes e de indivíduos adultos de *A. hyacinthinus*, totalizando 100 exemplares de diferentes localidades (Anexo I). As amostras foram categorizadas em quatro diferentes regiões geográficas: Nordeste (21 amostras de Tocantins e

5 do Piauí), Pará (23 amostras do Pará), Pantanal Norte (22 amostras Mato Grosso) e Pantanal Sul (29 amostras do Mato Grosso do Sul) que foram obtidas em colaboração com o Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Aves da Universidade de São Paulo, coordenado pelo Profa. Dra. Cristina Yumi Miyaki. Além disso, amostras de sangue de animais da região do Pará (Carajás) foram obtidas por meio de coletas previstas no projeto de pesquisa “Conservação das araras-azuis (*Anodorhynchus hyacinthinus*) no mosaico de Carajás” realizado por meio de convênio entre UNESP-Fundibio (Fundação do Instituto de Biociências) e empresa Vale S.A.

Após contenção dos animais, o local de retirada das amostras biológicas foi higienizado com algodão embebido em álcool 70%. Aproximadamente 0,1 ml de sangue da veia braquial da asa foram coletados com seringa descartável e preservados em etanol absoluto. Após a retirada de sangue de cada animal, as amostras foram armazenadas em tubos de 1,5 ml contendo álcool etílico absoluto (100%), mantidos a -20°C até o momento de extração do DNA. Após a coleta das amostras, os indivíduos foram recolocados com segurança no ninho. O procedimento de coleta biológica implicou em riscos extremamente reduzidos de desenvolvimento de infecções nos animais.

3.1.2. Extração de DNA total

A extração de DNA total seguiu o protocolo baseado na utilização de proteinase K e fenol-clorofórmio, modificado segundo Bruford *et al.* (1992). Foram misturados 300 µl de TNE (50mM de Tris, 100mM de NaCl e 5mM de EDTA, pH 7,5), 30 µl de Tris HCl 1M pH 7,5, 8 µl de SDS 25% e 20 µl de proteinase K (20mg/mL) e acrescentados cerca de 2 mm² do sangue coagulado. O material foi incubado a 37°C durante cerca de 10 horas ou a 55°C por 4 horas, em banho-maria. Após a incubação, foram acrescentados, aproximadamente, 360 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e o tubo foi invertido algumas vezes para misturar as soluções. Em seguida, este foi colocado em vortex por 10 segundos e, por fim, centrifugado por 10 minutos a 12000 rpm. A fase superior da solução foi retirada com auxílio de uma pipeta e transferida para um tubo novo. A esse novo tubo foi adicionado, aproximadamente, 500 µl de etanol absoluto. O tubo foi invertido para precipitação do DNA e centrifugado por 30 minutos a 12000 rpm. Descartado o sobrenadante, o precipitado foi lavado com 500 µl de etanol a 70% e centrifugado por 10 minutos a 12000 rpm. Após o sobrenadante ser descartado, o precipitado foi mantido à temperatura ambiente até que

estivesse totalmente seco e posteriormente foi ressuspendido em água milliQ autoclavada. A solução com DNA diluído foi armazenado a 4° C.

3.1.3. Quantificação do DNA amostral

A quantificação e a verificação de contaminação para todas as amostras de DNA obtidas foram feitas em espectrofotômetro Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific (Thermo-Scientific, EUA). A quantificação de DNA total contido em cada amostra individual e a verificação de ocorrência de contaminação por proteínas e/ou solventes orgânicos como álcool/fenol/clorofórmio foi feita com base nas razões de absorbância da luz na faixa de 260/280nm e 230/260nm, respectivamente.

Para conferir a integridade do DNA, este foi submetido a uma corrida de eletroforese em gel de agarose 1% imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), corado com Gel RedTM e visualizado em transluminador, sob luz ultravioleta.

3.1.4. Reação de amplificação (PCR) e purificação do produto

Segmentos da região controladora do DNA mitocondrial foram obtidos utilizando os *primers* Lglu 16376 (5' GCCCCTGAAAARCCATCGT 3') e H522 (5' TGGCCCTGACYTAGGAACCAG 3') (Eberhard *et al.*, 2001), previamente testados em *A. hyacinthinus* por Farias *et al.* (2006) e utilizados com sucesso para amplificação de fragmentos de DNA de outros psitacídeos como *Ara ararauna* (Fernandes & Caparroz, 2003; Caparroz *et al.*, 2009). As reações de amplificação (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) foram feitas em um volume final de 11 µl, contendo:

- 5 µl de água milliQ autoclavada;
- 4 µl de GoTaq (Promega) (mix pronto 1x contendo 0,20 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA Polimerase);
- 0,5 µl de cada *primer* (10 µM);
- 1 µl de DNA (20-50 ng/µL)

As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos, com um passo final de extensão a 72°C por 7 minutos. O rendimento do produto da amplificação foi avaliado em eletroforese em gel de agarose 1,5% imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), corado com Gel RedTM e visualizado em transluminador, sob luz ultravioleta. Posteriormente, cerca de 5 µl de cada produto de amplificação foi purificado com

a adição de 0,5 µl de fosfatase alcalina de camarão (1 U/µl) (Affymetrix, Inc.) e 0,4 µl de exonuclease I (10 U/µl) (Affymetrix, Inc.) e incubado por 45 minutos a 37°C. Posteriormente, este foi incubado a 80°C por 15 minutos.

3.1.5. Sequenciamento Nucleotídico

As reações de sequenciamento do produto de PCR foram realizadas pelo sequenciador Applied Biosystems 3500 no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu. Os produtos de amplificação foram sequenciados nos sentidos direto e reverso para garantir uma maior confiabilidade dos resultados.

Para a reação de sequenciamento, foi utilizado o kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Para cada reação, foram utilizados 1,2 µl de solução Big Dye, 1 µl de *primer* (10 µM) e 5 µl do produto mitocondrial. As reações foram colocadas em termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, seguida de 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos, com um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 4 µl de água MilliQ autoclavada e 16 µl de etanol 95%. A solução foi misturada em agitador de tubos e mantida por 15 minutos à temperatura ambiente (~25°C). A amostra foi centrifugada por 30 minutos a 12000 rpm e o sobrenadante retirado. O precipitado foi lavado com cerca de 200 µl de etanol 70% e a solução foi misturada em um agitador de tubos e novamente centrifugada por 7 minutos a 12000 rpm. A amostra foi seca a 90°C durante 2 minutos e mantida a -20°C.

O produto do sequenciamento foi dissolvido em 1,6 µl de formamida:dextran azul 25 mM EDTA (5:1), ressuspenso e desnaturado por 2 minutos a 90°C em banho seco. As sequências das duas fitas de DNA de cada amostra foram editadas e alinhadas no programa Sequence Navigator (Applied Biosystems).

3.2. Análise dos dados

3.2.1. Edição e Alinhamento das Sequências

A visualização dos eletroferogramas da sequência nucleotídica dos fragmentos de DNA mitocondrial foi realizada através do programa computacional Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd, 2007), o qual permite a leitura de diversas extensões do sequenciamento. A amplitude e os espaçamentos dos picos foram devidamente observados para atestar a qualidade das sequências e verificar se as mutações eram reais ou se poderiam ser artefatos da técnica do sequenciamento.

Utilizando o programa computacional Geneious 4.8.5 (Drummond *et al.*, 2009), as sequências obtidas no Chromas Lite 2.01 foram editadas e alinhadas e os respectivos eletroferogramas verificados. Cada resultado foi analisado individualmente e comparado ao seu respectivo eletroferograma pelo menos duas vezes. Os alinhamentos foram realizados utilizando a ferramenta (algoritmo) MUSCLE do programa Geneious 4.8.5 (Edgard, 2004). Os alinhamentos foram também verificados manualmente, pelo menos duas vezes, e comparados aos seus eletroferogramas para a certificação da posição de bases nitrogenadas nas sequências obtidas. Para confirmar a identidade das sequências, foi utilizado o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.* 1990), através do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), o qual relaciona sequências por meio de similaridade entre bases nitrogenadas. Todas as amostras foram alinhadas entre si gerando um arquivo que foi utilizado na realização de testes estatísticos posteriores.

3.2.2. Variabilidade entre as sequências

A relação entre os haplótipos foi obtida utilizando o método descrito por Kruskal (1956) e Prim (1957), implementado no programa computacional Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005). A diversidade haplotípica (h) (número e a frequência de haplótipos diferentes), a diversidade nucleotídica (π) (correspondente ao número de nucleotídeos diferentes por sítio entre sequências escolhidas ao acaso em uma população), além da composição percentual das bases, número de haplótipos, suas frequências e sua distribuição entre as populações foram estimadas com auxílio do programa DnaSP v.5.0 (Librado & Rozas, 2009). A rede de haplótipos foi organizada segundo o método de *Median-joining network* (Bandelt *et al.*, 1999), implementado no programa computacional Phylogenetic Network 4.2.0.1 (Forster *et al.*, 2007), baseado em estatística parcimoniosa a fim de determinar as relações entre os haplótipos registrados.

A análise da árvore filogenética de haplótipos foi efetuada no programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013), baseada no modelo de máxima parcimônia (Nei & Kumar, 2000). O suporte dos ramos foi avaliado pelo método de *bootstrap* com 1000 réplicas. Foi incluída na análise a sequência consenso da região controladora de DNAm de *Anodorhynchus leari* (arara-azul-de-lear) como grupo externo, a qual foi obtida através do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ857284.1>).

3.3. Análise da estrutura genética populacional

3.3.1. F_{ST} e AMOVA

Um dos métodos mais utilizados para quantificar a diferenciação genética entre populações é baseado em estatísticas- F , implementadas por Wright (1943). A estatística- F utiliza os coeficientes de endocruzamento para dividir a variância genética dentro e entre populações. O método F_{ST} descreve o quanto as populações são diferentes geneticamente uma das outras e é usado para estimar a diferenciação populacional a partir da variação das frequências gênicas (Holsinger & Wier, 2009). Índices F_{ST} com valores abaixo de 0,05 indicam baixa diferenciação; entre 0,05 e 0,15, moderada diferenciação; entre 0,15 e 0,25, grande diferenciação; e, acima de 0,25, elevada diferenciação (Wright, 1978). A estatística F_{ST} foi avaliada através do programa Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005) com 1.000 permutações a fim de acessar a significância do valor de p para eles associados.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) é uma classe de medidas semelhante à estatística- F e utiliza as frequências haplotípicas para testar a significância dos componentes da variância molecular associada com diferentes níveis hierárquicos (entre populações, entre as populações dentro de um grupo e entre grupos) por um procedimento permutacional não paramétrico. A AMOVA requer uma hipótese *a priori* de agrupamento entre as diferentes localidades. Portanto, foram utilizados agrupamentos de acordo com as localidades amostradas. Os testes foram realizados no programa Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005).

A localização geográfica das populações foi utilizada na definição dos agrupamentos necessários para os cálculos de AMOVA e também no cálculo do F_{ST} . Para a realização dessas análises, foram consideradas as seguintes regiões geográficas: Pantanal Norte, Pantanal Sul, Pará e Nordeste.

3.3.2. Inferência Demográfica

Além da neutralidade do marcador utilizado, o teste D de Tajima (Tajima, 1989) e o teste de F_s de Fu (Fu, 1997) foram utilizados para examinar se as amostras das diferentes regiões amostras se apresentam em equilíbrio. Tais testes são importantes considerando que um desvio significativo no equilíbrio genético do DNA mitocondrial é sinal de expansão ou redução do tamanho populacional recente nas situações onde nenhuma vantagem seletiva entre haplótipos existe. O teste D de Tajima compara o número de sítios segregantes com a diversidade nucleotídica - valores negativos são interpretados como indicativo de populações

que experimentaram mudanças de tamanho (Tajima, 1989). O teste F_s de Fu quantifica a polaridade da mutação e faz uma estimativa de θ (parâmetro populacional) baseado no número de mutações únicas. Valores de F_s significativos e negativos são gerados pelo excesso de mutações, o que caracteriza um sinal de expansão populacional (Fu, 1997). Ambos os testes foram realizados utilizando o programa Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005). Os testes D^* e F^* de Fu & Li (Fu & Li, 1993) foram calculados para inferir causas de eventual desvio de neutralidade, uma vez que esses testes são mais sensíveis a desvios decorrentes de seleção e não dos sinais de expansão populacional. O teste R_2 , desenvolvido por Ramos-Onsis e Rozas (2002), baseia-se nas diferenças entre número de mutações únicas e o número médio de nucleotídeos, sendo mais sensível para baixos tamanhos amostrais. Os testes R_2 , D^* e F^* de Fu & Li foram realizados através do programa DNAsp 5.0 (Librado & Rozas, 2009).

A mudança na demografia histórica de cada região foi investigada também comparando o perfil das distribuições das diferenças par a par de indivíduos (*mismatch distribution*) de cada população e da espécie como um todo com o esperado para populações estáveis e em expansão ou redução. A análise foi realizada no programa DNAsp 5.0 (Librado, & Rozas, 2009). Para amostragem de populações que estão em equilíbrio demográfico (estáveis), a distribuição das diferenças é geralmente multimodal. Já as populações que tem passado por recente expansão ou redução possuem tipicamente distribuição das diferenças unimodal (Harpending, 1994).

3.4. Atividades Educacionais

3.4.1. Confeção de material didático

Dois materiais didáticos, correspondentes a um jogo de tabuleiro e a uma cartilha educativa, foram elaborados, visando o ensino e aprendizado das problemáticas associadas à conservação das araras-azuis-grandes. Ambos os materiais foram desenvolvidos com uma linguagem apropriada à divulgação científica (popularização científica), definida como o uso de processos e recursos técnicos para a comunicação da informação científica e tecnológica ao público em geral.

O jogo de tabuleiro foi elaborado de forma a conter informações em uma linguagem simples e direta e permitir a facilitação do aprendizado. O jogo foi composto de um tabuleiro, cartas-pergunta contendo respostas de múltipla escolha ou abertas, um dado e peças individuais (“pinos”) para cada jogador (Anexos II e III). Para a confecção do tabuleiro, foi utilizado papel reciclado 240 g, no tamanho A3, e este foi plastificado. As cartas também

foram impressas em papel reciclado 240 g, tamanho A4 e posteriormente plastificadas. As peças individuais do jogo foram elaboradas em massa de *biscuit*, na forma de araras-azuis-grandes.

A escolha de elaboração de uma cartilha como material de divulgação científica baseou-se em seu propósito (ser utilizado como uma ferramenta de comunicação para informar produtos, atividades, conceitos ou projetos específicos, características técnicas ou ações sociais) e em suas características (impresso gráfico de material dobrado e com ilustrações, com uma sequência de argumentos, de forma a despertar a curiosidade para a abertura do mesmo) (Anexo VI).

3.4.2. Educação ambiental

Diferentes atividades de educação ambiental, relacionadas à conservação das araras-azuis-grandes, foram realizadas, conforme descrição abaixo, durante as campanhas do projeto “Conservação das araras-azuis (*Anodorhynchus hyacinthinus*) no mosaico de Carajás” (UNESP-Fundibio-Vale S.A).

1º - Aplicação de um questionário de múltipla escolha abordando diferentes questões sobre a biologia da arara-azul-grande (Anexo IV).

2º - Palestra e discussão com os alunos, abrangendo aspectos sobre a biologia da arara-azul-grande e utilizando fotos das araras em diversas fases da vida e em várias atividades (se alimentando, se acasalando, construindo o ninho e cuidando do filhote).

3º - Aplicação do jogo de tabuleiro elaborado (Anexos II e III), que aborda questões da biologia da arara-azul-grande, relações inter e intraespecíficas e mecanismos que levam à conservação e à extinção da espécie.

4º - Reaplicação do questionário inicial, contendo as mesmas questões, porém com o acréscimo de uma questão dissertativa, além de um espaço para avaliação e comentários acerca das atividades desenvolvidas (Anexo V).

5 - Distribuição da cartilha elaborada (Anexo VI), que aborda questões da biologia da arara-azul-grande, relações inter e intraespecíficas e mecanismos que levam à conservação e à extinção da espécie.

3.4.3. Público Alvo

As atividades educacionais foram realizadas em seis escolas municipais localizadas em duas cidades no sudeste do Pará, na região de Carajás: Parauapebas (EMEIF Crescendo na Prática, EMEIF Jorge Amado e EMEIF Paulo Freire) e Canaã dos Carajás (EMEIF

Magalhães Barata, EMEIF Carlos Henrique e EMEIF Odail Alves Ferreira). Foram atendidos 283 alunos, vinculados ao ensino fundamental I (4º e 5º anos) e ensino fundamental II (6º, 7º, 8º e 9º anos). As atividades foram realizadas em março, abril, setembro e outubro de 2013 e tiveram aproximadamente 1 hora e meia de duração em cada turma. Dentre as atividades educacionais realizadas, incluiu-se a aplicação do jogo de tabuleiro elaborado e a distribuição da cartilha impressa.

A cartilha educativa elaborada foi também distribuída a cerca de 125 estudantes do ensino fundamental II e médio, especialmente junto às atividades dos cursos de férias “Experimentando Genética”, vinculados ao Programa de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre Pós-Graduação e Ensino Básico”, realizadas em 2013, 2014 e 2015.

4. Capítulo I

4.1. Resultados

4.1.1. Isolamento de DNA

O uso de sangue para isolamento de DNA de exemplares de *A. hyacinthinus* representou uma forma não destrutiva de amostragem biológica, fato pertinente em trabalhos direcionados à conservação, especialmente de uma espécie considerada ameaçada de extinção (Collar *et al.*, 1992; IUCN, 2014). Embora invasivas, as coletas de sangue implicaram somente em um pequeno período de estresse aos animais, dado que foi necessário realizar a contenção e a manipulação destes. Não foram relatados quaisquer problemas associados a infecções, morte ou alterações no comportamento dos animais utilizados no presente estudo (F.A. Presti, informação pessoal). As amostras de DNA obtidas apresentaram valores de 1,8 a 2,2 em comparações de absorbância a 260/280nm. Amostras de sangue de aves geralmente levam à obtenção de DNA de excelente qualidade e quantidade, já que os eritrócitos destes animais são nucleados (Claver & Quaglia, 2009) sendo, portanto, uma rica fonte de DNA nuclear.

4.1.2. Análise da Variabilidade Genética

Produtos de PCR com 498 pares de bases, associados à região controladora do DNA mitocondrial, foram obtidos a partir de amostras de DNA de 100 indivíduos de *A. hyacinthinus* provenientes de quatro regiões geográficas (Pantanal Sul, Pantanal Norte, Pará e

Nordeste). As sequências obtidas foram alinhadas e a sequência consenso foi utilizada em buscas BLAST (Altschul *et al.* 1990), para verificar sua identidade com outras sequências similares de regiões controladoras do DNAm. Alta identidade pôde ser verificada com distintas espécies de aves.

A análise dessas sequências nucleotídicas permitiu determinar 16 haplótipos gerados pela variação genética pontual detectada em 17 sítios polimórficos, correspondendo a 16 transições e a duas transversões (Tabela 1). A porcentagem de bases nitrogenadas encontradas foi de: 23,90% de citosina, 28,71% de timina, 28,12 % de adenina e 19,27% de guanina. A partir da matriz de sequências gerada, foram obtidos os números de sítios polimórficos e de haplótipos, os valores de diversidade nucleotídica e haplotípica para a espécie como um todo e para cada região geográfica analisada (Tabela 2).

Tabela 1: Sítios variáveis em 498 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial e número de indivíduos de *Anodorhynchus hyacinthinus* por região geográfica que possuem os haplótipos encontrados.

Haplótipo	Sequências																	PN	PS	PA	NO	Total
	7	8	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	3	3					
	3	1	9	0	1	1	1	1	5	5	5	6	7	5	7	1	4					
				8	2	3	5	8	2	3	6	6	4	0	1	1	9					
H1	G	T	T	C	C	A	A	C	T	T	C	T	C	G	C	C	G	.	.	2	.	2
H2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	5	.	5
H3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	24	10	7	41
H4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	T	.	.	.	1	.	1
H5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	1	.	3	8	12
H6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	1	.	1
H7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	.	T	.	.	.	.	1	.	1
H8	A	.	C	T	T	G	.	.	.	.	.	.	T	.	T	T	.	.	2	.	.	2
H9	A	.	C	T	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	2	.	.	2
H10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	13	1	.	4	18
H11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T	.	.	.	.	1	1
H12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T	T	.	.	.	3	3
H13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	T	.	5	.	.	1	6
H14	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	1	1
H15	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	1	1
H16	.	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	C	.	.	T	T	.	3	.	.	.	3

PN – Pantanal Norte; PS – Pantanal Sul; PA – Pará; NO – Nordeste.

Tabela 2: Valores de índices de diversidade genética associados à sequência nucleotídica da região controle do DNA mitocondrial de 100 indivíduos de *Anodorhynchus hyacinthinus*.

População	P	H	h +/- s.d.	π +/- s.d.
PN (22)	4	4	0,6061 $\pm$ 0,0922	0,0021 $\pm$ 0,0016
PS (29)	8	4	0,3153 $\pm$ 0,1079	0,0033 $\pm$ 0,0022
PA (23)	6	7	0,7668 $\pm$ 0,6961	0,0026 $\pm$ 0,0018
NO (26)	5	8	0,8215 $\pm$ 0,0445	0,0025 $\pm$ 0,0018
Indivíduos (100)	17	16	0,7832 $\pm$ 0,0329	0,0034 $\pm$ 0,0022

Número de sítios polimórficos (P), número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π), assim como os respectivos desvios padrão ($\pm$ s.d.). Em parênteses estão os números de indivíduos analisados. Indivíduos: espécimes de *A. hyacinthinus* analisados; PN: Pantanal Norte; PS: Pantanal Sul; PA: Pará; NO: Nordeste.

4.1.3. Estrutura genética populacional

Na rede de haplótipos obtida foi possível observar um haplótipo (H3) mais frequente, o qual se apresentou em 41 das amostras (41,0%) distribuídas nas seguintes regiões geográficas: Pantanal Sul, Pará e Nordeste. Em frequências menores, foi evidenciado um haplótipo (H10) associado a 18 amostras distribuídas nas regiões Nordeste, Pantanal Norte e Pantanal Sul, um haplótipo (H5) referente a 12 amostras distribuídas nas regiões Nordeste, Pará e Pantanal Norte, e um haplótipo (H13) associado a seis amostras distribuídas no Pantanal Norte e Nordeste. Além disso, foram encontrados doze haplótipos restritos para as diferentes regiões amostradas (H1, H2, H4, H6, H7, H8, H9, H11, H12, H14, H15 e H16) (Figura 3).

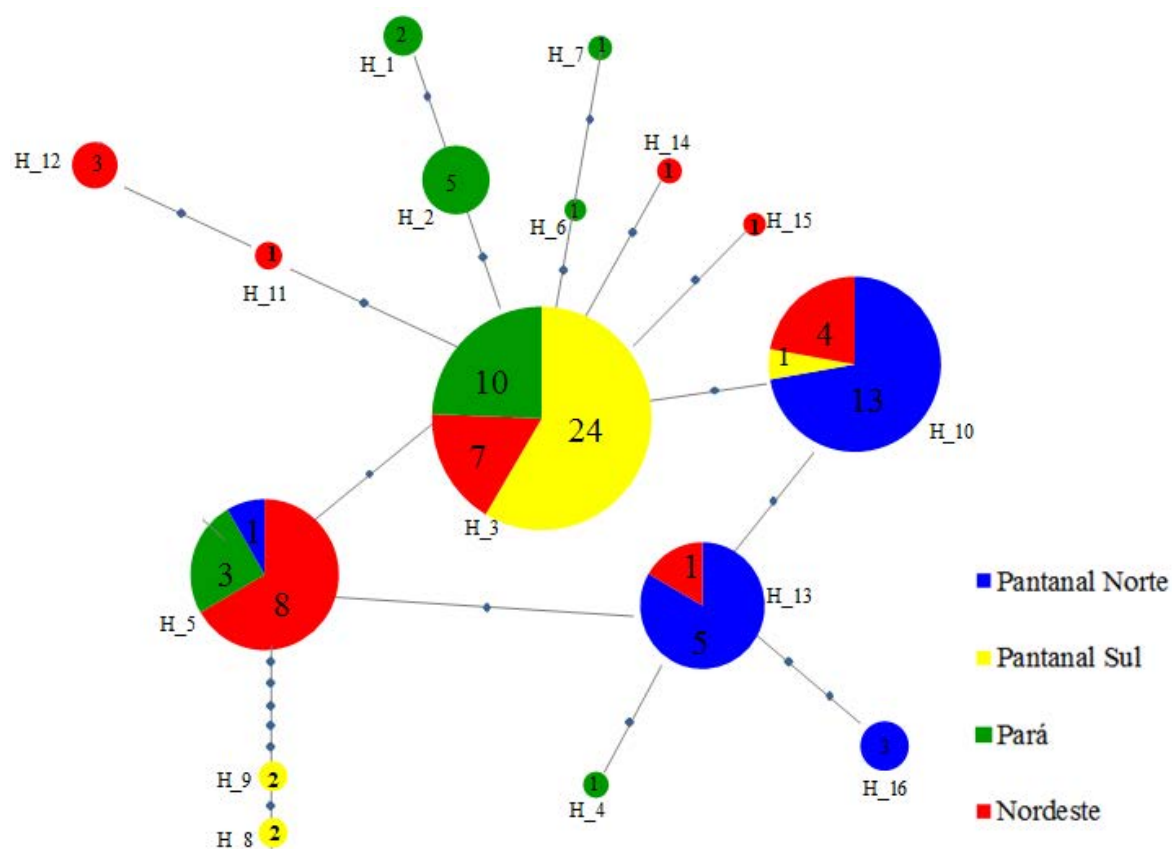


Figura 3: Rede de relacionamento de haplótipos de um segmento de 498 pb da região controle do DNAmT de exemplares de *Anodorhynchus hyacinthinus* de quatro regiões geográficas distintas. O número de indivíduos de cada localidade com um determinado haplótipo encontra-se indicado na figura. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo. As linhas representam a ligação dos haplótipos por passo mutacional.

Os agrupamentos observados na árvore de máxima parcimônia possuem valores de *bootstrap* baixos, o que não permite realizar muitas inferências (Figura 4). Entretanto, é possível verificar um agrupamento interno com valor de *bootstrap* alto, unindo respectivamente os haplótipos H8 e H9 (*bootstrap* = 97%). Valores medianos de *bootstrap* foram verificados entre os haplótipos, H1 e H2 (*bootstrap* = 65%) e H6 e H7 (*bootstrap* = 62%).

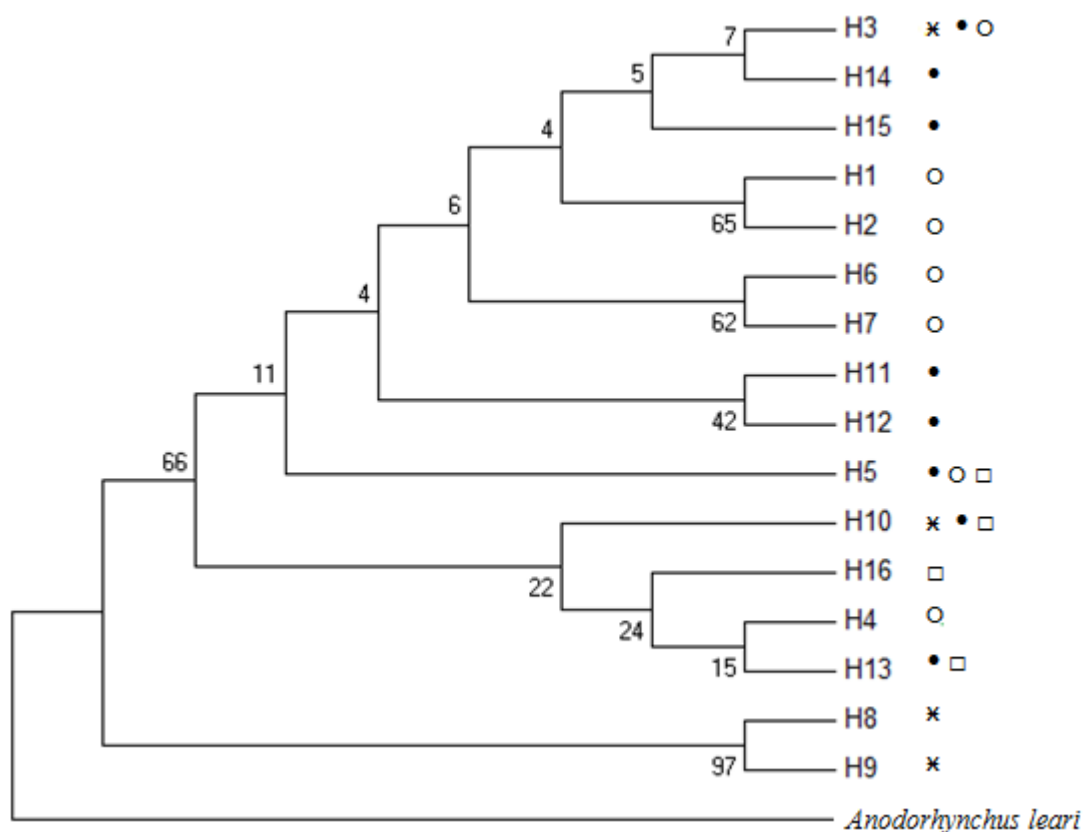


Figura 4: Árvore de haplótipos construída pelo método de máxima parcimônia. O suporte estatístico dos nós é dado pelo valor de *bootstrap* utilizando 1000 replicações. A espécie *Anodorhynchus leari* foi utilizada como grupo externo. x: Pantanal Sul; □: Pantanal Norte; ○: Pará; •: Nordeste.

Os índices de fixação F_{ST} baseados nas sequências de DNA mitocondrial, os quais foram obtidos considerando as quatro regiões geográficas amostradas (Tabela 3), mostraram diferenciação genética populacional entre o Pantanal Norte e as demais regiões. Menor valor F_{ST} foi obtido entre Pantanal Sul e Pará, Pantanal Sul e Nordeste e Pará e Nordeste. Além disso, as análises de F_{ST} também foram realizadas considerando dois agrupamentos (Pantanal Sul + Pantanal Norte e Nordeste + Pará), em que foi possível observar pouca diferenciação genética entre os dois agrupamentos (Tabela 4).

Tabela 3: Valores de F_{ST} calculados na comparação par a par das populações de *Anodorhynchus hyacinthinus*. Todos os valores obtiveram significância estatística ($p < 0.05$).

Localidade	PA	PS	NO	PN
PA	0,00000			
PS	0,09916	0,00000		
NO	0,13678	0,11982	0,00000	
PN	0,45258	0,41198	0,33527	0,00000

NO – Nordeste; PA – Pará; PN – Pantanal Norte; PS – Pantanal Sul.

Tabela 4: Valor de F_{ST} calculado na comparação para a par de dois agrupamentos de populações de *Anodorhynchus hyacinthinus* (Valor com significância estatística $p < 0,05$).

Localidade	NO + PA	PS + PN
NO + PA	0,00000	
PS + PN	0,07837	0,00000

NO + PA: agrupamento das regiões geográficas Nordeste e Pará; PS + PN: agrupamento das regiões Pantanal Sul e Pantanal Norte.

A análise de variância (AMOVA) foi inicialmente calculada considerando todos os indivíduos das quatro regiões geográficas em somente um agrupamento. Nesse tipo de análise, foi possível observar que 73,08% da variação genética é encontrada dentro das populações e 26,92% delas entre as populações, com índice de fixação global calculado de $\Phi_{ST} = 0,26923$ significativo ($p < 0.05$) (Tabela 5). Além disso, a AMOVA também foi realizada considerando os indivíduos das quatro regiões geográficas dentro de dois grupos (Pantanal Sul + Pantanal Norte e Nordeste + Pará), onde foram reveladas as proporções de diferenciação dentro de cada população, de toda a população e entre as populações. Nesse caso, quando as distintas áreas do Pantanal são agrupadas e comparadas com região Norte + Nordeste, o valor de variação entre as populações dentro de um grupo é de 33,61% e a variação dentro das populações é de 75,21%, com $\Phi_{SC} = 0,30885$ e $\Phi_{ST} = 0,24790$ significativo ($p < 0.05$) (Tabela 6).

Tabela 5: Valor de Φ_{ST} , calculado pela AMOVA, considerando todos os indivíduos de *Anodorhynchus hyacinthinus* das quatro regiões geográficas em um único agrupamento, levando em consideração um valor com significância estatística $p < 0.05$.

	Componentes de variabilidade	Porcentagem de variabilidade
Entre Populações	0,25010	26,92 %
Dentro das Populações	0,67886	73,08 %
Total	0,92896	
Índice de fixação Φ_{ST}	0,26923	

Tabela 6: Resultado da AMOVA para dois grupos de *Anodorhynchus hyacinthinus* (Pantanal Sul + Pantanal Norte e Nordeste + Pará), valores atribuídos à diferenciação dentro de cada população (Φ_{SC}), de toda a população (Φ_{ST}) e entre as populações (Φ_{CT}). Em negrito, resultado com significância estatística $p < 0.05$.

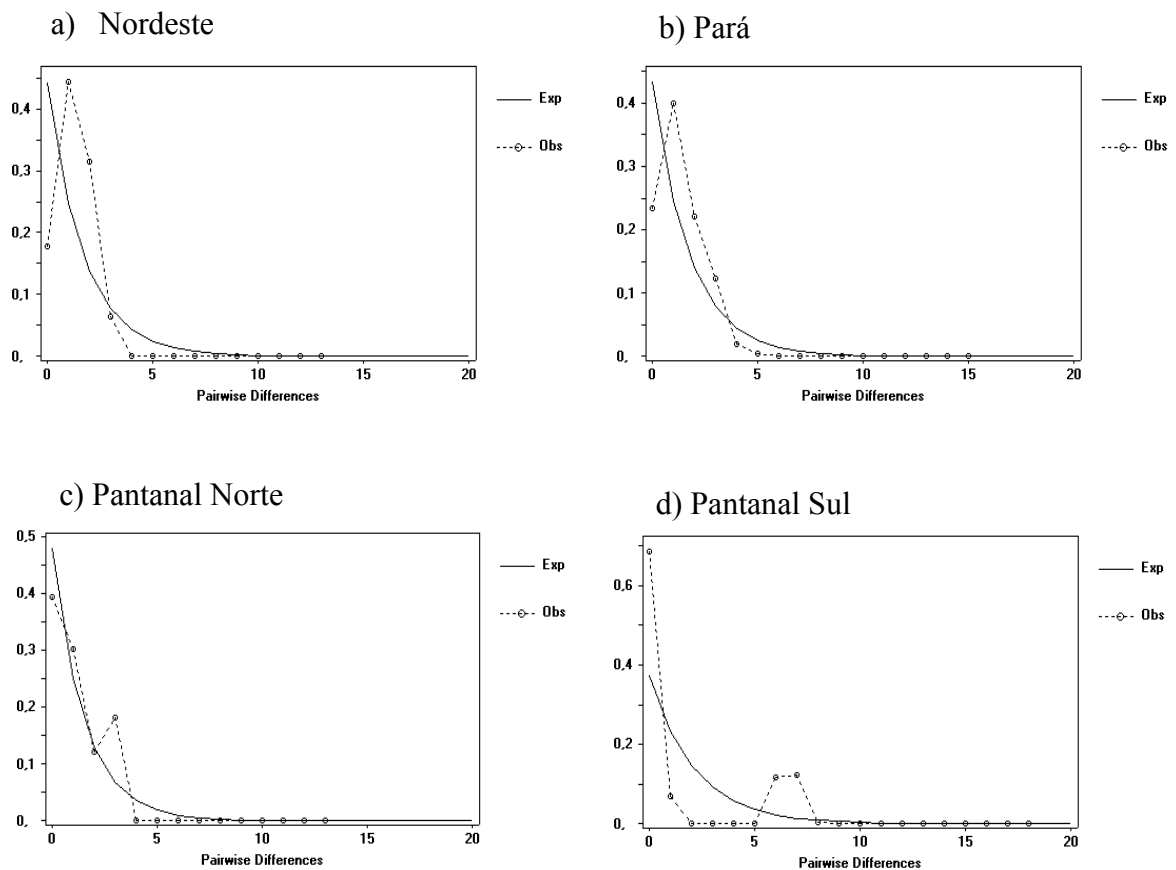
	Variação da variabilidade	Porcentagem da variabilidade	Φ_{SC}	Φ_{ST}	Φ_{CT}
Entre grupos	-0,07959	-8,82 %	-	-	-0,08818
Entre Populações dentro de um grupo	0,30335	33,61 %	-	0,30885	-
Dentro das Populações	0,67886	75,21 %	0,24790	-	-

4.1.4 Inferência Demográfica

Os testes de neutralidade D de Tajima, D^* , F^* e R_2 não foram significativos para nenhuma população amostrada. Os valores do teste F_s de Fu foram negativos apenas para as populações do Pará e do Nordeste, porém apenas a população do Nordeste e a espécie como um todo obtiveram significância estatística ($p < 0,05$). Como foram identificados grupos geneticamente estruturados, cada um foi analisado quanto a diferenças nucleotídicas aos pares (*mismatch distribution*). As curvas obtidas em relação às populações do Nordeste e do Pará mostraram-se unimodais, enquanto, para as populações do Pantanal Sul e do Pantanal Norte, estas foram bimodais (Figura 5).

Tabela 7: Índices de neutralidade D de Tajima, F_s de Fu, D^* , F^* e R_2 para cada população amostrada e para a espécie como um todo. Em negrito, valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

População	D de Tajima	F_s de Fu	D^*	F^*	R_2
Pantanal Norte	-0,0163	0,2992	0,14251	0,11306	0,1354
Pantanal Sul	-0,5370	1,8058	0,69714	0,37841	0,1032
Pará	-0,5974	-2,2851	-0,66182	-0,87494	0,1148
Nordeste	-0,0987	-3,2968	-0,54160	-0,47925	0,1232
Espécie	-1,3324	-6,8157	-0,23385	-0,80822	0,0500



(continuação)

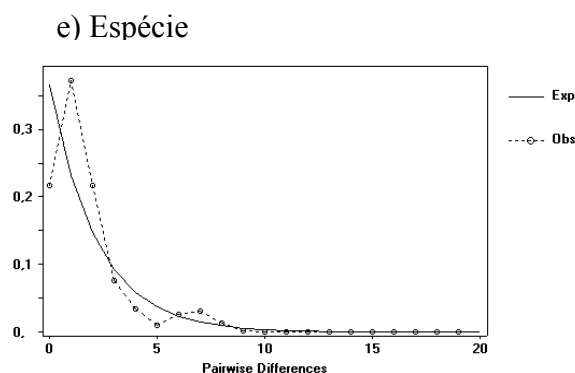


Figura 5: Gráfico de distribuição *mismatch* para haplótipos encontrados em amostras de *Anodorhynchus hyacinthinus* para as quatro populações amostradas. A distribuição esperada de diferenças par a par, de acordo com o modelo de expansão populacional súbita é mostrada em linha contínua e a distância observada pela linha pontilhada.

4.2. Discussão

4.2.1. Variabilidade Genética

Os valores médios dos índices de diversidade genética inferida a partir de dados associados ao primeiro domínio da região controle do DNA mitocondrial ($h = 0,7832 \pm 0,0329$; $\pi = 0,0034 \pm 0,0022$), com a amostragem de *A. hyacinthinus* das quatro regiões definidas no atual estudo, mostraram-se baixos quando comparados a dados de outras espécies de psitacídeos neotropicais não ameaçadas de extinção, como a arara canindé (*Ara ararauna*) (Caparroz, *et al.* 2003; Caparroz, *et al.*, 2009), arara vermelha (*Ara chloropterus*) e araracanga (*Ara macao*) (Oliveira-Marques, 2010) utilizando o mesmo marcador genético. Por outro lado, essa baixa variabilidade também foi evidenciada em trabalhos prévios relacionados à *A. hyacinthinus* com a utilização de diferentes marcadores moleculares. Faria (2006) encontrou baixa variabilidade genética ao analisar minissatélites de locos únicos, microssatélites e um fragmento de 472 pb do primeiro domínio da região controle do DNA mitocondrial. De forma similar, a análise de locos específicos e heterólogos de microssatélites e 2.123 pb de uma sequência concatenada de partes dos genes ND5, citocromo b e ND2 também indicou baixos níveis de diversidade genética em exemplares de *A. hyacinthinus* (Presti, 2015; Silva, 2014).

A baixa variabilidade genética encontrada em *A. hyacinthinus* sugere que esta realmente enfrente condições de vulnerabilidade, característica comum em espécies e/ou populações com redução no número de indivíduos, como observado nos psitacídeos ararinha-azul (*Cyanopsitta spixii*) e arara-azul-de-lear (*Anodorhynchus leari*) (Presti, 2006).

Geralmente, espécies ameaçadas de extinção possuem um tamanho populacional reduzido e/ou fragmentado, o que pode levar a maiores taxas de endocruzamento, resultando, por sua vez, em uma maior diminuição da variabilidade genética. Adicionalmente, fatores estocásticos, associados à deriva genética, também podem contribuir para diminuição da variabilidade (Frankham *et al.*, 2002). Os resultados de baixa diversidade genética encontrados para *A. hyacinthinus* no presente trabalho, associados aos dados de destruição de seus habitats naturais e à sua captura e comércio ilegal (Munn *et al.*, 1987; Ferreira, 2010), sugerem que as populações da espécie podem ter passado por gargalos recentes e que, mesmo que estas não estejam mais sob alto impacto de fatores antrópicos, ainda não houve tempo suficiente para a recuperação de parte da sua variabilidade genética.

As maiores ações de conservação de *A. hyacinthinus* no país são atualmente desenvolvidas pelo Projeto Arara-Azul, iniciado, em 1990, no Pantanal Sul e atualmente coordenado pelo Instituto Arara Azul, cujo objetivo principal é manter viáveis as populações de *A. hyacinthinus*, a médio e longo prazo, em vida livre em seu ambiente natural. Tais ações surgiram por conta dos níveis críticos de densidade populacional da espécie, especialmente nas décadas de 1980 e 1990 (Munn *et al.*, 1987; Ferreira, 2010). Atualmente, existem duas bases de campo neste projeto, localizadas no Pantanal de Miranda e no Pantanal de Aquidauana, ambos associados ao Pantanal Sul Matogrossense (<http://www.projetoararaazul.org.br/>). Os dados do presente trabalho evidenciaram um baixo nível de diversidade genética ($\pi = 0,0033 \pm 0,0022$, $h = 0,3153 \pm 0,1079$) para o grupo de animais amostrados no Pantanal Sul. Embora o aumento no número de exemplares de *A. hyacinthinus* no Pantanal Sul seja um notável caso de sucesso de ações ambientais, os dados obtidos no presente trabalho indicam que ainda existe uma baixa diversidade genética nesta região e, como as ações conservacionistas iniciaram há, aproximadamente, 20 anos, ainda não houve tempo suficiente para a recuperação de parte da sua variabilidade. Por outro lado, a diversidade genética observada no Pantanal Sul, embora considerada baixa, ainda é superior à variabilidade encontrada entre os animais do Pantanal Norte, o que pode estar associado aos resultados positivos das ações conservacionistas contínuas que vêm sendo realizadas nas regiões de Miranda e Aquidauana.

No entanto, não se pode descartar a ideia de que baixo nível de variabilidade genética observado para *A. hyacinthinus* pode ser reflexo de sua história evolutiva e uma característica própria da espécie, dado que baixa diversidade genética já foi descrita até em espécies não ameaçadas. Apesar da baixa diversidade genética, tais espécies apresentam um adequado desempenho de sobrevivência e reprodução (Arden & Lambert, 1997). Dantas (2012), por

exemplo, encontrou baixa variabilidade ao analisar locos de genes nucleares e a região controle do DNA mitocondrial em exemplares da ave marinha não ameaçada *Larus dominicanus* (gaivotão). Dados baseados em marcadores moleculares distintos indicaram que *Petroica traversi* (robin negro) possui um dos mais baixos níveis de diversidade genética já observados em populações naturais de aves, característica associada a uma longa história de populações naturalmente compostas por um número extremamente reduzido de indivíduos (Arden & Lambert, 1997; Miller & Lambert, 2006; Kennedy *et al.*, 2014). A condição de filopatria descrita para *A. hyacinthinus* (Yamashita, 1992; Guedes, 1993), que mantém os indivíduos fiéis aos seus locais de alimentação e sítios reprodutivos, a predominância de monogamia (Guedes, 1993; Guedes & Harper, 1995; Miyaki *et al.*, 1995), e a ocorrência de territorialidade, especialmente durante o período reprodutivo (Yamashita, 1992; Guedes, 1995), podem estar associados aos baixos níveis de diversidade genética identificados na espécie.

Entretanto, como foram encontradas diferentes composições genéticas entre os grupos, a baixa variabilidade e as diferenças na variabilidade entre indivíduos de regiões geográficas distintas, além do sinal de expansão pode ser um resultado de um possível efeito fundador, onde um pequeno número de indivíduos de *A. hyacinthinus* pode ter colonizado diferentes regiões e cada população pode ter sofrido com diferentes pressões de seleção levando a uma variação genética em relação à população ancestral e mantendo a baixa diversidade (Frankham *et al.*, 2002). Poucos indivíduos colonizando uma nova área leva a população a apresentar um número razoável de indivíduos e possuir baixa variabilidade genética, já que sua recuperação por mutação é lenta.

4.2.2. Rede de haplótipos

A rede de haplótipos obtida em forma de estrela, a partir de análises da região controle do DNAm de exemplares de *A. hyacinthinus* de quatro regiões geográficas distintas (Figura 3), pode indicar que as populações de *A. hyacinthinus* estão em processo de recente expansão populacional. Segundo Cann *et al.* (1987), a presença de vários haplótipos de ponta em localidades geográficas distantes daquelas de ocorrência de seus haplótipos ancestrais, que devem estar restritos à localidade de origem dos migrantes, constitui uma evidência significativa de expansão populacional geográfica.

No presente estudo, o haplótipo central e que apresenta maior conexão, sendo compartilhado entre maior número de indivíduos (H3) (Figura 3), provavelmente é o mais antigo. Os haplótipos das regiões periféricas, especialmente aqueles observados em baixa

frequência, podem ser os mais recentes, os quais apresentam conexões com haplótipos da mesma população. Tais dados levam a inferir que estes evoluíram há, relativamente, pouco tempo e que ainda não foram dispersados. Tais dados são compatíveis com outras redes de haplótipos geradas para *A. hyacinthinus* (Faria, 2006; Presti, 2011) e *Amazona aestiva* (papagaio verdadeiro) (Caparroz, 2009) e podem estar correlacionados e eventos de expansão ou de gargalos populacionais recentes.

4.2.3. Estrutura genética populacional

Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciaram, para *A. hyacinthinus*, substancial diferenciação populacional para todas as populações amostradas, onde foi possível observar significância estatística para todos os grupos. O grupo do Pantanal Norte obteve os maiores valores de F_{ST} (0,4525 com Pará; 0,4119 com Pantanal Sul e 0,3352 com o Nordeste). A diferenciação genética entre o Pantanal Norte e o Pará, entre o Pantanal Norte e o Nordeste e entre Pantanal Sul e Nordeste já era esperada, pois as localidades geográficas entre essas regiões são bastante distantes, o que pode restringir o fluxo gênico entre as populações devido ao isolamento por distância ou devido a eventos de fragmentação da população (Wright, 1943). Para efeito de comparação, em arara canindé (*Ara ararauna*) foi observado que as populações mais próximas geograficamente apresentaram baixa diferenciação quando comparadas com populações mais distantes e que apresentaram maior diferenciação (Caparroz *et al.*, 2009).

Entretanto, foi também observada alta diferenciação genética entre os grupos do Pantanal Norte e do Pantanal Sul, embora essas regiões não sejam separadas por longas distâncias e aparentemente não existe barreiras físicas conhecidas entre essas áreas. Por outro lado, não foram encontrados na literatura relatos de registro de *A. hyacinthinus* em locais entre essas duas regiões. Uma possível explicação para essa diferenciação pode estar associada à fidelidade ao sítio de nidificação que a espécie apresenta, somada a uma possível área de ausência de ocorrência de *A. hyacinthinus* entre Pantanal Norte e Pantanal Sul, o que poderia restringir o fluxo gênico entre os dois grupos. Dados similares de alta diferenciação entre estes dois grupos foram também obtidos por Presti (2011), por meio da utilização de marcadores microssatélites e dos genes mitocondriais citocromo b, ND2 e ND5.

Além da fidelidade ao sítio de nidificação, a filopatria, ou seja, a tendência de uma espécie animal permanecer ou retornar em anos subsequentes para uma determinada área de nascimento ou acasalamento (Begon *et al.*, 2006), também pode potencializar as diferenças genéticas entre populações. Em aves, a filopatria é bastante elevada e estima-se que

especialmente machos de diversas espécies voltem a sua colônia natal (Greenwood, 1980), porém em algumas aves as fêmeas, geralmente, são mais filopátricas que os machos (Clarke, *et al.*, 1997), característica já observada em exemplares de *A. hyacinthinus* que se mantêm fiéis a seus locais de alimentação e sítios reprodutivos (Yamashita, 1992; Guedes, 1993). Dados genéticos prévios também indicaram a ocorrência de comportamento filopátrico em *A. hyacinthinus* - foi identificada maior diferenciação genética entre populações da espécie com o uso de marcadores de DNAm, quando comparada com dados baseados em microssatélites. Como o DNA mitocondrial apresenta um padrão de herança predominantemente materno, as fêmeas de *A. hyacinthinus* poderiam ser mais filopátricas que os machos, contribuindo assim para o aumento na estruturação genética populacional. Menores níveis de diferenciação genética foram observados por intermédio de marcadores microssatélites dado que estes apresentam herança biparental (Presti, 2011).

Embora a presente análise tenha sido feita com base em um marcador com herança materna e, portanto, o padrão de estruturação observado refira-se somente às fêmeas de *A. hyacinthinus*, foram encontrados índices de F_{ST} superiores aos associados a locos microssatélites (Presti, 2011). Tais resultados também suportam a hipótese de associação entre alta estruturação genética e filopatria.

As análises de variância molecular (AMOVA) indicaram que a maior porcentagem da variabilidade genética se encontra dentro das populações quando comparada à diversidade interpopulacional. Estes resultados corroboram dados obtidos para diversas espécies animais, incluindo *A. hyacinthinus*, em que a maior diferenciação genética refere-se ao componente intrapopulacional (Faria, 2006; Oliveira-Marques, 2010).

4.2.4. Inferência Demográfica

A avaliação de possíveis alterações demográficas de *A. hyacinthinus* foi inferida a partir de comparações entre métodos estatísticos, os quais buscam informações das frequências mutacionais de testes segregantes (D de Tajima e R_2), informação sobre distribuição haplotípica (F_s de Fu) e sobre a distribuição das diferenças par a par das sequências (*mismatch distribution*).

O teste de neutralidade D de Tajima apresentou valores marginalmente significativos para todas as populações amostradas. Entretanto, esses valores não apresentaram significância estatística ($p > 0,05$). Valores não significativos podem indicar ausência de modificações no tamanho populacional, fraca seleção ou seleção neutra, ou seja, as populações amostradas se

encontram em equilíbrio neutro entre mutação e deriva genética. Segundo Ramos e Rozas (2002), o teste F_s de Fu apresenta a maior sensibilidade na detecção de processos históricos de expansão populacional entre os testes de neutralidade. Entretanto, valores negativos de F_s e estatisticamente significativos foram obtidos apenas para a população do Nordeste, ou seja, para essa população, ocorrem desvios significativos do modelo de população em equilíbrio neutro (Nielsen, 2001). Como esse teste é mais sensível que o teste D de Tajima, é possível interpretar que o Nordeste esteja passando por uma maior expansão demográfica recente. O mesmo dado pode ser observado através dos testes F^* e D^* de Fu e Li (Fu & Li, 1993), considerados mais sensíveis aos desvios decorrentes da seleção do que aos da expansão. Interpretações feitas por Fu (1997) sugerem que valores de F_s significativos associados a valores D^* e F^* não significativos são indícios de expansão demográfica, enquanto a situação contrária sugere que os efeitos da seleção sejam mais evidentes.

Dados de *mismatch distribution*, em amostragem de populações em equilíbrio demográfico, geram uma distribuição multimodal. No entanto, populações que tem passado por recente expansão ou redução possuem tipicamente uma distribuição unimodal (Harpending, 1994). A curva de mismatch distribution obtida em relação à população de *A. hyacinthinus* do Nordeste mostrou-se unimodal, reforçando a ocorrência de expansão populacional nesta área geográfica. Similarmente, um padrão unimodal também foi observado para a população do Pará e dessa forma, este se mostrou o teste mais sensível para detecção de processos históricos de expansão no presente trabalho, visto que todos os testes de neutralidade apontaram para ausência de expansão para esta população. Por outro lado, foram observadas curvas bimodais para as populações do Pantanal Sul e Pantanal Norte. Embora, Ramos-Onsins e Rozas (2002) aleguem que o teste *mismatch distribution* seja conservativo e poucas inferências possam ser inferidas em relação à alteração no tamanho populacional, os resultados obtidos sugerem, para as populações de *A. hyacinthinus* do Pantanal Sul e Pantanal Norte, um padrão estável ao longo do tempo e em equilíbrio entre mutação e deriva.

As evidências de expansão populacional obtidas por dados de *mismatch distribution* corroboram os dados inferidos através da rede haplotípica gerada em formato de estrela, cujo padrão é indicativo de crescimento populacional. Nesta possível observar a presença de quatro haplótipos centrais de maior frequência e 12 haplótipos de baixa frequência, sendo a maioria destes pertencentes às populações do Pará e do Nordeste (Figura 3). Resultados semelhantes foram previamente descritos para *A. hyacinthinus*. Presti (2011) evidenciou que, apesar de inferência de valores não significativos nos testes de neutralidade, as populações de *A. hyacinthinus* apresentaram curva unimodal para o Norte e Nordeste e rede haplotípica em

formato de estrela. Faria (2006) também encontrou resultados similares para a população de *A. hyacinthinus* do Piauí.

É possível que a baixa variabilidade genética reportada no presente estudo tenha sido uma limitação para os testes estatísticos associados às inferências demográficas (Ramos-Onsis e Rozas, 2002) e, portanto, os dados até o momento obtidos não sejam ainda suficientes para traçar um perfil histórico autêntico para *A. hyacinthinus*. Por outro lado, o tempo de geração de *A. hyacinthinus* é longo, os indivíduos chegam à idade reprodutiva por volta dos sete anos, alguns casais não se reproduzem todos os anos e também há um dispendioso cuidado parental (Guedes, 2009), características que podem fazer com que o tempo necessário para que os eventos demográficos surtam algum efeito seja mais longo.

4.2.5. Implicações para conservação da espécie

Conhecer os aspectos biológicos e genéticos das espécies, especialmente aquelas que se encontram em ameaça de extinção, permite elaborar e implementar medidas mais efetivas para a conservação. *A. hyacinthinus* é uma espécie vulnerável e apresenta baixa variabilidade genética quando comparada com psitacídeos não ameaçados. Além disso, foi verificado que algumas populações encontram-se estruturadas geneticamente.

Adicionalmente às ações de conservação de *A. hyacinthinus* desenvolvidas pelo Projeto Arara-Azul - Instituto Arara Azul, focadas na região do Pantanal Sul, outras medidas direcionadas a essa espécie encontram-se inseridas no Plano de Ação Nacional para Conservação das Aves do Cerrado e Pantanal, aprovado em março de 2014 (Portaria no. 34, MMA, ICMBio), e no Plano de Ação Nacional para Conservação do Xingu, iniciado em 2011 e com abrangência até 2016. O PAN Aves do Cerrado e Pantanal ainda não foi implementado de forma efetiva e suas matrizes de planejamento e de metas/indicadores ainda necessitam ser elaboradas. Dados recentes do PAN Xingu indicam que, de suas 97 ações propostas, somente 2 foram concluídas e 23 encontram-se em andamento conforme previsto. As demais ações apresentam problemas ou ainda não foram iniciadas (MMA, ICMBio, 2015).

Tais dados nos levam a crer que, efetivamente, um reduzido número de ações de abordagem ampla vem sendo realizados no país visando a conservação de *A. hyacinthinus*. Adicionalmente, as metas e ações estabelecidas nos diferentes projetos ou planos conservacionistas direcionados a essa espécie não englobam todas suas áreas de ocorrência. Tal particularidade mostra-se mais adequada para espécies cujas populações não são diferenciadas geneticamente, em que pode ser viável concentrar sua proteção em apenas uma

ou reduzidas áreas, usando indivíduos dessas localidades para eventuais recolonizações de outras regiões (Haig, 1998).

Entretanto, os resultados do presente trabalho demonstram a existência de diferenciação genética significativa entre amostras do Pantanal Norte e as demais regiões de distribuição da espécie e entre amostras do Pantanal Sul e do Nordeste. De forma similar, embora em menor grau, também foi evidenciada diferenciação genética entre Pantanal Sul e Pará e entre Nordeste e Pará. Assim, estratégias direcionadas a maximizar o tamanho de apenas algumas populações de *A. hyacinthinus*, em detrimento de outras populações, não seriam as ações mais adequadas, já que isto poderia resultar em uma maior perda de diversidade genética ao longo das gerações, fato que pode ter grande consequência adaptativa.

Dado que variação genética pode ser crucial para a sobrevivência de uma espécie e para sua adaptação a mudanças ambientais, as diferentes populações de *A. hyacinthinus* encontradas no Brasil poderiam ser consideradas Unidades Evolutivamente Significativas (*ESU*) que consistem em populações substancialmente isoladas reprodutivamente de outros grupos co-específicos e representam, assim, um importante componente da herança evolutiva de uma espécie. No contexto da Biologia da Conservação, acredita-se que cada *ESU* deva ser protegida e manejada de forma independente (Moritz, 1994; Eizirik, 1996; King & Burke, 1999). Adicionalmente, as diferentes populações de *A. hyacinthinus* devem ser continuamente monitoradas, a fim de comparar os atuais dados de diversidade e estruturação genética com dados futuros.

Como última consideração, o manejo deve preservar a diversidade adaptativa e os processos evolutivos ao longo de toda a distribuição geográfica de uma determinada espécie (Storfer, 1996). Levando-se em consideração que a história demográfica de *A. hyacinthinus* pode ser diferente nas diversas regiões geográficas de sua distribuição, a elaboração e a viabilização de planos de manejo e conservação comuns a todas as populações da espécie não seriam as ações conservacionistas mais adequadas.

4.3 Conclusões

Os resultados obtidos por meio da análise da região controle do DNA mitocondrial em *A. hyacinthinus* permitem concluir que:

- *A. hyacinthinus* apresenta baixos níveis de diversidade genética e tem passado por um processo recente de expansão, especialmente observado nas regiões do Pará e Nordeste, características que podem estar associadas a eventos de colonização ou de

gargalos populacionais. Adicionalmente, as quatro populações da espécie estudadas apresentam diferenciação genética significativa.

5. Capítulo II

5.1. Resultados

5.1.1. Jogo de Tabuleiro

Um jogo de tabuleiro, denominado “Conhecendo a arara-azul-grande”, foi elaborado de forma a abordar aspectos da biologia da espécie, suas relações inter e intraespecíficas, mecanismos que levam a espécie à extinção, incluindo conteúdos de genética e ações para sua conservação (Anexos II e III). O desenvolvimento, elaboração e aplicação deste material didático encontram-se descritos no artigo “*Conhecendo a arara-azul grande: confecção e aplicação de um jogo educativo como parte das ações de educação ambiental visando a conservação da espécie*”, submetido à publicação na Revista Brasileira de Educação Ambiental - REVBea.

A elaboração do jogo seguiu diversas etapas consecutivas: 1 - Pesquisa bibliográfica, com seleção de livros texto, livros didáticos e artigos científicos; 2 - Definição de conceitos a serem abordados; 3 - Elaboração de perguntas; 4 - Criação de rascunhos das ilustrações; 5 - elaboração de peças, tabuleiro e cartas; 6 - Revisão conceitual e científica do material produzido; 7 - Arte final e diagramação eletrônica; 8 - Impressão gráfica.

O jogo elaborado consiste em um tabuleiro com informações sobre as araras-azuis-grandes (Anexo II), cartas-perguntas contendo respostas de múltipla escolha ou abertas (Anexo III), um dado e peças individuais ("pinos") para cada jogador (Figura 6). Podem participar de dois a cinco jogadores e cada jogador terá uma peça específica. No tabuleiro, existem "casas" onde os jogadores, após jogar o dado, "andam" até a "casa" correspondente ao número tirado. Se cair na "casa" denominada de “?”, o jogador deve pegar uma "carta pergunta” e tentar respondê-la. Se acertar, anda mais uma "casa". Se não souber ou errar a resposta, este deve passar a vez para o jogador que estiver na "casa" mais à frente do tabuleiro e este terá a chance de tentar responder à mesma pergunta anterior. Se houver mais de um jogador na mesma "casa", estes decidirão quem irá responder por meio do jogo do dado - aquele que tirar o número maior poderá responder primeiro. Quando o participante “andar” nas “casas” do tabuleiro, mesmo que este caia na “casa” denominada de “?” ou em uma

"casa" com uma instrução, este não irá responder. A vez de jogar o dado será do próximo participante. Se este cair na "casa" com alguma instrução, este deve segui-la. Na "casa" denominada “chocando”, o participante deve permanecer uma rodada sem jogar. Ganha o jogo quem chegar primeiro na área do tabuleiro denominada de CONSERVAÇÃO.

De forma a alcançar especialmente comunidades que se encontram no entorno das áreas de distribuição das araras-azuis-grandes, o jogo produzido foi aplicado durante atividades de educação ambiental realizadas com estudantes do Ensino Fundamental I e II da região de Carajás, PA.



Figura 6: Imagem do jogo “Conhecendo a arara-azul-grande” contendo um tabuleiro e peças (pinos) para uso de cada jogador.

5.1.2. Cartilha

Uma cartilha, denominada “Muito prazer, eu sou a Arara-azul”, foi elaborada, de forma a abordar aspectos da biologia da espécie, suas relações inter e intraespecíficas, mecanismos que levam a espécie à extinção, incluindo conteúdos de genética e ações para sua conservação (Anexo VI). A cartilha está disponível no site do Museu Escola da UNESP de Botucatu no endereço <http://museuescola.ibb.unesp.br/menu.php?id=4>. Adicionalmente, o *download* do arquivo em pdf da cartilha contém um *link* para os dados adicionais sobre a pesquisa científica das araras-azuis-grandes voltadas à sua conservação (http://www.unesp.br/aci_ses/revista_unespciencia/acervo/47/estudo-de-campo).

A elaboração desta cartilha seguiu diversas etapas consecutivas: 1 - Pesquisa bibliográfica, com seleção de livros texto, livros didáticos e artigos científicos; 2 - Definição de conceitos a serem abordados; 3 - Elaboração de um roteiro do texto; 4 - Criação de rascunhos das ilustrações, para apoio aos textos e demais atividades; 5 - Revisão conceitual e

científica do material produzido; 6 - Arte final e diagramação eletrônica; 7 - Impressão gráfica.

O material final elaborado é composto por uma história que aborda aspectos biológicos dessa espécie de aves e textos acerca de Genética e Conservação. Adicionalmente, este material também apresenta atividades de caráter lúdico, como testes e jogos, com o objetivo de melhor fixar o conhecimento apresentado na cartilha e divertir os leitores. Diversas figuras mostradas na cartilha complementam tanto o texto principal quanto as demais atividades (Anexo VI). Os conteúdos foram abordados de forma clara e acessível, visando atingir especialmente um público infantil e/ou jovem, com a intenção de despertar, desde cedo, o interesse pela preservação de nossa biodiversidade.

De forma a alcançar especialmente comunidades que se encontram no entorno das áreas de distribuição das araras-azuis-grandes, a apostila produzida foi distribuída ao final das atividades de educação ambiental realizadas com estudantes e professores do Ensino Fundamental I e II da região de Carajás, PA. Adicionalmente, visando abranger uma comunidade mais ampla, esse material foi distribuído, durante os anos de 2013, 2014 e 2015, para cerca de 125 estudantes da rede básica pública que participam de atividades vinculadas ao Programa de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre Pós-Graduação e Ensino Básico”.

5.1.3. Atividades de educação ambiental

As atividades de educação ambiental foram realizadas com 283 alunos, vinculados a seis escolas municipais da região de Carajás - PA. Os alunos, matriculados em distintas séries do Ensino Fundamental, foram atendidos em nove turmas, separadamente (Tabela 8). Antes da realização de uma palestra, aberta à discussão com os alunos participantes e com inserção de fotos das araras-azuis em diferentes atividades, e da aplicação do jogo de tabuleiro, foi feito um levantamento preliminar dos conhecimentos prévios dos alunos participantes das atividades, por meio do preenchimento de um questionário composto por nove questões de múltipla escolha abordando diferentes questões sobre a biologia da arara-azul-grande (Anexo IV). Este questionário também serviu como incentivo à elaboração de novos questionamentos e discussão do tema abordado, por parte dos alunos participantes. Após a aplicação do questionário inicial, os mediadores (monitores) das atividades de educação ambiental conversaram com os alunos do ensino básico sobre os aspectos mais importantes associados à biologia da arara-azul-grande, seu *status* de ameaça e responderam todas as perguntas

levantadas pelos alunos sobre o assunto. Essa atividade foi importante para contextualizar a importância e a aplicação do jogo para que este não seja simplesmente "jogado por jogar". Esta explanação é necessária para a compreensão do “antes” e do “depois”, para que a atividade lúdica possa atingir objetivos didáticos (Flemming, 2004).

As atividades de educação ambiental seguiram com a aplicação do jogo didático, de acordo com as regras elaboradas para este e envolvendo grupos de 4 ou 5 alunos. Logo após a atividade do jogo, o questionário inicialmente preenchido pelos alunos foi reaplicado (Anexo V). Além das mesmas nove questões de múltipla escolha, havia adicionalmente um espaço para críticas, sugestões e comentários. Este questionário final também incluía um espaço para a avaliação da atividade desenvolvida, como a discussão inicial sobre o tema abordado, o jogo de tabuleiro e os mediadores do jogo. Essa avaliação teve como objetivo procurar aspectos da atividade que poderiam ser melhorados.

Durante a atividade realizada, não foi possível obter o preenchimento do questionário final por todos os alunos participantes das atividades (Tabela 8), devido ao tempo despendido pela aplicação do jogo em si. Entretanto, a análise dos demais questionários e a comparação dos dados anteriores à aplicação do jogo e posteriores à aplicação deste mostraram-se suficientes para comprovar a eficiência das atividades educativas realizadas.

Tabela 8: Nome da escola, data da atividade realizada, série de vínculo ao Ensino Fundamental I ou II e número de participantes por turma.

Escola	Turma	Data	Número de Participantes
EMEIF Crescendo na Prática	5º Ano	19/03/2013	19 alunos
EMEF Crescendo na Prática	4º e 8º Ano	26/10/2013	46 alunos
EMEIF Magalhães Barata	8º e 9º Ano	27/03/2013	22 alunos
EMEIF Magalhães Barata	4º, 5º, 6º e 7º Ano	10/11/2013	30 alunos
EMEIF Odail Alves Ferreira*	4º e 5º Ano	27/03/2013	29 alunos
EMEIF Carlos Henrique*	4º e 5º Ano	27/03/2013	21 alunos
EMEIF Carlos Henrique	6º e 7º Ano	11/11/2013	10 alunos
EMEIF Jorge Amado	8º Ano	01/04/2013	14 alunos
EMEIF Jorge Amado*	6º Ano	01/04/2013	20 alunos
EMEIF Paulo Freire	6º, 7º e 8º Ano	27/10/2013	72 alunos

EMEIF- Escola Municipal de Ensino e Instituto Fundamental

*Escolas onde não foi possível a aplicação do questionário final.

Dentre os alunos que responderam o questionário em relação ao conhecimento sobre a arara-azul-grande, foi possível observar que 88,3% afirmaram conhecer a espécie, enquanto 10,7% não a conheciam, 83,7% já a haviam visto e 13,95% nunca a viram. Adicionalmente, 84,5% afirmaram saber que a arara-azul-grande é uma espécie ameaçada de extinção e 89,8% dos alunos responderam que é crime capturar esta ave (Figura 7). Essas questões tiveram como objetivo avaliar se os alunos possuíam conhecimento sobre as araras-azuis-grandes e verificar se estes sabem das consequências, para a conservação da espécie, quando um indivíduo é retirado da natureza.

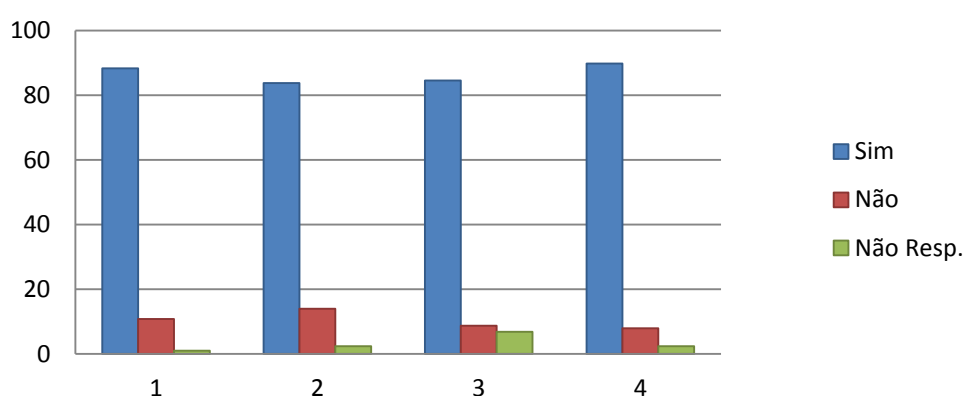


Figura 7: Porcentagem de respostas dos alunos às seguintes questões: 1 - Você conhece a arara-azul-grande?; 2 - Você já viu uma arara-azul-grande?; 3 - A arara-azul-grande é uma espécie atualmente ameaçada de extinção?; 4 - É crime pegar araras-azuis-grandes na natureza?

Perguntas como: “Você já viu uma arara-azul-grande? Se sim, onde a viu?” estimularam discussões interessantes, uma vez que foram obtidas repostas variadas. Dentre estas respostas, verificou-se que os alunos já viram exemplares desta espécie em zoológicos, pela televisão, na natureza (florestas, matas e rios), em lavouras e próximo às casas de parentes. Porém, alguns alunos relataram terem visto as araras-azuis-grandes em árvores que são muito utilizadas por elas, como o axixá, principal árvore onde estas aves fazem seus ninhos na região do Pará. Ou ainda, em palmeiras diversas, onde estas se alimentam de macaúba, babaçu e inajá, ou utilizam para pouso (palmeira açai). Entretanto, alguns alunos disseram ter visto exemplares de arara-azul-grande em bares, dado preocupante, uma vez que essas aves podem ter sido capturadas no ninho ou compradas ilegalmente.

Um exemplo da quantidade de acertos com relação às informações apresentadas no questionário inicial e final é apresentado na Figura 8. O resultado mostra que atividades como

a palestra, baseada em conversas informais sobre o tema, somada à prática do jogo educativo levaram ao aprendizado a respeito das araras-azuis-grandes, já que o número de acertos aumentou depois das atividades realizadas (Figura 8). A questão “Quais das aves abaixo são classificadas como psitacídeos?” apresentou, inicialmente, uma porcentagem de acertos de 77,4%, enquanto que, após as atividades realizadas, esta teve 95,2% de acertos. Questões como “Em que árvore da região de Carajás a arara-azul-grande faz seu ninho?”, “Em quais regiões do Brasil a arara-azul-grande pode ser encontrada?” e “Qual é o principal alimento da arara-azul-grande?”, tiveram porcentagens de acerto inicial e final de 13,7% / 79%, 44% / 77,1% e 37,8% / 77,1%, respectivamente (Figura 8). A questão diretamente voltada para a conservação da arara-azul-grande ("O que você acha que nós poderíamos fazer para proteger as araras-azuis-grandes?") apresentou como respostas uma associação entre conservação da espécie com preservação do habitat, combate à caça e venda ilegal, fiscalização e o diálogo perante a sociedade.

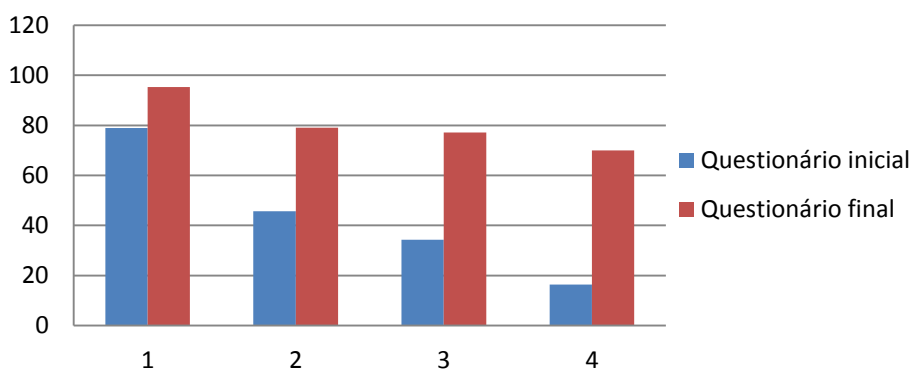


Figura 8: Número de acertos (%) em relação ao questionário inicialmente preenchido e posteriormente preenchido pelos participantes das atividades de educação ambiental. Os números no gráfico referem-se às questões: 1 - “Quais das aves abaixo são classificadas como psitacídeos?”; 2 - “Em quais regiões do Brasil a arara-azul-grande pode ser encontrada?”; 3 - “Qual é o principal alimento da arara-azul-grande?”; 4 - “Em que árvore da região de Carajás a arara-azul-grande faz seu ninho?”.

Em relação à avaliação geral, feita pelos alunos sobre as atividades desenvolvidas, a maioria (66%) classificou a palestra como ótima, 22% a acharam boa, 2,8% consideraram regular e somente 0,95% ruim (Figura 9). Com relação ao jogo de tabuleiro, 60,7% o consideraram ótimo; 23% bom; 4,3% regular e 3,3% ruim (Figura 10). Porcentagens semelhantes foram obtidas quando perguntados a respeito dos mediadores (monitores) das atividades - 63,6% os consideraram ótimos; 22% bons, 2,9% regulares e 1,4% ruins (Figura

11). Finalmente, para 63,6% dos alunos, o assunto abordado foi ótimo, para 24,4% foi bom, para 1,9% foi regular e somente 1,4% o consideraram ruim (Figura 12).

Ao término de todas as atividades, a cartilha educativa “Muito prazer, eu sou a arara-azul” foi entregue aos alunos participantes, com o objetivo de que estes pudessem dar continuidade ao aprendizado sobre os aspectos biológicos e sobre a problemática conservacionista dessa espécie de ave.

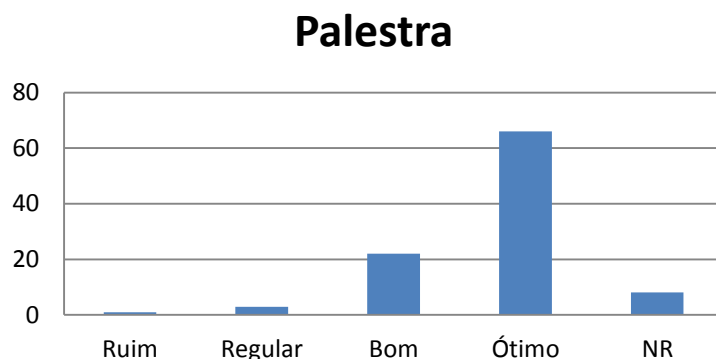


Figura 9: Resultados da avaliação dos alunos participantes das atividades de educação ambiental em relação à palestra realizada. Os dados encontram-se apresentados em porcentagem. NR - porcentagem dos alunos que não responderam à pergunta.

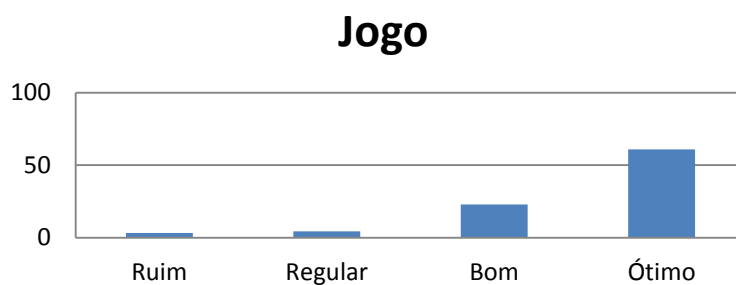


Figura 10: Resultados da avaliação dos alunos participantes das atividades de educação ambiental em relação ao jogo aplicado. Os dados encontram-se apresentados em porcentagem.

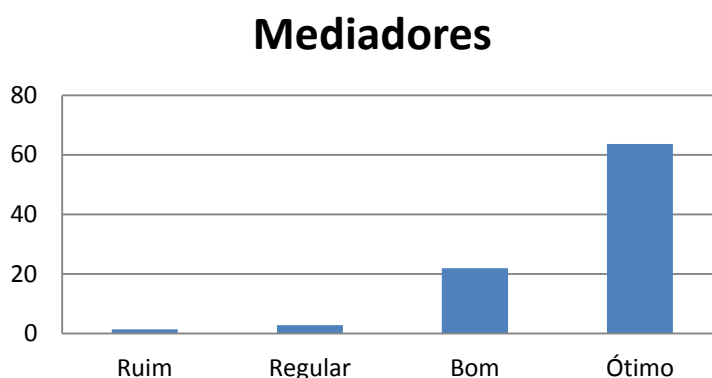


Figura 11: Resultados da avaliação dos alunos participantes das atividades de educação ambiental em relação à atuação dos mediadores (monitores). Os dados encontram-se apresentados em porcentagem.

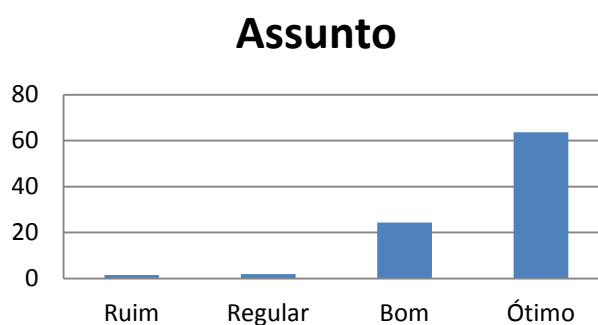


Figura 12: Resultados da avaliação dos alunos participantes das atividades de educação ambiental em relação ao assunto abordado. Os dados encontram-se apresentados em porcentagem.

5.2. Discussão

Os processos educativos têm grande potencial de gerar mudanças de hábito, atuando como instrumentos de conscientização e direcionamento social (Lima, 1999). Neste contexto, atividades de educação ambiental figuram como uma das principais ações educativas voltadas a questões ambientais, especialmente se estas envolvem comunidades específicas. Estas atividades, associadas à aplicação de diferentes materiais didáticos, como livros, jogos, DVDs, apostilas, folhetos e cartilhas, são capazes de promover resultados expressivos para seus participantes (Echer, 2005), garantindo o acesso à informação em linguagem adequada e contribuindo para o desenvolvimento de uma consciência crítica e o enfrentamento das questões ambientais e sociais (Mousinho, 2003).

Dada a necessidade de gerar mecanismos adicionais que contribuam para a conservação das araras-azuis-grandes, foram produzidos dois materiais educativos e realizadas atividades de educação ambiental em Carajás - PA, uma das regiões de distribuição de *A. hyacinthinus* no país. Embora de distribuição provavelmente mais ampla no passado, atualmente a espécie se encontra geograficamente fragmentada, com três populações principais: uma no Pantanal Matogrossense, outra que engloba parte dos estados do Tocantins, Piauí, Maranhão, Bahia, Goiás e Minas Gerais e a terceira e menor delas, na região amazônica paraense (Collar, 1997; Guedes *et al.*, 2008).

As atividades educativas realizadas foram embasadas em uma palestra, com inclusão de fotos demonstrativas, um jogo de tabuleiro e uma cartilha, que abrangem informações que permitem ao jogador/leitor uma compreensão clara e lúdica de seus conteúdos. Ao final, tais atividades em conjunto foram mostraram-se satisfatórias para os participantes e eficientes em despertar o interesse do público e transmitir informações sobre aspectos biológicos da arara-azul-grande e sobre possíveis ações/soluções para minimizar os riscos de extinção desta espécie ameaçada. O uso de estratégias de ensino diversificadas, como ocorreu no presente trabalho, tem grande potencial de atingir seus objetivos, já que permitem explorar as diferentes características de aprendizagem de cada indivíduo (Pedroso, 2009).

Entre as diferentes atividades realizadas, destaca-se a aplicação do jogo de tabuleiro que, ao aliar sua característica de material didático lúdico com objetivos educacionais específicos, pode trazer a valorização de uma consciência ambiental aos participantes, transformando seu comportamento em relação ao ambiente em que vivem (Breda & Picanço, 2011). Muitos autores relatam o poder do jogo como método de ensino e aprendizagem, pois este diverte, motiva e exerce uma fascinação sobre as pessoas, pela busca “pela vitória” (Carneiro, 1990; Gomes & Friedrich, 2001; Calado *et al.*, 2011), além de permitir uma maior socialização do grupo, o que é também positivo para a aprendizagem (Pinto, 2009).

Todos esses benefícios puderam ser observados na aplicação do jogo educativo “Conhecendo a arara-azul-grande”, uma vez que os alunos se divertiram e o resultado do segundo questionário aplicado mostrou que houve apropriação do conhecimento por parte dos participantes e que estes passaram a ter uma visão diferente da problemática da conservação da arara-azul-grande.

Dado o exposto, é possível sugerir ainda que professores e educadores possam atuar como agentes multiplicadores e aplicar o jogo elaborado em suas aulas, visando proporcionar aos alunos maiores incentivos e interesse pelo tema de conservação das araras-azuis-grandes e com isso transformar a sala de aula em um lugar prazeroso e atrativo e que trate da realidade

da comunidade em questão. Além disso, abordagens de ensino com a utilização de jogos apresentam outra vantagem, associada ao estímulo de outras habilidades cognitivas, que não somente a busca pela aprendizagem. Enquanto joga, o participante desenvolve a iniciativa, a imaginação, o raciocínio, a memória, a atenção, a curiosidade, o interesse e a contextualização de assuntos, concentrando-se por um tempo mais longo em uma determinada atividade (Fortuna, 2003).

Modelos ou atividades de educação ambiental bem sucedidos podem ajudar a priorizar ações ou planos de conservação de espécies, populações ou ecossistemas. Entre as atividades educacionais bem sucedidas direcionadas à conservação de espécies, podem-se citar aquelas que se utilizam as chamadas espécies “bandeira”, pois estas podem levantar discussões multidisciplinares sobre o meio ambiente, já que representam “ícones ou símbolos” associados a uma determinada causa ambiental, que pode ser desde sua própria conservação como a conservação de seu ecossistema inteiro. Entre as espécies bandeira da fauna brasileira que vêm sendo empregadas em atividades de educação ambiental, pode-se citar o mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*) (Padua & Padua-Valladares, 1997) e o mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*) (Dietz & Nagagata, 1985), categorizados como “em perigo”, e o papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) (Carrillo & Batista, 2007), considerado “vulnerável”. Especificamente em relação ao papagaio-de-cara-roxa, a aplicação de atividades educativas lúdicas, como a peça teatral “Juca e os papagaios”, para estudantes de Guaraqueçaba e Paranaguá/PR (área de ocorrência da espécie), permitiram um aumento do conhecimento sobre esta espécie de papagaio, maior valorização da ave e maior indicação de posturas positivas para sua conservação (Carrillo & Batista, 2007).

De forma similar, *A. hyacinthinus* também já vem sendo utilizada como espécie bandeira pelo Projeto Arara-Azul (Instituto Arara Azul), visando promover não somente sua própria conservação como também da biodiversidade do Pantanal Matogrossense (Guedes, 2009). A ampliação das atividades de educação ambiental voltadas para a arara-azul-grande, como realizado no presente trabalho na região de Carajás - PA, associada à beleza, carisma e vulnerabilidade da espécie, faz com que esta tenha um enorme potencial para ser elevada ao perfil de bandeira em larga escala no país, o que poderia lhe garantir uma proteção mais abrangente e economicamente viável.

5.3. Conclusões

Os resultados obtidos por meio das atividades educacionais relacionadas à conservação de *A. hyacinthinus* permitem concluir que:

- Os materiais didáticos produzidos e as atividades de educação ambiental realizadas possibilitam uma abordagem didática e uma aprendizagem lúdica, de maior incentivo e interesse pelo tema da conservação das araras-azuis-grandes, e um ambiente crítico para a construção de conhecimento.

6. Considerações Finais

A preocupação da Biologia da Conservação não é só entender a ação dos mecanismos que condicionam a diversidade e a estrutura populacional, mas também levantar as informações consistentes, elaborar propostas e realizar ações conservacionistas concretas. A integração de diferentes abordagens, tanto genéticas como de educação ambiental, como realizadas no presente trabalho, provavelmente tornarão possível estabelecer estratégias mais abrangentes e adequadas para a conservação de *A. hyacinthinus*.

Ao aproximarmos as comunidades envolvidas nos processos de conservação da arara-azul-grande, sejam elas de cunho acadêmico ou não, é possível não somente uma integração trans-setorial e proativa da universidade com a sociedade como também uma soma de esforços para minimizar seu risco de extinção.

7. Referências Bibliográficas

- Alacs, E.A., Fredricj, F.J. & Scribner, K.T. 2007. *Genetic issues in freshwater turtle and tortoise conservation*. Chelonian Research Monographs, 107-123.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miler, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. *Basic local alignment search tool*. Journal of Molecular Biology, 403-410 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).
- Arden, S.L. & Lambert, D.M. 1997. *Is the black robin in genetic peril?* Molecular Ecology, 21-28.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York, 511 pp.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Harvard University Press. Cambridge, 447 pp.
- Avise, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution (Second Edition)*. Sinauer, Sunderland, MA, 684 pp.
- Banhos, A. 2008. *Genética, distribuição e conservação do gavião real (Harpia harpyia) no Brasil*. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Universidade Federal da Amazônia, Manaus.
- Baker, A.J. & Marshall, H.D. 1997. *Molecular evolution of the mitochondrial genome. Avian Molecular Evolution and Systematics*. Academic Press, San Diego, 51-82.
- Bantock, T.M., Jones, R.P.P. & Lee, L.M. 2008. *New and improved molecular sexing methods for museum bird specimens*. Molecular Ecology Resources, 519-528.
- Begon, M., Townsend, C.R. & Harper, J.L. 2007. *Ecologia: de Indivíduos a Ecossistemas*. 4 ed. Artmed, Porto Alegre, 752 pp.
- Breda, T. V. & Picanço, J. L. 2011. *A educação ambiental a partir de jogos: aprendendo de forma prazerosa e espontânea*. II SEAT – Simpósio de Educação Ambiental e Transdisciplinaridade. Goiânia, GO. Disponível em: http://nupeat.iesa.ufg.br/uploads/52/original_2_EDUCACAO_AMBIENTAL_com_JOGO_S.pdf. Acesso em: 15 de Julho, 2014.
- Browne, R.A., Collins, E. & Anderson, D.J. 2008. *Genetic structure of Galapagos population of the yellow warbler*. The Condor, 549-553.

- Bruford, M.W., Hanotte, O., Brookfield, J.F.Y. & Burke, T. 1992. *Single locus and multilocus DNA fingerprint*. In: Hoezel, A.R. (ed.). *Molecular Genetics Analysis of Population. A Practical Approach*. Oxford University Press, New York, 225-269.
- Calado, N.V., da Costa, M.R.B., Cardoso, A.M., Paes, L.S. & Mello, M.S.V.N. 2011. *Jogo didático como sugestão metodológica para o ensino de briófitas no ensino médio*. *Revista Amazônica de Ensino de Ciências*, 92-101. Disponível em: http://www.revistas.uea.edu.br/download/revistas/arete/vol.4/arete_v4_n06-2011-10.pdf. Acesso em: 15 de Julho, 2014.
- Cann, R.L., Stoneking, M. & Wilson, A.C., 1987. *Mitochondrial DNA and human evolution*. *Nature*, 31-36.
- Caparroz, R. 2003. *Filogeografia, Estrutura e Variabilidade Genética de Arara-canindé (Ararauna, Psittaciformes: Aves) no Brasil Baseadas na Análise de DNA Mitochondrial e de DNA Nuclear*. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Caparroz, R., Miyaki, C. & Baker, A.J. 2009. *Contrasting phylogeographic patterns in mitochondrial DNA and microsatellite: evidence of female philopatry and male-biased gene flow among regional populations of the blue-and-yellow macaw (Psittaciformes: Ararauna) in Brazil*. *The Auk*, 359-370.
- Carneiro, M.A.B. 1990. *Jogando, descobrindo, aprendendo (depoimentos de professores e alunos do terceiro grau)*. Tese de Doutorado. Escola de Comunicação e Artes, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Carrillo, A.C. & Batista, D.B. 2007. *A conservação do papagaio-de-cara-roxa (Amazona brasiliensis) no estado do Paraná – uma experiência de educação ambiental no ensino formal*. *Revista Árvore*, 113-122.
- Clarke, A.L., Saether, B.E. & Roskift, E. 1997. *Sex biases in avian dispersal: a reappraisal*. *Oikos*, 429-438.
- Claver, J.A. & Quaglia, A.I.E. 2009. *Comparative morphology, development, and function of blood cells in non mammalian vertebrates*. *Jornal of Exotic Pet Medicine*, 87-97.
- Collar, N.J. 1997. *Family Psittacidae (Parrots)*. In: del Hoyo, J., Elliot, A.E. & Sargatal, J. (Eds.) *Handbook of the Birds of the World*, vol. 4. Sandgrouse to Cuckos. Lynx Edicions, Barcelona, 280-477.

- Collar, N.J., Gonzaga, L.P., Krabbe, N., Nieto, A.M., Naranjo, L.G., Parker, T.A. & Wege, D.C. 1992. *Threatened birds of the Americas: the ICBP/IUCN Red Data Book*. Cambridge: International Council for Bird Preservation, 1150 pp.
- Collet, T., Cristino, A.S., Quiroga, C.F.P., Soares, A.E.E.S. & Lama, M.A.D. 2009. *Genetic structure of drone congregation areas of Africanized honeybees in Southern Brazil*. *Evolutionary Genetics*, 857-863 pp.
- Crochet, P.A. 1996. *Can measures of gene flow help to evaluate bird dispersal?* *Acta Oecologica*, 459 - 474.
- Dantas, G.P., Meyer, D., Godinho, R., Ferrand, N. & Morgante, J.S. 2012. *Genetic variability in mitochondrial and nuclear genes of Larus dominicanus (Charadriiformes, Laridae) from the Brazilian coast*. *Genetics and Molecular Biology*. 874-885.
- Dietz, L.A. & Nagata, E. 1985. Projeto Mico-leão - Programa de Educação Ambiental Comunitária para a Conservação do Mico-Leão-Dourado – *Leontopithecus rosalia* (Linnaeus, 1766) - Desenvolvimento de Educação como uma Tecnologia para a Conservação de uma Espécie em Extinção. *In: Congresso Brasileiro de Primatologia, Campinas*, 248-256.
- Drummond, A.J. 2009. *Genetics 4.8.5* (www.geneious.com).
- Eberhard, J.R., Wright, T.F. & Bermingham, E. 2001. *Duplication and Concerted Evolution of the Mitochondrial Control Region in the Parrot Genus Amazona*. *Molecular Biological Evolutionary*, 1330–1342.
- Echer, I.C. 2005. *The development of handbooks of health care guidelines*. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 754-757.
- Eckstrom, C.K. 1994. *Homeless macaws?* *International Wildlife*, 14-23.
- Edgar, R.C. 2004. *MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput*. *Nucleic Acids Research*, 1792-1797.
- Eizirik, E. 1996. *Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de Unidades Evolutivamente Significativas*. *Revista Brasileira de Genética (Suplemento)*, 23-29.
- Excoffier, L., Smouse, P. & Quattro, J. 1992. *Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data*. *Genetics*, 479-491.

- Excoffier L., Laval G. & Schneider S. 2005. *Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis*. Evolutionary Bioinformatics, 47-50.
- Faria, P.J., Guedes, N.M.R., Yamashita, C., Martuscelli, P. & Miyaki, C.Y. 2008. *Genetic variation and population structure of the endangered Hyacinth Macaw (Anodorhynchus hyacinthinus): implications for conservation*. Biodiversity Conservation, 765-779.
- Feral, J.P. 2002. *How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity?* Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 121-145.
- Fernandes, G.A. & Caparroz, R. 2013. *DNA sequence analysis to guide the release of blue and-yellow macaws (Ara ararauna, Psittaciformes, Aves) from the illegal trade back into the wild*. Molecular Biology Reports, 2757-2762.
- Ferreira, V.R. 2010. *Arara azul Anodorhynchus hyacinthinus: a rainha das aves brasileiras. Comissão Técnica da ABRASE*. Disponível em: <<http://www.abrase.com.br/arquivos/comissao%20tecnica/ARARA%20AZUL%20GRANDE%20-%20CRIACAO%20E%20OBSERVACOES.pdf>>. Acesso em: 21 de Janeiro, 2015.
- Forshaw, J. 1989. *Parrots of the World*. 3ed. Landsdowne Editions, Melbourne, 672 pp.
- Forster M., Forster P. & Watson J. 2007. *Network version 4.2.0.1: a software for population genetics data analysis*. Ed. Fluxus Technology Ltda.
- Fortuna, T.R. 2003. *Jogo em aula*. Revista do Professor, 15-19.
- Franco, J.L.A. 2013. *O conceito de biodiversidade e a história da biologia da conservação: da preservação da wilderness à conservação da biodiversidade*. História, 21-48.
- Frankham, R. 2008. *Genetic adaptation to captivity in species conservation programs*. Molecular Ecology, 325-333.
- Frankham, R., Ballou, J.D. & Briscoe, D.A. 2008. *Fundamentos da genética da conservação*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 262 pp.
- Fu, X.Y. 1997. *Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection*. Genetics 147: 915-925
- Fu, X. Y. & Li, W.H. 1993. *Statistical tests of neutrality of mutations*. Genetics 133: 693-709.

- Galleti, M. & Rodrigues, M. 1992. Comparative seed and predation on pods by parrots in Brazil. *Biotropica*, 222-224.
- Galleti, M. 2002. *Métodos para avaliar a dieta de psitacídeos*. In: Galleti, M. & Pizo, M.A. (Eds.). *Ecologia e conservação de psitacídeos no Brasil*. Belo Horizonte, Melopsittacus Publicações Científicas.
- Gomes, R. R. & Friedrich, M. 2001. *A Contribuição dos jogos didáticos na aprendizagem de conteúdos de Ciências e Biologia*. In: EREBIO, 1, Rio de Janeiro, 389-392.
- Greenwood, P.J. 1980. *Mating systems, phylopatriy and dispersal in birds and mammals*. *Animal Behavior*, 1140-1162.
- Groom, M.J., Meffe, G.K. & Carroll, C.R. (Eds.). 2006. *Principles of Conservation Biology*. 3ed. Massachusetts: Sinauer Associates.
- Guedes, N.M.R. 1995. *Alguns aspectos sobre o comportamento reprodutivo da arara-azul (Anodorhynchus hyacinthinus) e a necessidade de manejo para a conservação da espécie*. In: *Anais de Etologia*, Pirassununga, 274-292.
- Guedes, N.M.R. & Harper, L.H. 1995. *Hyacinth Macaw in the Pantanal*. In: Abramson, J., Speer, B.L. & Thomsen, J.B. (Eds.). *The large macaws: their care, breeding and conservation*. Fort Bragg: Raintree Publications, 394-421.
- Guedes, N.M.R. 2004. *Management and conservation of the large macaws in the wild*. *Ornitologia Neotropical*, 279-283.
- Guedes, N.M.R., Bianchi, C. & Barros, Y. 2008. *Anodorhynchus hyacinthinus*. In: Machado, A.B.M., Drummond, G.M. & Paglia, A.P. (Eds.) *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. 2 vol. MMA – Ministério de Meio Ambiente. Brasília.
- Guimarães, R. 2001. *La sostenibilidad del desarrollo entre Rio-92 y Johannesburgo 2002: eramos felices y no sabemos*. *Ambiente & Sociedade*, 5-24.
- Haig, S.M. 1998. *Molecular contributions to conservation*. *Ecology*, 413-425.
- Hartl, D.L. & Clark, A.G. 1997. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Harpending, R.C. 1994. *Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution*. *Human Biology*, 561-600.

- IUCN – International Union for Conservation of Nature. 2015. Disponível em: <<http://www.iucn.org/>>. Acesso em: 02 de junho, 2015
- IUCN - Red List of Threatened Species. 2014. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 20 de junho, 2015.
- Kennedy, E.S., Grueber, C.E. & Dancan, R.P. 2014. *Severe inbreeding depression and no evidence of purging in a extremely inbred wild species- the Chathan Island Black Robin*. Evolution, 987-995
- Librado, P. & Rozas, J. 2009. *DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data*. Bioinformatics, 1451-1452.
- Lima, G.F.C. 1999. *Questão ambiental e educação: contribuições para o debate*. Ambiente & Sociedade, 135-153.
- Mercer, D.M., Haig, S.M. & Roby, D.D. 2013. *Phylogeography and population genetic structure of double-crested cormorants (Phalacrocorax auritus)*. Conservation Genetics, 823-836.
- Miller, H.C., & Lambert, D.M. 2006. A molecular phylogeny of New Zealand's Petrocia (Aves: Petroica) species based on mitochondrial DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, 844-855.
- Mittermeier, R.A., Fonseca, G.A.B., Rylands, A.B. & Brandon, K. 2005. *Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil*. Megadiversidade, 14-21
- Miyaki, C.Y., Guedes, N.M.R., Herrera, R.P. & Wajntal, A. 1995. *Estudo da variabilidade genética e da razão sexual de uma população silvestre de arara azul do Pantanal*. In: Congresso Nacional de Genética, 410. Brazilian Journal of Genetics, 314.
- Miyaki, C.Y., Mاتيoli, S.R., Burke, T. & Wajntal, A. 1998. *Parrot evolution and paleogeographical events: mitochondrial DNA evidence*. Molecular Biology Evolutionary, 544-551.
- Miyaki, C.Y., Guedes, N.M.R. & Wajntal, A. 1999. *Genetic variability and other reproductive data on a population of the Hyacinth Macaw*. In: Neotropical Ornithological Congress, Book of Abstracts, Monterrey y Saltillo, México, 179.
- Miyaki, C.Y. 2001. *Genética e evolução aplicadas à conservação*. In: Albuquerque, J.L.B. Ornitologia e Conservação: da Ciência às Estratégias. Editora Unisul, Tubarão, 239-246.

- MMA, ICMBio. 2015. *Plano Nacional para Conservação do Xingu*. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-plano-de-acao/pan-xingu/painel-de-gestao-xingu-fauna.pdf>>. Acesso em: 10 de Fevereiro, 2015.
- Mousinho, P. 2003. *Glossário*. In: Trigueiro, A. (Coord.) Meio ambiente no século 21. Rio de Janeiro: Sextante.
- Munn, C.A. Thomsen, J.B. & Yamashita, C. 1987. *The distribution and status of the Hyacinth Macaw (Anodorhynchus hyacinthinus) in Brazil, Bolívia and Paraguay*. Report to the Secretaria of the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. New York: Conservation International, 50.
- Munn, C.A., Thomsen, J.B. & Yamashita, C. 1989. *The hyacinth macaw*. In: Chadler, W.J. (Ed.). Audubon Wildlife Report. Academic Press. New York, 404-419.
- Nei, M. & Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nielsen, R. 2001. *Statistical tests of selective neutrality in the age of genomics*. Heredity, 641-647.
- Oliveira-Marques, A. R. 2010. *Caracterização da estrutura genética populacional das araras vermelhas Ara chloropterus e Ara macao (Psittaciformes, Aves)*. Tese de doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Padua, S.M. & Padua-Valladares, C. 1997. *Um programa integrado para a Conservação do mico leão-preto (Leontopithecus chrysopygus) – pesquisa, educação e envolvimento comunitário*. In: Pádua, S. M., Tabanez, M. F. Educação ambiental: caminhos trilhados no Brasil. Brasília: Fundo Nacional do Meio Ambiente – FNMA; Ministério do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos e da Amazônia, 119-131.
- Padua, S.M., Tabanez, M.F. & Souza, M.G. 2003. *A abordagem participativa na educação para a conservação da natureza em Métodos de Estudo em Biologia da Conservação e da Vida Silvestre*. Curitiba: Editora Universidade Federal do Paraná.
- Pedroso, C.V. 2009. *Jogos didáticos no ensino de biologia: uma proposta metodológica baseada em módulo didático*. IX Congresso Nacional de Educação, EDUCERE, Curitiba, PR. Disponível em: <http://www.isad.br/eventos/educere/educere2009/anais/pdf/2944_1408.pdf>. Acesso em: 15 de Julho, 2014.

- Pinto, L.T. 2009. *O uso dos jogos didáticos no ensino de ciências no primeiro segmento do ensino fundamental da rede municipal de Duque de Caxias*. Dissertação de Mestrado, Instituto Federal de Ciência, Educação e Tecnologia do Rio de Janeiro, Nilópolis. Disponível em: http://www.ifrj.edu.br/webfm_send/3039. Acesso em: 15 Julho, 2014
- Pough, F.H, Janis, C.M. & Heiser, J.B. 2008. *A vida dos vertebrados*. 4ª ed. São Paulo: Atheneu Editora, 718 pp.
- Pedrini, A., Costa, E.A. & Guilardi, N. 2010. *Percepção ambiental de crianças e pré-adolescentes em vulnerabilidade social para projetos de educação ambiental*. Ciência e Educação, 163-179.
- Presti, F.T. 2006. *Caracterização da variabilidade genética em espécies de psitacídeos ameaçados*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Presti, F.T., Oliveira-Marques, A.R, Silva, G.F., Miyaki, C.Y. & Guedes, N.M. 2009. *Notas sobre alguns aspectos da biologia da arara-azul (Anodorhynchus hyacinthinus) (Psittaciformes: Psittacidae) na região do Carajás*. Atualidades Ornitológicas 4-7
- Presti, F.T. 2011. *Caracterização da diversidade genética, da estrutura populacional e do parentesco de Arara-azul-grande (Anodorhynchus hyacinthinus) por meio da análise de regiões dos genomas nuclear e mitocondrial*. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Presti, F.T., Guedes, N.M.R., Antas, P.T.Z., Miyaki, C.Y. 2015. *Population genetic structure in hyacinth macaws (Anodorhynchus hyacinthinus) and identification of the probable origin of confiscated individuals*. Journal of Heredity. No prelo
- Primack, R.B., Rodrigues, E. 2002. *Biologia da conservação*. Londrina: E. Rodrigues, 83 pp.
- Ricklefs, R.E. 2010. *A Economia da Natureza*. 6 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 572 pp.
- Ridley, M. 2006. *Evolução*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed. 752 pp.
- Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J. 2002. *Statistical properties of new neutrality tests against population growth*. Molecular Biology and Evolution 2092-2100
- Rodrigues, E. 2002. *Biologia da conservação: ciência da crise*. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, 261-272.

- Schneider, L., Serbena A.L. & Guedes, N.M.R. 2006. *Behavioral categories of hyacinth macaws (Anodorhynchus hyacinthinus) during the reproductive period, at South Pantanal, Brazil*. Revista de Etologia 71-80.
- Sherwin, W.B., Timms, P., Wilcken, J. & Bronwyn, H. 2000. *Analysis and conservations implication of koala genetics*. Conservation genetics, 639-649.
- Sick, H. 1997. *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 912 pp.
- Silva, H.E. 2014. *Prospecção de marcadores microsatélites, análise de variabilidade e estrutura genética populacional da arara-azul-grande Anodorhynchus hyacinthinus (Latham, 1790) com ênfase na região do mosaico dos Carajás/PA*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Silva, M.B. & Mamede, S.B. 2005. Grupos de observadores de aves e mamíferos como estratégia para a conservação da biodiversidade do Cerrado. *I Congresso regional de educação ambiental para a conservação do Cerrado*. Quirinópolis, Goiás.
- Solé-Cava, A.M. 2001. *Biodiversidade molecular e genética da conservação*. In: Matioli, S.R. (ed). *Biologia Molecular e Evolução*. Editora Holos, Ribeirão Preto, 172-192.
- Soulé, M. 1985. What is conservation biology? *BioScience*, 727-734.
- Soulé, M.E. & Wilcox, B.A. (Eds.). 1980. *Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Storfer, A. 1996. *Quantitative genetics: a promising approach for the assessment of genetic variation in endangered species*. Trends in Ecology and Evolution, 343-348
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. *Mega 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0*. Molecular Biology and Evolution 2725-2729.
- Tajima, F. 1989. *Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism*. Genetics 585-595.
- Tavares, E.S., Baker, A.J., Pereira, S.L. & Miyaki, C.Y. 2006. *Phylogenetic relationships and historical biogeography of neotropical parrots (Psittaciformes: Psittacidae: Arini) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences*. Systematic. Biology, 454-470.
- Tavares, E.S., Yamashita, C. & Miyaki, C.Y. 2004. *Phylogenetic relationships among some neotropical parrot genera (Psittacidae) based on mitochondrial sequences*. The Auk, 230-242.

- Technelysium Pty Ltd., 2007. Chromas lite version 2.01 (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html)
- Templeton, A.R. 2011. *Genética de populações e teoria microevolutiva*. Ribeirão Preto: Editora SBG, 705 pp.
- Toledo Filho, S., Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F., Galhardo, E. & Donola, E. 1992. *Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios*. São Paulo: USP, Cadernos de Ictiogenética. 39 pp.
- Wright, T.F., Toft, C.A., Hoeflich, E.E., Elizondo, J.G., Albornoz, M., Ferraro, A.R., Surez, F.R., Sanz, V., Trujillo, A. & Beissinger, S.R. 2001. *Nest poaching in Neotropical parrots*. Conservation Biology, 710-720.
- Wright, S. 1965. *The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating*. Evolution, 395-420.
- Wright, S. 1978. *Variability Within and Among Natural Populations*. Evolution and the Genetics of Populations. University of Chicago Press, Chicago, IL.
- Yamashita, C. 1992. *Comportamento de araraúna (Anodorhynchus hyacinthinus) Psittacidae, Aves*. Anais de Etologia, Jaboticabal, 158-162

8. Anexos

Anexo I

Tabela: Amostras biológicas obtidas, datas de coleta e nome do coletor do material biológico e locais de ocorrência dos exemplares de *A. hyacinthinus* estudados.

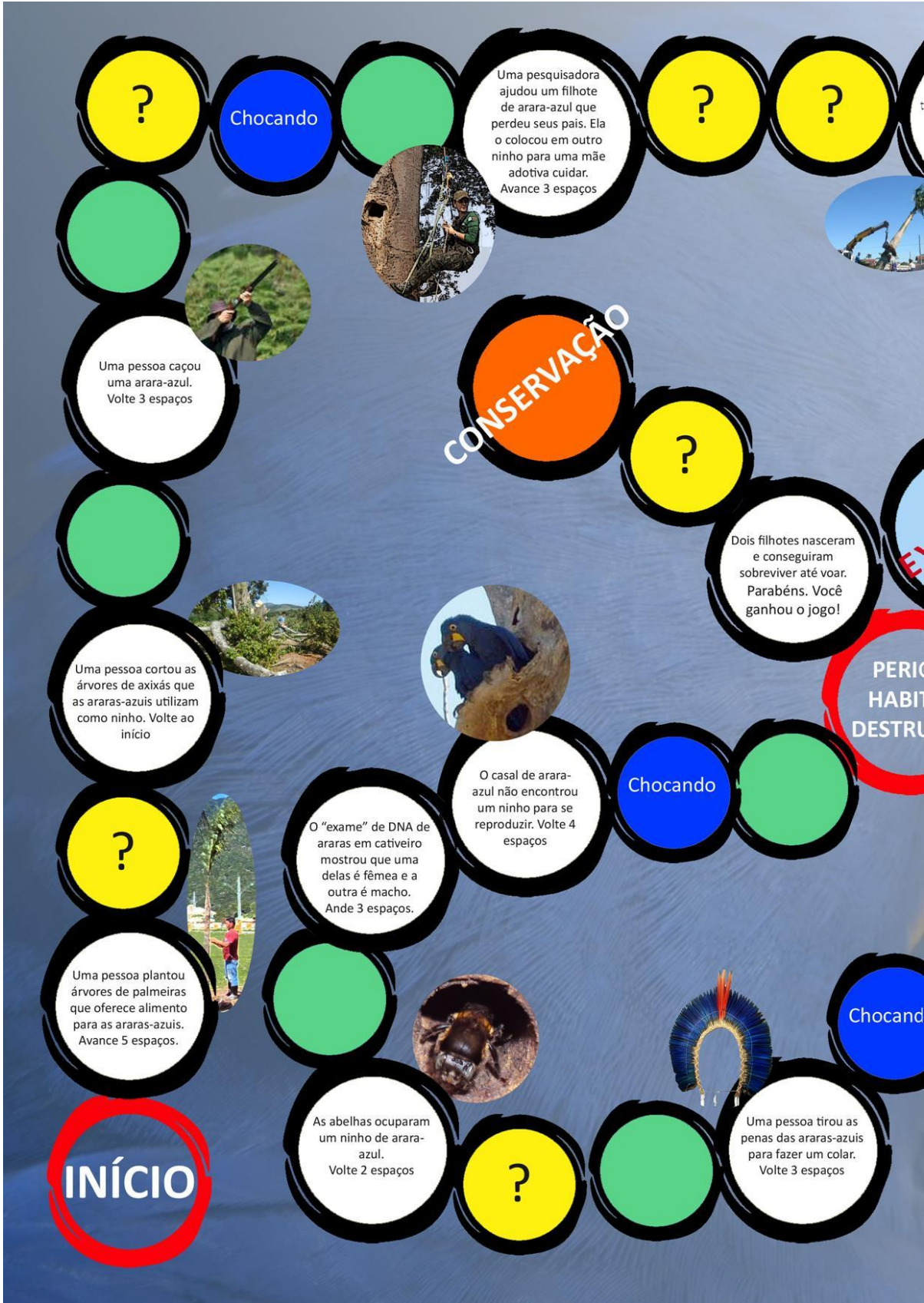
Registro da Amostra	Localidade	Estado	Data da coleta	Coletor
578	Região de Peixes e Estreito – Talismã	TO	15/10/2012	Thiago Junqueira e Ricardo
579	Região de Peixes e Estreito – Talismã	TO	15/10/2012	Thiago Junqueira e Ricardo
Estreito	Região de Peixes e Estreito – Talismã	TO	15/10/2012	Thiago Junqueira e Ricardo
787	Região de Peixes e Estreito – Curralinho	TO	16/10/2012	Thiago Junqueira e Ricardo
N13	Região de Peixes e Estreito – Curralinho	TO	16/10/2012	Thiago Junqueira e Ricardo
790	Região de Peixes e Estreito – Cipó I	TO	16/10/2012	Thiago Junqueira e Ricardo
792	Região de Peixes e Estreito – Cipó II	TO	16/10/2012	Thiago Junqueira e Ricardo
791	Região de Peixes e Estreito – Indaia	TO	18/10/2012	Thiago Junqueira e Ricardo
784	Região de Peixes e Estreito – Ilhota	TO	18/10/2012	Thiago Junqueira e Ricardo
793	Região de Peixes e Estreito – Vista do Lago	TO	18/10/2012	Thiago Junqueira e Ricardo
783	Região de Peixes e Estreito – São Miguel	TO	18/10/2012	Thiago Junqueira e Ricardo
913	Região de Peixes e Estreito – São Miguel	TO	18/10/2012	Thiago Junqueira e Ricardo
2989		PI		Paulo Martuscelli e Carlos Yamashita
2990		PI		Paulo Martuscelli e Carlos Yamashita
2992		PI		Paulo Martuscelli e Carlos Yamashita
2993		PI		Paulo Martuscelli e Carlos Yamashita
2994		PI		Paulo Martuscelli e Carlos Yamashita
15296	Região de Peixes	TO		Neiva Guedes e Tiago Junqueira
15297	Região de Peixes	TO		Neiva Guedes e Tiago Junqueira
15298	Região de Peixes	TO		Neiva Guedes e Tiago Junqueira
15299	Região de Peixes	TO		Neiva Guedes e Tiago Junqueira
15300	Região de Peixes	TO		Neiva Guedes e Tiago Junqueira

15301	Região de Peixes	TO		Neiva Guedes e Tiago Junqueira
15302	Região de Peixes	TO		Neiva Guedes e Tiago Junqueira
15303	Região de Peixes	TO		Neiva Guedes e Tiago Junqueira
5256	Região de Ponte Alta	TO		Funcionários do Zoológico de Brasília
11447	Canaã dos Carajás	PA	10/11/2007	Flávia Torres Presti e Adriana Marques
11448	Canaã dos Carajás	PA	10/11/2007	Flávia Torres Presti e Adriana Marques
11449	Canaã dos Carajás	PA	11/11/2007	Flávia Torres Presti e Adriana Marques
11450	Canaã dos Carajás	PA	12/11/2007	Flávia Torres Presti e Adriana Marques
11950	Canaã dos Carajás	PA	09/10/2008	Flávia Torres Presti
11952	Canaã dos Carajás	PA	14/10/2008	Flávia Torres Presti
11953	Canaã dos Carajás	PA	16/10/2008	Flávia Torres Presti
11954	Canaã dos Carajás	PA	18/10/2008	Flávia Torres Presti
11955	Canaã dos Carajás	PA	18/10/2008	Flávia Torres Presti
11956	Canaã dos Carajás	PA	18/10/2008	Flávia Torres Presti
11957	Canaã dos Carajás	PA	26/10/2008	Flávia Torres Presti
11958	Canaã dos Carajás	PA	02/11/2008	Flávia Torres Presti
11959	Canaã dos Carajás	PA	02/11/2008	Flávia Torres Presti
11452	Canaã dos Carajás	PA	14/11/2007	Flávia Torres Presti e Adriana Marques
11455	Zoobotânico Carajás	PA	19/11/2007	Flávia Torres Presti e Adriana Marques
11456	Zoobotânico Carajás	PA	19/11/2007	Flávia Torres Presti e Adriana Marques
LGA1	Zoobotânico Carajás	PA	14/10/2013	Grace F. Silva e Helder E. Silva
LGA2	Zoobotânico Carajás	PA	14/10/2013	Grace F. Silva e Helder E. Silva
LGA3	Zoobotânico Carajás	PA	14/10/2013	Grace F. Silva e Helder E. Silva
LGA4	Zoobotânico Carajás	PA	14/10/2013	Grace F. Silva e Helder E. Silva
LGA5	Zoobotânico Carajás	PA	14/10/2013	Grace F. Silva e Helder E. Silva
LGA9	Zoobotânico Carajás	PA	14/10/2013	Grace F. Silva e Helder E. Silva
LGA10	Zoobotânico Carajás	PA	14/10/2013	Grace F. Silva e Helder E. Silva
5283	RPRN do SESC Pantanal	MT		Paulo Antas

5286	RPRN do SESC Pantanal	MT		Paulo Antas
5288	RPRN do SESC Pantanal	MT		Paulo Antas
5290	RPRN do SESC Pantanal	MT		Paulo Antas
5291	RPRN do SESC Pantanal	MT		Paulo Antas
5292	RPRN do SESC Pantanal	MT		Paulo Antas
5297	RPRN do SESC Pantanal	MT		Paulo Antas
5519	RPRN - Pantanal - Barão de Melgaço	MT		Paulo Antas
12883	Barão do Melgaço - Perigara	MT	10/12/2012	Projeto Arara-azul
12884	Barão do Melgaço - Perigara	MT	12/12/2012	Projeto Arara-azul
12885	Barão do Melgaço - Perigara	MT	14/12/2012	Projeto Arara-azul
12886	Barão do Melgaço - Perigara	MT	14/12/2012	Projeto Arara-azul
12887	Barão do Melgaço - Perigara	MT	10/12/2012	Projeto Arara-azul
12888	Barão do Melgaço - Perigara	MT	12/12/2012	Projeto Arara-azul
12889	Barão do Melgaço - Perigara	MT	12/12/2012	Projeto Arara-azul
15304	Fazendo São Francisco do Perigara/Pantanal	MT	03/12/2011	Grace Ferreira da Silva
15306	Fazendo São Francisco do Perigara/Pantanal	MT	03/12/2011	Grace Ferreira da Silva
15307	Fazendo São Francisco do Perigara/Pantanal	MT	03/12/2011	Grace Ferreira da Silva
15308	Fazendo São Francisco do Perigara/Pantanal	MT	03/12/2011	Grace Ferreira da Silva
15309	Fazendo São Francisco do Perigara/Pantanal	MT	03/12/2011	Grace Ferreira da Silva
15311	Fazendo São Francisco do Perigara/Pantanal	MT	03/12/2011	Grace Ferreira da Silva
15312	Fazendo São Francisco do Perigara/Pantanal	MT	03/12/2011	Grace Ferreira da Silva
15260	Fazenda Caiman e região – Miranda	MS	14/12/2011	Neiva Guedes e Carlos César Corrêa
15261	Fazenda Caiman e região – Miranda	MS	14/12/2011	Neiva Guedes e Carlos César Corrêa
15263	Fazenda Caiman e região – Miranda	MS	14/12/2011	Neiva Guedes e Carlos César Corrêa
15266	Fazenda Caiman e região – Miranda	MS	15/12/2011	Neiva Guedes e Carlos César Corrêa
15268	Fazenda Caiman e região – Miranda	MS	15/12/2011	Neiva Guedes e Carlos César Corrêa
15269	Fazenda Caiman e região – Miranda	MS	15/12/2011	Neiva Guedes e Carlos César Corrêa

15270	Fazenda Caiman e região – Miranda	MS	01/11/2011	Neiva Guedes e Carlos Cézar Corrêa
15273	Fazenda Caiman e região – Miranda	MS	25/11/2011	Neiva Guedes e Carlos Cézar Corrêa
15274	Fazenda Caiman e região – Miranda	MS	25/11/2011	Neiva Guedes e Carlos Cézar Corrêa
15275	Fazenda Caiman e região – Miranda	MS	25/11/2011	Neiva Guedes e Carlos Cézar Corrêa
15276	Fazenda Caiman e região – Miranda	MS	25/11/2011	Neiva Guedes e Carlos Cézar Corrêa
15277	Fazenda Caiman e região – Miranda	MS	26/11/2011	Neiva Guedes e Carlos Cézar Corrêa
15278	Fazenda Caiman e região – Miranda	MS	16/12/2011	Neiva Guedes e Carlos Cézar Corrêa
15280	Fazenda Caiman e região – Miranda	MS	16/12/2011	Neiva Guedes e Carlos Cézar Corrêa
15281	Fazenda Caiman e região – Miranda	MS	16/12/2011	Neiva Guedes e Carlos Cézar Corrêa
15282	Fazenda Caiman e região – Miranda	MS	16/12/2011	Neiva Guedes e Carlos Cézar Corrêa
15283	Fazenda Caiman e região – Miranda	MS	26/11/2011	Neiva Guedes e Carlos Cézar Corrêa
15288	Fazenda Caiman e região – Miranda	MS	26/11/2011	Neiva Guedes e Carlos Cézar Corrêa
15289	Fazenda Caiman e região – Miranda	MS	26/11/2011	Neiva Guedes e Carlos Cézar Corrêa
15290	Fazenda Caiman e região – Miranda	MS	13/01/2012	Neiva Guedes e Carlos Cézar Corrêa
15292	Fazenda Caiman e região – Miranda	MS	14/12/2011	Neiva Guedes e Carlos Cézar Corrêa
3287	Projeto Arara-azul	MS		Neiva Guedes
3290	Projeto Arara-azul	MS		Neiva Guedes
5108	Projeto Arara-azul/Nhecolândia	MS	2001-2002	
5334	Miranda	MS		
5337	Miranda	MS		
5338	Miranda	MS		
5343	Miranda	MS		
5345	Rio Negro	MS		

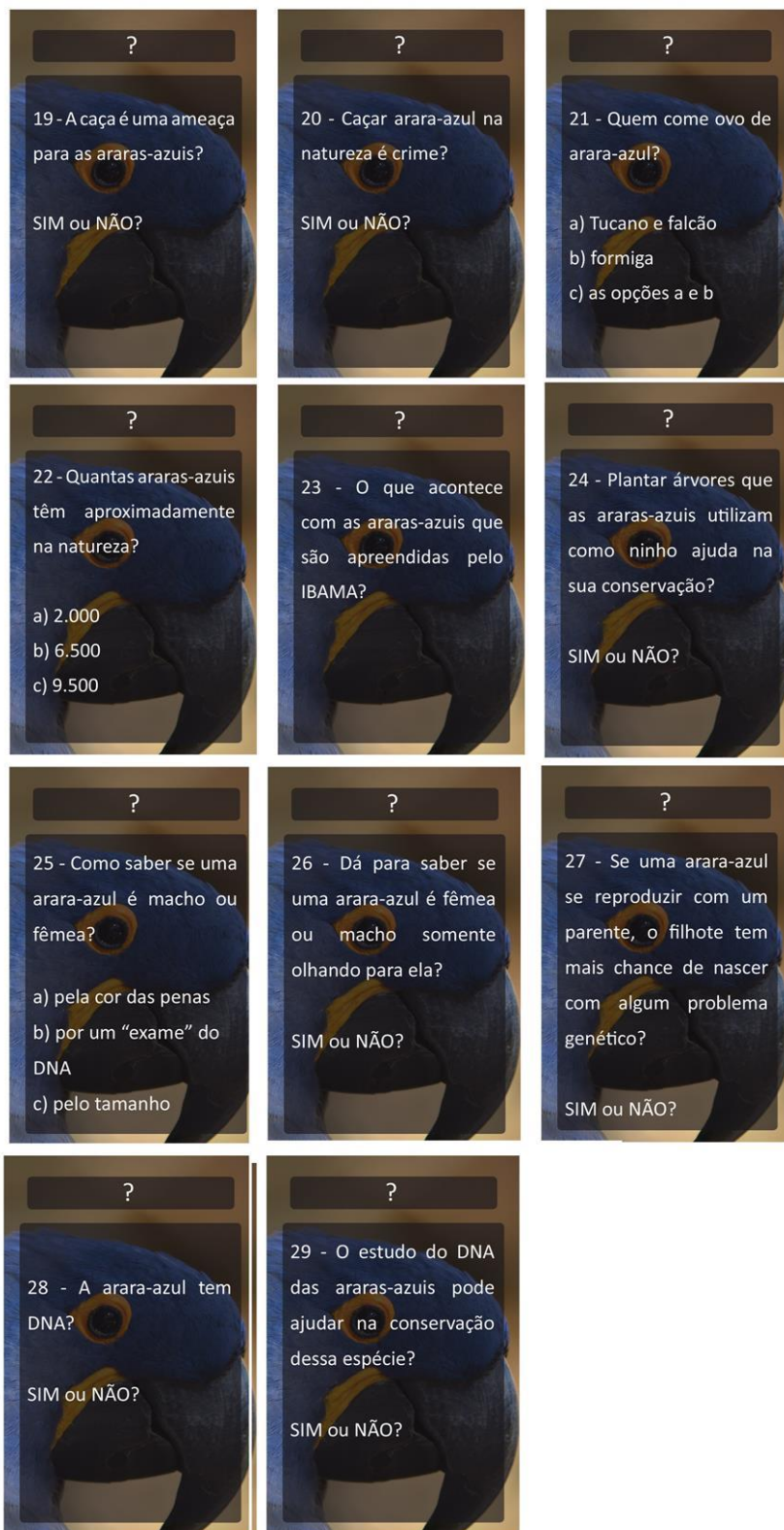
Anexo II. Tabuleiro do jogo “Conhecendo a arara-azul-grande”.





Anexo III. Cartas de múltipla escolha desenvolvidas para o jogo de tabuleiro “Conhecendo a arara-azul-grande”.





Anexo IV. Questionário Inicial.**QUESTIONÁRIO**

Você conhece a arara-azul-grande?

() Sim Não ()

Se sim, como ela é? _____

Você já viu uma arara-azul-grande?

() Sim Não ()

Se sim, onde a viu? _____

Quais das aves abaixo são classificadas como psitacídeos?

- () araras, galinhas e tucanos
- () araras, papagaios e periquitos
- () galinhas, papagaios e tucanos
- () araras, galinhas e periquitos

Em quais regiões do Brasil a arara-azul-grande pode ser encontrada?

- () somente no Pará
- () somente no Pantanal
- () no Pará, no Nordeste do país e no Pantanal
- () em todo o Brasil

Qual é o principal alimento da arara-azul-grande?

- () frutos de palmeiras
- () frutos de palmeiras e outras árvores
- () insetos que ficam nas palmeiras
- () frutos e legumes

Em que árvore da região de Carajás a arara-azul-grande faz seu ninho?

- () coqueiro
- () axixá
- () qualquer árvore
- () castanheira do Pará

A arara-azul-grande é uma espécie atualmente ameaçada de extinção?

() Sim Não ()

Quais são os fatores que podem levar ao desaparecimento da arara-azul-grande?

- () destruição ambiental
- () caça para alimentação
- () caça para venda ilegal
- () todas as alternativas acima

É crime pegar araras-azuis-grandes na natureza?

() Sim Não ()

Anexo V. Questionário Final.**QUESTIONÁRIO**

Você mudaria alguma coisa no seu questionário?

Você conhece a arara-azul grande?

() Sim Não ()

Se sim, como ela é? _____

Você já viu uma arara-azul grande?

() Sim Não ()

Se sim, onde a viu? _____

Quais das aves abaixo são classificadas como psitacídeos?

- () araras, galinhas e tucanos
- () araras, papagaios e periquitos
- () galinhas, papagaios e tucanos
- () araras, galinhas e periquitos

Em quais regiões do Brasil a arara-azul grande pode ser encontrada?

- () somente no Pará
- () somente no Pantanal
- () no Pará, no Nordeste do país e no Pantanal
- () em todo o Brasil

Qual é o principal alimento da arara-azul- grande?

- () frutos de palmeiras
- () frutos de palmeiras e outras árvores
- () insetos que ficam nas palmeiras
- () frutos e legumes

Em que árvore da região de Carajás a arara-azul-grande faz seu ninho?

- () coqueiro
- () axixá
- () qualquer Árvore
- () castanheira do Pará

A arara-azul-grande é uma espécie atualmente ameaçada de extinção?

() Sim Não ()

Quais são os fatores que podem levar ao desaparecimento da arara-azul-grande?

- () destruição ambiental
- () caça para alimentação
- () caça para venda ilegal
- () todas as alternativas acima

É crime pegar araras-azuis-grandes na natureza?

() Sim Não ()

O que você acha que nós poderíamos fazer para proteger as araras-azuis grandes?

Em relação às atividades sobre a arara-azul grande, indique abaixo o que você achou sobre cada item.

Palestra	☐ Ruim	☐ Regular	☐ Bom	☐ Ótimo
Jogo de tabuleiro	☐ Ruim	☐ Regular	☐ Bom	☐ Ótimo
Monitores	☐ Ruim	☐ Regular	☐ Bom	☐ Ótimo
Assunto abordado	☐ Ruim	☐ Regular	☐ Bom	☐ Ótimo

Você gostou de aprender sobre a arara-azul-grande?

Faça críticas sobre as atividades realizadas e dê sugestões para as próximas atividades relacionadas à arara-azul-grande.

Anexo VI. Cartilha “Muito prazer, eu sou a Arara-azul”.