

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**INFLUÊNCIAS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NO
COMPORTAMENTO E NÍVEL DE CORTISOL EM FELÍDEOS
SILVESTRES**

LETÍCIA SIMÕES DE CASTRO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

PUBLICAÇÃO: 013/09

BRASÍLIA/DF

NOVEMBRO/2009

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**INFLUÊNCIAS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NO
COMPORTAMENTO E NÍVEL DE CORTISOL EM FELÍDEOS
SILVESTRES**

LETÍCIA SIMÕES DE CASTRO

ORIENTADOR: YVONNICK VICTOR LE PENDU

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 013/09

BRASÍLIA/DF

NOVEMBRO/2009

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

CASTRO, L. S. Influências do enriquecimento ambiental no comportamento e nível de cortisol em felídeos silvestres. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 110p. Dissertação de Mestrado

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citadas as fontes.

FICHA CATALOGRÁFICA

Castro, Letícia Simões de

Influências do enriquecimento ambiental no comportamento e nível de cortisol em felídeos silvestres. / Letícia Simões de Castro orientação de Yvonnick Victor Le Pendu – Brasília, 2009. 110p.:il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2009.

1. Comportamento Estereotipado 2. Estresse 3. Bem Estar 4. Cativoiro.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**INFLUÊNCIAS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NO
COMPORTAMENTO E NÍVEL DE CORTISOL EM FELÍDEOS SILVESTRES**

LETÍCIA SIMÕES DE CASTRO

DISSERTAÇÃO DE MESTADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL

APROVADA POR:

**YVONNICK VICTOR LE PENDU, Dr (Universidade Estadual de Santa Cruz)
(ORIENTADOR)**

**GIANE REGINA PALUDO, Dra (Universidade de Brasília)
(EXAMINADOR INTERNO)**

**DIVA ANELIE GUIMARÃES, Dra (Universidade Federal do Pará)
(EXAMINADOR EXTERNO)**

BRASÍLIA/DF, 30 de NOVEMBRO de 2009

AGRADECIMENTOS

Ao professor Yvonnick Le Pendu por ter aceitado ser meu orientador e por todo o tempo de dedicação na orientação da minha dissertação.

Às professoras participantes da banca, Giane Regina Paludo e Diva Guimarães, por terem aceitado participarem da banca e pelas correções da minha dissertação.

À Rosana Moraes, que realizou as análises hormonais das amostras que coletei durante o experimento.

Ao professor e coordenador do curso de pós-graduação de Saúde Animal, Vitor Gonçalves, que me orientou em todo o processo de troca de orientação e com isso me estimulou a continuar no curso de mestrado.

À secretária do curso de pós-graduação, Kelly Cristina dos Reis, que me ajudou a resolver questões burocráticas enquanto eu estava longe da UnB.

Aos professores Romari Martinez e Carlos Priminho, que alojaram as amostras antes de serem processadas e cederam o laboratório para ser feita a liofilização das amostras.

Ao Tadeu Oliveira, que dispôs os animais do projeto Gato do Mato para eu realizar o experimento do mestrado.

Ao tratador do projeto Gato do Mato, Valmir, que foi “mão para toda obra”, me ajudando a conseguir o que precisasse para a realização do experimento.

Ao CETAS – IBAMA, que disponibilizaram um local para eu me alojar enquanto eu realizava a parte experimental do meu projeto de mestrado. E aos profissionais que trabalham lá e me receberam super bem.

À Ana Chilling, que me orientou nas questões de estatística.

À estudante Samara Rinco de Granta, que me ajudou durante o experimento, inclusive com algumas fotos.

Ao Gustavo, meu esposo, que me deu todo apoio durante esta louca e difícil jornada.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
REFERÊNCIAL TEÓRICO	3
○ Pequenos gatos selvagens neotropicais: pesquisa, manejo e conservação.....	3
○ Estresse e bem-estar animal: estudos fisiológicos e aplicação para animais selvagens	5
○ Comportamentos estereotipados	8
○ Observações comportamentais e avaliação dos níveis de cortisol	12
○ Enriquecimento ambiental	15
OBJETIVOS	17
○ Objetivo geral	17
○ Objetivos específicos	17
REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO II.....	27
INFLUÊNCIAS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NO COMPORTAMENTO E NÍVEL DE CORTISOL EM FELÍDEOS SILVESTRES.....	27
○ Introdução.....	27
MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
○ Análises de comportamento	30
○ Tratamentos	36
○ Coleta de dados comportamentais	43
○ Coleta de amostras fecais	45
○ Conservação e processamento das amostras	45

○ Extração e dosagem hormonal.....	46
○ Análise estatística dos dados	47
RESULTADOS.....	49
○ Duração total dos comportamentos da categoria estresse nas três fases do experimento	51
○ Comportamento lúdico “brincar”	53
○ Tempo de interação com cada enriquecimento	55
○ Variação da concentração de corticóides nas três fases do experimento (antes, durante e após o enriquecimento).....	55
○ Correlação dos níveis basais e picos das concentrações de corticóides com os comportamentos relacionados ao estresse, à alimentação e à brincar nas três fases do experimento	62
DISCUSSÃO.....	63
CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	82
CAPÍTULO III.....	91
CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
APÊNDICE I	93
APÊNDICE II	97

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1. Lista dos indivíduos estudados com o código, por espécie, sexo e categoria etária.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabela 2. Introdução de enriquecimentos por semana durante a fase de enriquecimento</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 3. Definição das categorias comportamentais e o número de comportamentos em cada categoria</i>	<i>44</i>
<i>Tabela 4. Comportamentos da categoria estresse com suas durações relativas (%) em cada fase.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabela 5. Média (\pm desvio padrão) e coeficiente de variação das concentrações de corticóides fecais de cada indivíduo nas três fases do experimento.</i>	<i>56</i>
<i>Tabela 6. Média do nível basal e pico das concentrações de metabólitos de corticóides fecais (ng/g de fezes) de cada espécie (L. pardalis, L. wiedii e L. tigrinus) e de cada indivíduo, em cada fase do experimento.</i>	<i>57</i>
<i>Tabela 7. Número de amostras representadas por picos e níveis basais das concentrações de metabólitos de corticóides fecais em cada espécie estudada (L. pardalis, L. wiedii e L. tigrinus), em cada fase do experimento.</i>	<i>58</i>

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Foto de L. pardalis</i>	33
<i>Figura 2. Foto de L. wiedii</i>	33
<i>Figura 3. Foto de L. tigrinus</i>	34
<i>Figura 4. Centro de reabilitação</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Figura 5. Planta baixa do Centro de reabilitação de pequenos felídeos do CETAS de São Luis, Brasil. 1. Cambiamento; 2. Área do recinto maior; 3. Área de entrada do recinto (separada da área 2 pela porta 9 somente quando realizado algum manejo no cambiamto); 4. Porta de roldana de acesso ao cambiamto para os animais; 5. Parede de contato dos animais com o meio externo através de gradeado; 6. Divisão entre recintos com gradeado duplo com bambu ou madeira; 7. Portão principal de acesso ao Centro; 8. Porta principal do recinto; 9. Porta para prender o animal na área maior do recinto enquanto realizado qualquer manejo do cambiamto; 10. Porta de acesso do tratador ao cambiamto. Os códigos (ex: PO1) correspondem ao código do animal informado na tabela 1.</i>	35
<i>Figura 6. Recinto na primeira fase</i>	39
<i>Figura 7. Recinto na segunda fase</i>	39
<i>Figura 8. Foto dos enriquecimentos galhos e folhagens no recinto de L. wiedii</i>	40
<i>Figura 9. L. pardalis escalando para pegar frango embrulhado no jornal</i>	40
<i>Figura 10. Foto do recinto de L. tigrinus com os enriquecimentos: tronco, garrafa plástica e galhos</i>	41
<i>Figura 11. Foto do enriquecimento folha de bananeira preso no portão (barreira física) (Fonte: S. Granta, 2008)</i>	41
<i>Figura 12. Foto do enriquecimento canela em pau (Fonte: S. Granta, 2008)</i>	42
<i>Figura 13. Foto do enriquecimento frango embrulhado (Fonte: S. Granta, 2008)</i>	42
<i>Figura 14. Foto de L. pardalis brincando com a bóia (Fonte: S. Granta, 2008)</i>	43
<i>Figura 15. Duração relativa dos comportamentos da categoria estresse expressada por indivíduo (n = 12) em cada fase do experimento (P = L. pardalis, T = L. tigrinus, W = L. wiedii).</i>	51

- Figura 16. Box-plot das durações relativas (%) com mediana e quartis dos comportamentos da categoria estresse dos indivíduos ($n = 12$) nas três fases do experimento. * ($p < 0.05$). 52
- Figura 17. Duração relativa dos comportamentos da categoria estresse entre as fases. 53
- Figura 18. Duração relativa média do comportamento “brincar” nas três fases do experimento. 54
- Figura 19. Concentração de corticóides fecais em fêmeas de *L. pardalis* (2 e 3 adultas e 7 jovem), alojados em recintos individuais durante as fases do experimento realizado no Centro de reabilitação de pequenos felídeos. Pontos laranja no gráfico representam os picos de cada fase do experimento. 58
- Figura 20. Concentração de corticóides fecais em machos adultos de *L. pardalis* (1, 4 e 5), alojados em recintos individuais durante as fases do experimento realizado no Centro de reabilitação de pequenos felídeos. Ponto laranja no gráfico representa o pico ocorrido durante o experimento. 59
- Figura 21. Concentração de corticóide fecal em um macho adulto de *L. wiedii* (8), alojado em recinto individual durante as fases do experimento realizado no Centro de reabilitação de pequenos felídeos. Pontos laranja no gráfico representam os picos ocorridos em cada fase do experimento. 60
- Figura 22. Concentração de corticóides fecais em duas fêmeas adultas de *L. tigrinus* (9 e 13), alojadas em recintos individuais durante as fases do experimento realizado no Centro de reabilitação de pequenos felídeos. 61
- Figura 23. Concentração de corticóides fecais em três machos adultos de *L. tigrinus* (10, 11 e 12), alojados em recintos individuais durante as fases do experimento realizado no Centro de reabilitação de pequenos felídeos. Pontos laranja no gráfico representam os picos ocorridos em cada fase do experimento. 61

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as diferentes condições de cativeiro e seus efeitos no comportamento e fisiologia relacionados ao estresse em três espécies de felídeos pequenos: jaguatirica (*Leopardus pardalis*; n = 6), gato maracajá (*Leopardus wiedii*; n = 1) e gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*; n = 5). Os indivíduos estavam alojados em recintos individuais, e foram testados em três fases: Fase I – recinto vazio por 14 dias; Fase II – recinto enriquecido por 21 dias (diferentes tipos de enriquecimento foram utilizados ao mesmo tempo em cada recinto); Fase III – recinto vazio por nove dias. Amostras fecais foram coletadas semanalmente durante o estudo (de uma à três amostras) para análises de metabólitos de corticóides. Observações comportamentais foram realizadas durante aproximadamente 44h por cada indivíduo. A duração dos comportamentos relacionados a categoria de estresse foi significativamente menor ($p < 0,05$) na fase II quando comparado com a fase I, principalmente os comportamentos *pacng* e coçar-se. Não houve diferença significativa dos níveis de corticóides entre as fases, mas diferenças inter-individuais foram detectadas. Ademais, os indivíduos interagiram mais com os enriquecimentos de vegetação e alimentar. Foram encontradas correlações significativas tanto positivas quanto negativas ($p < 0,05$) entre os níveis de corticóides e alguns comportamentos relacionados a estresse. Os resultados indicam que os enriquecimentos em recintos de felídeos durante um curto período alteram o comportamento dos indivíduos, propiciando um aumento geral do bem-estar. Porém, uma mudança fisiológica necessitaria provavelmente uma exposição a enriquecimentos durante um período mais longo.

Palavras-chave: comportamento estereotipado, estresse, bem estar, cativeiro

ABSTRACT

The main goal of this study was to evaluate the different captive conditions and their effect on the behaviour and physiology related to stress in three wild cats species, ocelot (*Leopardus pardalis*; n = 6), margay (*Leopardus wiedii*; n = 1) and tigrina (*Leopardus tigrinus*; n = 5). The individuals were housed as singleton, and they were tested in three phases: phase I – empty enclosure for 14 days; phase II – enriched enclosure for 21 days (different kinds of enrichment were used in the same time in every enclosure); phase III – empty enclosure for nine days. Faecal samples were collected weekly throughout the study (one or two samples) to analyse corticoid metabolites. About forty four hours of Behaviour observations were conducted on each individual. The duration of some behaviours related to stress, mainly pacing and self-directed scratching, was significantly shorter during the enrichment phase when compared to phase I ($p < 0.05$). The levels of corticoid metabolites did not vary significant among phases, but inter-individual differences were detected. The individuals interacted more with vegetation and feeding enrichments than with others. The corticoid metabolites level was correlated with some stress behaviours. Overall results show that a short period of enrichment can alter the behaviour of enclosed wild cats, indicating enhanced welfare. However, a long-term physiological change would probably need a longer exposure to an enriched environment.

Key-words: stereotypic behaviour, stress, welfare, captivity

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Os felídeos, como topo de cadeia trófica, têm uma grande importância no meio ambiente e equilíbrio ecológico, atuando no controle das populações de presas. Com a perda de habitat e grandes fragmentações das matas, populações de felinos neotropicais estão ameaçadas de extinção (Primack e Rodrigues, 2002; Valladares-Padua et al, 2003).

O cativeiro propicia a realização de pesquisas em condições controladas, oferecendo a oportunidade do estudo sobre a biologia das espécies animais, com abordagens que não são viáveis em ambiente natural. Entretanto, um grande problema enfrentado por animais cativos é o estresse, com conseqüências negativas para os animais quando ocorre de forma crônica.

Algumas causas possíveis do nível elevado de estresse em animais silvestres cativos seriam as condições do cativeiro, como o tamanho do recinto inapropriado, a falta de enriquecimento (Mallapur e Chellam, 2002), o contato visual, olfativo e

auditivo com predadores (Carlstead et al., 1993), quantidade grande de indivíduos no recinto (de Rouck et al, 2005) e qualidade baixa da barreira visual entre animal com visitantes (Margulis et al, 2003).

Através do enriquecimento ambiental, os animais podem se estimular a expressarem comportamentos naturais e típicos da espécie (Rabin, 2003). Alguns estudos com felídeos já foram realizados aumentando a complexidade do ambiente com alguns substratos como troncos (Powell, 1995) e galhos (Moreira et al., 2007), alimentos inteiros (carcaças) (McPhee, 2002) presas vivas (Bashaw et al., 2003), ossos (Bashaw et al., 2003; Skibieli et al., 2007), alimento congelado (peixe) (Powell, 1995; Skibieli et al, 2007), odores (Powell, 1995; Wells e Egli, 2004; Skibieli et al., 2007) e locais de esconderijo (Moreira et al., 2007). Esses elementos visam estimular os animais a forragear, investigar, caçar, esconderem-se quando não quiserem ser vistos, enfim, estimular a expressão de comportamentos mais próximos aos que apresentariam em ambiente natural (Swaisgood e Shepherdson, 2005).

Geralmente os estudos com complexidade ambiental utilizam o método de oferecer um enriquecimento de cada vez ou um enriquecimento diferente para cada indivíduo. Porém, uma metodologia que ainda não tem sido muito explorada é o oferecimento de diversos tipos de enriquecedores simultaneamente. Alguns autores têm aconselhado a realização de mais estudos com este método a fim de entender melhor a função e eficácia desta estratégia de enriquecimento ambiental, que é utilizada rotineiramente por zoológicos a fim de promover maior bem-estar dos animais em cativeiro (Boinski et al., 1999; Swaisgood e Shepherdson, 2005; Skibieli et al., 2007).

Através das análises concomitantes dos dados comportamentais e fisiológicos de um indivíduo em situação de estresse é possível verificar problemas decorrentes das condições de cativeiro do animal, como comportamentos estereotipados e níveis elevados de corticóides, e testar soluções para estes problemas. Por exemplo, é possível avaliar a eficiência de oferecer vários enriquecimentos ao mesmo tempo.

Estas informações são úteis tanto para melhorar o bem estar dos animais em cativeiro quanto para a conservação das espécies de felídeos de maneira geral (Goymann et al., 1999).

REFERÊNCIAL TEÓRICO

- Pequenos gatos selvagens neotropicais: pesquisa, manejo e conservação

Felídeos têm um papel predominante no controle do tamanho das populações de presas, sendo importantes para o ecossistema (Terborgh et al, 2001). A redução da densidade populacional de carnívoros no topo da cadeia trófica pode afetar o ecossistema inteiro e o equilíbrio ecológico (Vidolin et al., 2003). Estes animais são também considerados espécies-chave ou espécie-guarda-chuva (Schonewald-Cox et al., 1991). De acordo com Garibaldi e Turner (2004), espécie-chave é aquela que enriquece o funcionamento do ecossistema de um modo singular e significativo, sendo que sua diminuição pode induzir modificação na estrutura do ecossistema e perda da biodiversidade, alterando todos os níveis tróficos, de modo direto ou indireto. Segundo Indrusiak e Eizirik (2003), espécies-guarda-chuva são utilizadas por conservacionistas e pesquisadores para especificar o tamanho e o tipo de habitat para ser protegido a fim de conservar outras espécies animais. São espécies que utilizam tipos de habitats grandes e diversos, assim protegendo seus territórios englobam-se outras espécies que utilizam áreas de vida menores e qualquer tipo de habitat dentro da diversidade utilizada por espécies-guarda-chuva.

Leopardus pardalis tem porte médio, com cabeça e patas grandes e cauda relativamente curta, caracterizada pela presença de rosetas abertas que se unem, formando bandas longitudinais, e pelagem amarelo-ocráceo. O comprimento médio do corpo é de 67 e 101,5 cm; enquanto o da cauda é de 30 a 44,5 cm; e o peso entre 8 e 15,1 kg. Habita todos os biomas brasileiros com maior ocorrência em áreas de floresta bem preservadas (Oliveira e Bianchi, 2008).

Leopardus tigrinus é a menor espécie de felino encontrada no Brasil. O tamanho médio do corpo é de 40 a 50,9 cm; a cauda é de 20,4 a 32 cm; enquanto o peso médio varia entre 1,5 a 3,5 kg. A coloração de fundo varia entre o amarelo-claro e o castanho-amarelado. As numerosas rosetas são pequenas e abertas, com tamanho e forma variados (Oliveira e Cassaro, 2005). Habita o Cerrado, Caatinga e Pantanal. Incluindo áreas antropizadas (Oliveira, 2008).

Leopardus wiedii é um felino de pequeno porte, com peso de 2,3 a 4,9 kg, comprimento total do corpo variando entre 46 a 62 cm e uma cauda bastante longa de 30 a 48,3 cm. Rosetas são grandes, arredondadas, completas e bem espaçadas (Oliveira, 1998; Oliveira e Cassaro, 2005). Ocorre em regiões de Cerrado e no Pantanal, incluindo áreas antropizadas, bem como na Amazônia, Mata Atlântica e áreas de mata em regiões da Caatinga (Oliveira, 2008).

De acordo com a classificação da condição ecológica de vulnerabilidade à extinção das espécies na lista vermelha da IUCN – União Internacional para a Conservação da e Recursos Naturais (2009), as espécies de gatos selvagens deste estudo se enquadram nas seguintes categorias: *L. tigrinus* e *L. pardalis* estão na categoria de vulnerável à extinção, e *L. wiedii* está na categoria de quase ameaçado. Na classificação do IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (2007) e do livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção do Ministério do Meio Ambiente (MMA) (Machado et al., 2008), *L. pardalis*, *L. tigrinus* e *L. wiedii* foram classificados na categoria de vulnerável à extinção em território brasileiro.

Os fatores antropogênicos são considerados a principal ameaça para a vida selvagem (Scott et al., 1999; Valladares-Pádua et al., 2003): a destruição, extração e degradação de recursos ambientais, o tráfego de veículos e a caça (Scott et al., 1999) são as principais causas do declínio das populações naturais de carnívoros.

Essas espécies são mais afetadas por atividades humanas do que outras devido a sua posição no topo da cadeia trófica. Carnívoros são afetados diretamente por conflitos relacionados a animais de produção, levando a sua perseguição (Woodroffe, 2000; Palmeira et al., 2008), e pela perda de habitat, com a substituição da vegetação natural por áreas de pastagem e agricultura diminuindo a disponibilidade de recursos alimentares (Palmeira et al., 2008). Os carnívoros são também afetados indiretamente pela diminuição das populações de presas (Rabinowitz e Walker, 1991) e a aceleração do crescimento populacional humano resultando, por exemplo, em um aumento dos atropelamentos (Cincotta et al., 2000).

Uma das importantes estratégias para evitar a extinção de espécies é a manutenção de indivíduos em cativeiro (conservação *ex-situ*), como zoológicos

(Primack e Rodrigues, 2002) e centros de reabilitação. O cativeiro propicia um ambiente que permite realizar pesquisas em condições controladas, oferecendo uma oportunidade de entender os fatores relacionados ao organismo das espécies animais com abordagens que não são viáveis em estudos em ambiente natural (Wielebnowski et al., 2002a). Por exemplo, o cativeiro permite estudar a fisiologia com um nível de detalhamento inacessível em meio natural, como no caso dos estudos com endocrinologia reprodutiva em felídeos. O acesso aos animais mantidos em zoológico permite comparar indivíduos em diferentes condições de cativeiro (Brown et al., 1994, 2001; Wildt et al., 1988). O resultado dessas pesquisas *ex-situ* pode ter relevância para atuais e futuros estudos *in-situ* (Wielebnowski et al., 2002a; Jordan, 2005).

- Estresse e bem-estar animal: estudos fisiológicos e aplicação para animais selvagens

Moberg (2000) define estresse como uma resposta biológica ocorrendo quando um indivíduo percebe uma ameaça para a sua homeostase. Fontes de desequilíbrio homeostático são chamadas de estressores, sendo que estes podem ser físicos, como a mudança brusca de temperatura ou restrição física de movimentos, ou uma ameaça potencial à homeostase, como a proximidade de um animal dominante ou de um predador (Morgan e Tromborg, 2007). Portanto, o estresse pode ter um custo energético, metabólico e reprodutivo para o indivíduo (Engel, 1967; Barnett et al., 1984; Moberg, 2000).

Resposta às situações estressantes é uma parte normal na vida de todos os animais, revelada pela atividade elevada do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e do sistema simpático-adrenomedular (Goymann et al., 1999), resultando na liberação dos glicocorticóides (Goymann et al., 1999; Mostl e Palme, 2002; Sapolsky, 2003). Em curto prazo, situações adversas produzem respostas adaptativas para eventos potencialmente ameaçadores da vida, como por exemplo, o aparecimento de um predador (Hennessy et al, 1979; Sapolsky, 2003). Entretanto, em um prazo longo situações adversas, como no caso de situações onde animais sofrem subordinação social persistente ou sob condições ambientais adversas às suas necessidades comportamentais, podem resultar em uma resposta mal-

adaptativa levando a uma condição biológica de estresse crônico, causando efeitos prejudiciais, ou seja, um **distresse** (Sapolsky, 1996; de Kloet et al., 2005).

Denomina-se distresse quando o indivíduo se expõe a uma situação onde há um custo biológico tão grande que este necessita desviar recursos energéticos das funções biológicas normais para enfrentar o estressor (Moberg, 2000). Este desvio de recursos é o que causa os efeitos adversos do estresse, como falha na reprodução, aumento da suscetibilidade a doenças e baixa capacidade de adaptação ao cativeiro (Fox et al., 2006).

Gatos pequenos neotropicais dificilmente se reproduzem em cativeiro (Swanson et al., 2003, Moreira et al., 2007). Uma provável causa do baixo índice reprodutivo é a alta suscetibilidade ao estresse devido a manejo e condições do cativeiro inapropriadas (Carlstead et al., 1992; Swanson et al., 2003; Moreira et al., 2007). Um grande problema decorrente da criação de animais silvestres em cativeiro são as condições adversas àquelas encontradas pelos animais em ambiente natural, que podem causar danos tanto à fisiologia quanto ao comportamento dos animais (Lindburg e Fitch-Snyder, 1994).

Condições precárias de cativeiro podem causar estresse que conseqüentemente compromete a capacidade de adaptação, de sobrevivência ou de uma vida com condições minimamente aceitáveis de bem-estar (Moreira *et al.*, 2007). Deficiências podem ser vistas no forrageamento, caça, interações sociais, habilidade de locomoção (Snyder et al., 1996; van Heezik e Ostrowski, 2001; Stoinski et al., 2003) e reprodução (Mellen, 1991; Lindburg e Fitch-Snyder, 1994; Moberg, 2000; Shepherdson et al., 2004). Depressão imunológica também ocorre nos animais nascidos em cativeiro para a prevalência de doenças que ocorrem no ambiente natural (Cunningham, 1996; Jasnow et al, 2001), e conseqüentemente aumentam potencialmente a transmissão de doenças, interações sinérgicas entre infecções e deficiências nutricionais para o animal (Scott, 1999; Moberg, 2000; Shepherdson et al., 2004).

Manejo de carnívoros em cativeiro tem oferecido a oportunidade aos conservacionistas de juntar informações científicas detalhadas sobre a biologia das espécies, para que sejam desenvolvidas estratégias visando minimizar o processo

de estresse (Young et al., 2004). Melhoria da saúde e bem estar de carnívoros requer a identificação das condições ambientais e práticas de manejo estressantes para os animais (Young et al., 2004). Estas informações são úteis tanto para conservação em meio natural quanto para bem estar dos animais em cativeiro (Goymann et al., 1999).

Utilizando uma combinação de medidas etológicas e fisiológicas relacionadas ao estresse, podemos evidenciar determinados problemas recorrentes dos animais em cativeiro, como comportamentos estereotipados, altos índices de cortisol e baixo índice reprodutivo (Wielebnowski et al, 2002b; Shepherdson et al., 2004).

Azevedo et al. (2007) revisaram 744 estudos sobre impacto do enriquecimento ambiental no bem estar animal publicados em revistas científicas. Relataram que 53,54% das pesquisas avaliando o efeito do enriquecimento ambiental no bem-estar animal estudaram alterações no comportamento. Pesquisas avaliando apenas alterações fisiológicas relacionadas a enriquecimento ambiental representam 35,10% das publicações, e apenas 2,8% das pesquisas avaliadas analisaram alterações comportamentais associadas a mudanças em parâmetros fisiológicos.

O cativeiro é uma situação limite de desafio às necessidades dos animais selvagens. Algumas causas possíveis do nível elevado de estresse dos animais mantidos em condições do cativeiro são o tamanho do recinto, a disposição tridimensional do ambiente, a falta ou o excesso de estímulos, a dieta, o manejo (Moreira et al., 2001; Mallapur e Chellam, 2002; Swanson et al., 2003; Brown, 2006), a exposição dos animais à luz artificial, ao barulho e a alguns odores, temperaturas e substratos desconfortáveis (Morgan e Tromborg, 2007). O contato visual, olfativo e auditivo com predadores ou espécies co-específicas (Carlstead et al., 1993; Moreira et al., 2001; Swanson et al., 2003; Brown, 2006), a quantidade de indivíduos no recinto (de Rouck et al, 2005) são outras causas possíveis de estresse. A qualidade do contato entre o animal e pessoas próximas ao recinto, como visitantes em zoológicos (Margulis et al, 2003) e tratadores responsáveis pela manutenção dos recintos (Moreira et al., 2001; Swanson et al., 2003; Brown, 2006) são fatores apontados como potenciais fontes de estresse.

Pesquisas com felídeos tendem a concentrar-se nos efeitos adversos do estresse de função física, mas não mencionam as conseqüências do estresse sobre os processos cognitivos (Mendl, 1999). Cognição é definida de maneira ampla como a capacidade do indivíduo assimilar informações sobre o meio ambiente em que se encontra (Toates, 2004). A facilitação dos processos cognitivos auxilia o indivíduo no controle sobre situações adversas por meio de respostas comportamentais adequadas (Toates, 2004). Debilitação do processo de memória é observada em função de altos níveis crônicos de circulação de glicocorticóide (de Kloet et al., 1999). Deficiências cognitivas podem ser apresentadas como diminuição de atenção ou memória, prejudicando a capacidade da tomada de decisão do indivíduo (Mendl, 1999).

- Comportamentos estereotipados

Comportamentos estereotipados são comportamentos atípicos e indesejáveis, considerados comportamentos repetitivos que não tem uma função imediata ou um objetivo claro (Mason, 1991). As estereotipias podem ser um dos indicativos comportamentais mais confiáveis de nível baixo do bem-estar animal (Boorer, 1972; Mason, 1991; Mason e Latham, 2004), consideradas como uma “cicatriz” de ambientes com condições inadequadas (Swaigood e Shepherdson, 2005).

Existe a hipótese que comportamentos estereotipados podem ter conseqüências positivas, reforçando seu desempenho. Evidências empíricas ligam estereotipias à diminuição da atenção aos eventos externos ou ambientes aversivos, reduzindo estresse ou ansiedade (Mason, 1991; Mason e Latham, 2004). Portanto, a realização de comportamentos estereotipados pode estar contribuindo para que os indivíduos que apresentam este tipo de comportamento tenham maior bem-estar do que os indivíduos que não realizam estereotipias em mesma condição ambiental (Swaigood e Shepherdson, 2005).

Por outro lado, comportamentos estereotipados não são oriundos de um processo de seleção natural, já que não ocorrem em meio natural, nem de seleção artificial, já que não ocorrem somente em animais domésticos. Como esses

comportamentos envolvem tempo e energia do animal, estereotipias podem ser patológicas (Mason, 1991).

Estudos que relacionaram o comportamento dos animais cativos às condições ambientais dos recintos, demonstrando que más condições ambientais favorecem a ocorrência de comportamentos anormais e estereotipados, como *pacing* (tipo de comportamento estereotipado, onde o animal anda o mesmo percurso dentro do recinto, repetidas vezes) (Wielebnowski et al., 2002a; de Rouck et al, 2005), lambe-se, morder-se excessivamente (Lyons et al., 1997; van den Bos, 1998), coçar-se, balançar a cabeça (van den Bos, 1998), reingerir, regurgitar alimento, coprofagia (Lyons et al., 1997), apatia, esconder-se ou automutilar-se (Wielebnowski et al., 2002a).

A diminuição da atividade em animais cativos geralmente é associada à apatia e baixo nível de bem-estar, entretanto esta informação deve ser interpretada com cautela e comparada a outros parâmetros de bem-estar, tais como aumento de comportamentos estereotipados e anormais, e níveis hormonais (Bassett et al., 2007). Frézard e Le Pape (2003), por exemplo, afirmam que lobos na natureza alocam grande parte do tempo para comportamentos de descanso, portanto alto nível de inatividade em cativeiro não indicaria necessariamente baixo nível de bem-estar.

Ambientes de cativeiro são invariavelmente menos complexos do que o ambiente natural dos animais. A baixa complexidade ambiental está associada à alta previsibilidade das situações, o que gera uma condição tediosa e estressante para os indivíduos (Wiepkema e Koolhaas, 1993; Bassett et al., 2007).

Estudos de comportamento e bem estar com mamíferos já foram realizados onde houveram relatos de comportamentos estereotipados.

Em um estudo realizado por Bashaw et al. (2001) 79,7% das girafas e okapis realizaram pelo menos um tipo de comportamento estereotipado, lambe objetos e *pacing* sendo os mais prevalentes dentre as estereotipias observadas.

Carlstead e Seidensticker (1991) observaram que *pacing* foi o comportamento estereotipado mais freqüente em ursos pretos americanos (*Ursus americanus*), e

freqüentemente realizado depois de se alimentar. Com o uso de odores de urso como enriquecimento, o comportamento de *pacing* foi reduzido brandamente. Entretanto, quando o alimento foi escondido para estimular o forrageio pelos animais, o *pacing* cessou quase completamente.

Roedores, apresentam estereotipias em condições laboratoriais. A freqüência das estereotipias nesses animais difere entre os indivíduos, as raças, e as condições ambientais a que estão submetidos (Garner e Mason, 2002).

Pesquisas têm registrado comportamentos estereotipados em felídeos relacionados a atividades dos tratadores, horário de alimentação (Weller e Bennet, 2001; Moreira et al., 2007), grande número de visitantes e características pobres de recintos como tamanho pequeno e falta de estímulos (Mallapur e Chellam, 2002).

Wielebnowski et al (2002b) observaram que guepardos (*Aciononyx jubatus*) em cativeiro demonstram altas freqüências de comportamentos estereotipados, vocalizações e comportamentos agressivos, sendo mais comum entre fêmeas do que em machos, e mais freqüente em animais não-reprodutores do que reprodutores. Estes comportamentos podem ser um dos fatores que contribuem para a taxa reprodutiva baixa dos guepardos em cativeiro.

Mallapur e Chellam (2002) reportam que a freqüência de comportamentos estereotipados emitidos por leopardos indianos (*Panthera pardus fusca*) é maior em recintos fora de exibição, possivelmente porque estes são menos enriquecidos do que os recintos de exibição ao público. A duração de comportamentos estereotipados em *L. tigrinus*, principalmente *pacing*, foi maior em recintos menores e vazios enquanto que comportamentos exploratórios e marcação ocorreram com maior freqüência nos recintos enriquecidos (grandes e pequenos) (Moreira et al., 2007).

Dembiec et al. (2004) observaram o comportamento de cinco tigres (*Panthera tigris*) durante um experimento em que foi simulado o transporte dos animais em jaulas pequenas (2,7 x 1,2 x 1,2 m). Os tigres foram conduzidos dentro das jaulas em um veículo 4x4 por 400 m em estrada de terra e depois reconduzidos ao recinto original. Foi detectada uma variação inter-individual nas respostas

comportamentais: dois tigres reagiram à situação de estresse (transporte) realizando *pacing* ou caminhando a maioria do tempo; dois tigres ficaram inativos, deitados ou sentados, no mesmo local a maioria do tempo, e um alternou entre os comportamentos. Estas respostas comportamentais nos indicam que diferentes indivíduos podem responder a situações de modos diversos, provavelmente dependendo das experiências passadas que cada indivíduo já teve. A impossibilidade dos tigres fugirem ou se esconderem daquela situação de estresse, pode resultar do comportamento de *pacing*, mas também podem restringir seus movimentos ou levar a um aumento de atividade. Nos mostra também que um aumento de atividade nem sempre indica um estado de bem estar, mas sim um indício de situação de estresse.

O horário de alimentação pode ser acompanhado de comportamentos estereotipados como *pacing* devido a ansiedade em receber alimento, como observado por Weller e Bennett (2001) em *L. pardalis*. Jenny e Schmid (2002) relataram que a frustração permanente da falta do comportamento de forrageamento causa *pacing*.

Mallapur e Chellam (2002) estudando leopardo indiano (*P. pardus fusca*) mostraram que um aumento das atividades em geral ocorre no horário da alimentação. Lyons (1997) encontrou relação entre dias e horários de alimentação e nível de desempenho de *pacing* em felídeos, principalmente no período de uma hora antes de receberem comida quando foi observado um aumento do *pacing*. O mesmo foi observado em jaguatirica (*L. pardalis*) (Weller, 2001), onde *pacing* ocorria mais anteriormente aos horários de alimentação. Um estudo utilizando caixas de alimentação com o horário controlado eletricamente foi testado com tigres (*P. tigris*) resultando em uma diminuição de *pacing* e aumentando o nível de atividade (Jenny e Schmid, 2002).

Os leopardos-indianos são menos ativos em cativeiro do que em vida livre, isto pode ocorrer devido à presença de visitantes inibindo a atividade dos animais (Mallapur e Chellam, 2002). O mesmo ocorre com *L. pardalis* (Weller e Bennett, 2001).

- Observações comportamentais e avaliação dos níveis de cortisol

Correlatos fisiológicos podem ser encontrados nos animais com desordens do comportamento, como o aumento dos glicocorticóides no plasma (Hennessy et al., 1979; Nogueira e Silva, 1997), na urina (Carlstead et al., 1992), na saliva (Davenport et al., 2006), nas fezes (Graham e Brown, 1996; Jurke et al., 1997; Washburn e Millspaugh, 2002; Wielebnowski et al., 2002a; 2002b; Shepherdson et al., 2004; Young et al., 2004; Goymann et al., 2001) e nos pêlos (Accorsi et al., 2008). A análise da fisiologia do estresse tem aplicações no manejo de animais selvagens, biologia da conservação e ecologia comportamental. O aumento de estudos sobre estresse em animais silvestres para estes diferentes fins faz a avaliação dos metabólitos de glicocorticóides em amostras fecais cada vez mais frequente, por ser uma técnica de análise endócrina não-invasiva e de risco mínimo para os animais (Mostl e Palme, 2002).

A avaliação dos glicocorticóides fecais serve como parâmetro da atividade das adrenais e seus distúrbios. Acima de tudo, amostras fecais oferecem a vantagem de serem facilmente coletadas: os animais não precisam ser capturados ou manuseados, não sendo estressados por estas situações (Goymann et al., 1999; Mostl e Palme, 2002; Schwarzenberger, 2007; Acorsi et al., 2008).

Para futuras pesquisas e manejo de animais silvestres em cativeiro e em ambiente natural, análise endócrina não-invasivas constituem uma ferramenta valiosa para diversos campos de pesquisa, considerando o bem estar animal e a conservação de espécies em ambiente cativo e natural (Goymann et al., 1999; Mostl e Palme, 2002; Schwarzenberger, 2007). As condições em cativeiro são ideais para pesquisas com monitoramento de hormônios esteróides fecais, já que se podem coletar amostras de modo longitudinal em estudos conectando fisiologia, endocrinologia, reprodução e estresse relacionado a fatores socioambientais (Schwarzenberger, 2007).

Estudos sobre o metabolismo hormonal de felídeos têm demonstrado que a maioria dos metabólitos adrenais é excretada nas fezes (Graham e Brown, 1996; Wielebnowski et al., 2002a) e usada como um efetivo indicador dos níveis hormonais

no corpo do animal (Mostl e Palme, 2002). Em felídeos, cortisol tem sido identificado como o mais importante glicocorticóide ocorrendo naturalmente (Goossens et al., 1995). Mais que 85% dos hormônios esteróides aparecem como metabólitos nas fezes de 12 a 24 horas depois da secreção no organismo (Brown et al., 2001).

Outra vantagem de aplicação prática relativa à avaliação de glicocorticóides fecais em estudos com animais selvagens foi demonstrada por Washburn e Millspaugh (2002) em estudo com amostras fecais de veado-galheiro (*Odocoileus virginianus*). Os pesquisadores expuseram as amostras fecais por sete dias em cinco condições ambientais (temperatura de 22°C, 38°C, alternando 22°C e 38°C no mesmo ambiente, alternando -20°C e 22°C e simulando chuva) e posteriormente analisaram as concentrações de glicocorticóides destas amostras. Os níveis de glicocorticóides fecais não foram afetados pelos ambientes simulados nos tratamentos, exceto no caso da simulação com chuva, sugerindo que as variações de temperatura tiveram um impacto pequeno sobre a estabilidade dos metabólitos fecais durante os sete dias de exposição das amostras.

Uma desvantagem das análises de esteróides fecais é a ocorrência de diferenças inter-individuais no metabolismo de esteróides e rotas de excreção afetando as medidas dos níveis de metabólitos fecais (Wielebnowski et al, 2002a). Os esteróides são metabolizados pelo fígado antes de serem excretados pela urina ou pela bile indo para as fezes. Durante a passagem intestinal, os metabólitos esteróides podem ser re-absorvidos indo para a circulação enterohepática. A passagem intestinal causa um intervalo entre a circulação dos esteróides no plasma e seu aparecimento nas fezes, e este tempo é correlacionado com o tempo da passagem intestinal da bile para o reto (Schwarzenberger, 2007). O tempo de excreção varia consideravelmente, tanto entre espécies diferentes quanto entre indivíduos da mesma espécie (Schwarzenberger, 2007). Contudo, estudos recentes com primatas (Raminelli et al, 2001), carnívoros (Young et al, 2004) e herbívoros (Washburn e Millspaugh, 2002), demonstraram ser capaz de relacionar os níveis de corticosteróides fecais com a intensidade de estresse ao qual o animal está submetido.

Estudos com diversas espécies relacionando medidas da atividade da adrenal através de amostras fecais têm sido realizados. Por exemplo, Harper e Austad (2000) expuseram roedores em cativeiro e em meio natural a diversas situações (manuseio, sangramento, restrição calórica, ambiente frio e novo) para avaliar a utilidade do método de análise da atividade da adrenal utilizando as fezes dos animais para medir estresse crônico em condições de laboratório e campo. Os autores relataram que este tipo de análise reflete os níveis de estresse experimentados pelos animais, seis a 12 horas antes da defecação.

Goymann et al. (2001) verificaram diferenças nos níveis de glicocorticóides fecais de grupos de hienas (*Crocuta crocuta*) fêmeas no Parque Nacional do Serengeti e Parque Ngorongoro. Os autores relataram que a demanda alta de energia devido a lactação pode ser refletido na resposta do eixo HPA resultando na produção acentuada de corticóides. Foi o primeiro estudo a demonstrar em populações de vida livre que os níveis elevados de corticosteróide estão associados à lactação, e talvez ao estresse social agudo durante este período, e não às respostas as mudanças ambientais.

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de relacionar as condições ambientais e de manejo com medidas de cortisol nos animais, mas são poucos os trabalhos realizados com felídeos (Azevedo et al., 2007).

Pesquisas avaliando níveis de cortisol em felídeos ainda são escassas e com diversos objetivos. Estes vão desde a comparação do nível de cortisol de animais em cativeiro e vida livre, até avaliação da sazonalidade nas concentrações de cortisol, a comparação de níveis de cortisol entre espécies e suas variações inter-sexuais e inter-individuais.

Terio et al. (2004) verificaram que as concentrações do nível basal de corticóides fecais em guepardos eram mais altas para animais em cativeiro do que em vida livre. Newell-Fugate et al. (2007) avaliaram o impacto de luz artificial sobre as concentrações dos metabólitos de corticóides fecais em gatos selvagens asiáticos (*Otocolobus manul*), simulando foto períodos naturais, porém não encontraram variação. Nogueira e Silva (1997) encontraram diferenças no nível de cortisol plasmático entre as espécies de felídeos *Panthera onca* (onça-pintada),

Puma concolor (sussuarana), *Herpailuros yaguaroundi* (gato-mourisco), *L. tigrinus* e *L. pardalis*, além de reportarem variações entre indivíduos da mesma espécie. Fêmeas de *L. tigrinus* apresentaram variações das concentrações de corticóides quando mantidas em diferentes condições ambientais (Moreira et al., 2007).

Concentrações tanto baixas quanto moderadas de glicocorticóides e catecolaminas podem melhorar a formação da memória (Mendl, 1999; Bassett et al., 2007), enquanto a debilitação da memória é observada quando há níveis elevados e persistentes de glicocorticóides plasmáticos (de Kloet et al., 1999; Mendl, 1999) interferindo na atenção ou tomada de decisão (Mendl, 1999). O enriquecimento ambiental melhora a memória e a reação dos animais aos estressores (Meehan e Mench, 2002).

- Enriquecimento ambiental

O enriquecimento ambiental é uma técnica de manejo animal com estratégias temporais, físicas, sociais e sensoriais que visam oferecer uma série de estímulos que possam aumentar o conforto e a capacidade de adaptação tanto fisiológica quanto psicológica do animal ao cativeiro (Fox et al., 2006). O enriquecimento ambiental é um meio de encorajar os animais expressarem comportamentos naturais e típicos da espécie (Rabin, 2003).

Em uma revisão bibliográfica buscando as palavras “environmental enrichment” (enriquecimento ambiental em inglês) na base de dados de artigos online *The Web of Science*, selecionados entre 1985 à 2004, Azevedo et al. (2007) analisaram 744 artigos. 656 artigos apresentavam identificação exata sobre o tipo de ambiente onde foi desenvolvida a pesquisa. A maioria dos estudos envolvendo enriquecimento ambiental foi realizada em laboratórios (69,51%, n = 456), seguido por estudos em fazendas (15,70%, n = 103), zoológicos (9,45%, n = 62) e outros (5,34%, n = 35). Animais usados em pesquisas biomédicas ou em produção animal (n = 700) (por exemplo, avicultura e bovinocultura) constituem a maioria dos animais estudados, com os roedores sendo a maioria dentro deste grupo (52%, n = 364), seguidos por: macacos (16,74%, n = 117), porcos (5,29%, n = 37) e frangos (5,15%, n = 36). Quando agrupados por grupos taxonômicos em estudos com enriquecimento

ambiental, rodentia foi o mais freqüente (54,14%, n = 379), seguindo de primatas (21,71%, n = 152), artiodactila (6,29%, n = 44) e carnívora (5,86%, n = 41). Trabalhos realizados em zoológicos concentraram-se em primatas e carnívoros.

Segundo Bassett et al. (2007), algumas medidas podem ser tomadas para aumentar a freqüência de eventos positivos na vida dos animais em cativeiro, tais como o fornecimento de uma alimentação variada e a introdução de enriquecimento ambiental. Os autores sugerem que a variação espacial e temporal do oferecimento dos alimentos, simulando a situação de forrageamento em vida livre, estimula comportamentos exploratórios e aumenta o bem-estar dos animais em cativeiro.

Muitos estudos têm sido realizados sobre os efeitos do enriquecimento ambiental em prol do bem-estar dos felídeos silvestres em cativeiro, utilizando diferentes tipos de enriquecedores e métodos. Bashaw et al. (2003) utilizaram dois tipos de enriquecedores alimentares (peixe vivo e osso de cavalo) para testar sua eficácia na redução de comportamentos estereotipados e aumento do nível de atividade de leões (*Panthera leo*) e tigres (*P. tigris*). Skibieli et al. (2007) compararam o tempo alocado em nível de atividade e *pacing* antes, durante e após os tratamentos com os seguintes enriquecimentos alimentares: ossos, peixes congelados e fontes de odores (canela, pimenta e cominho) quando oferecidos para as espécies *P. tigris*, *L. pardalis*, *P. onca*, *P. concolor*, *A. jubatus* e *P. leo*.

Moreira et al. (2007) testaram nas espécies *L. tigrinus* e *L. wiedii* três diferentes condições ambientais, variando o tamanho do recinto e seu enriquecimento (introduzindo plantas, troncos, galhos e caixas para os animais descansarem), com o intuito de comparar em cada situação ambiental a atividade adrenocortical e o comportamento dos indivíduos.

McPhee (2002) comparou comportamentos estereotipados de leões, leopardos africanos (*Panthera pardus pardus*) e leopardos da neve (*Panthera uncia*) nas seguintes condições: em exibição, fora de exibição e sendo oferecidos alimentos processados ou carcaças inteiras. Estes experimentos testaram um enriquecimento de cada vez ou utilizaram um enriquecimento diferente para cada indivíduo.

O oferecimento de mais de um tipo de enriquecimento ao mesmo tempo é um método que ainda não tem sido muito testado. Tal procedimento é chamado de “everything-but-the-kitchen-sink” (todas as coisas juntas de uma vez). Azevedo et al (2007) verificaram que os principais enriquecedores utilizados são estruturais, incluindo, troncos e brinquedos. Somente 8,33% de 744 estudos analisados utilizaram vários enriquecedores ao mesmo tempo. Todavia os autores não conseguiram identificar o tipo ou método de enriquecimento em metade (49,46%) dos estudos analisados.

Ademais, Brown (2006) relatou que mais estudos são necessários para avaliar o bem-estar de gatos selvagens em cativeiro e prover informações sobre o impacto das condições dos recintos e manejo sobre sua atividade comportamental.

A comparação dos dados comportamentais e fisiológicos dos animais cativos com as informações dos animais em vida livre é um importante suporte para o estabelecimento de prioridades para pesquisas de conservação das espécies (Morato et al, 2004; Swanson e Brown, 2004; Brown, 2006).

OBJETIVOS

- Objetivo geral

Esta pesquisa teve como objetivo testar diferentes tipos de enriquecedores ambientais oferecidos em conjunto nos recintos de três espécies de felídeos silvestres (*L. pardalis*, *L. wiedii* e *L. tigrinus*), visando verificar se este método provê bem-estar aos animais, diminuindo a expressão de comportamentos anormais e os níveis de corticóides fecais.

- Objetivos específicos

1. Verificar se houve variação na duração relativa dos comportamentos indicadores de estresse entre as três fases do experimento (antes, durante e após o enriquecimento)

2. Verificar se houve diferença na duração relativa de comportamentos indicando bem estar, como brincar, realizar marcação e o nível de atividade.
3. Verificar se houve diferença na duração relativa do tempo passado pelos animais fora do campo de visão do observador.
4. Verificar se houve diferença entre as fases dos níveis de concentração dos metabólicos de glicocorticóide analisados nas amostras fecais (ng/g fezes) de cada espécie, entre as fases.
5. Verificar se os níveis de concentração dos metabólicos de glicocorticóides fecais apresentam uma variação inter-individual para cada espécie.
6. Verificar se a ocorrência dos picos e níveis basais das concentrações de glicocorticóides fecais apresentou uma variação para cada espécie em cada fase.

REFERÊNCIAS

- ACCORSI, P. A., CARLONI, E., VALSECCHI, P., VIGGIANI, R., GARNBERONI, M., TARNANINI, C., SEREN, E. Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. **General and Comparative Endocrinology**, v. 155, n. 2, p. 398-402. 2008.
- AZEVEDO, C. S., CIPRESTE, C. F., YOUNG, R. J. Environmental enrichment: a GAP analysis. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 102, p. 329-343. 2007.
- BARNETT, J. L., CRONIN, G. M., WINFIELD, C. G., DEWAR, A. M. The welfare of adult pigs - the effects of 5 housing treatments on behavior, plasma corticosteroids and injuries **Applied Animal Behaviour Science**, v. 12, n. 3, p. 209-232. 1984.
- BASHAW, M. J., TAROU, L. R., MAKI, T. S., MAPLE, T. L. A survey assessment of variables related to stereotypy in captive giraffe and okapi. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 73, n. 3, p. 235-247. 2001.
- BASHAW, M. J., BLOOMSMITH, M. A., MARR, M. J., MAPLE, T. L. To hunt or not to hunt? A feeding enrichment experiment with captive large felids. **Zoo Biology**, v. 22, n. 2, p. 189-198. 2003.
- BASSETT, L.; BUCHANAN-SMITH, H. M. Effects of predictability on the welfare of captive animals. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 102, n. 3-4, p. 223-245. 2007.
- BIONDI, M.; ZANNINO, L. G. Psychological stress, neuroimmunomodulation, and Susceptibility to infectious diseases in animals and man: A review. **Psychotherapy and Psychosomatics**, v. 66, n. 1, p. 3-26. 1997.
- BOINSKI, S., SWING, S. P., GROSS, T. S., DAVIS, J. K. Environmental enrichment of brown capuchins (*Cebus apella*): Behavioral and plasma and fecal cortisol measures of effectiveness. **American Journal of Primatology**, v. 48, n. 1, p. 49-68. 1999.
- BROWN, J. L., WASSER, S. K., WILDT, D. E., GRAHAM, L. H. Comparative aspects of steroid-hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 4, p. 776-786. 1994.
- BROWN, J. L. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 25-36. 2006.
- BROWN, J. S.; KOTLER, B. P.; BOUSKILA, A. Ecology of fear: Foraging games between predators and prey with pulsed resources. **Annales Zoologici Fennici**, v. 38, n. 1, p. 71-87. 2001.

- CARLSTEAD, K., SEIDENSTICKER, J. Seasonal-variation in stereotypic pacing in an american black bear (*Ursus americanus*). **Behavioural Processes**, v. 25, n. 2-3, p. 155-161. 1991.
- CARLSTEAD, K., BROWN, J. L., MONFORT, S. L., KILLENS, R., WILDT, D. E. Urinary monitoring of adrenal responses to psychological stressors in domestic and nondomestic felids **Zoo Biology**, v. 11, n. 3, p. 165-176. 1992.
- CARLSTEAD, K., BROWN, J. L., STRAWN, W. Behavioral and physiological correlates of stress in laboratory cats. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 38, n. 2, p. 143-158. 1993.
- CINCOTTA, R. P.; WISNEWSKI, J.; ENGELMAN, R. Human population in the biodiversity hotspots. **Nature**, v. 404, n. 6781, p. 990-992. 2000.
- CUNNINGHAM, A. A. V., N. , P. . . Disease Risks of Wildlife Translocations. **Conservation Biology**, v. 10, n. 2, p. 349-353. 1996.
- DAVENPORT, M. D., TIEFENBACHER, S., LUTZ, C. K., NOVAK, M. A., MEYER, J. S. Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. **General and Comparative Endocrinology**, v. 147, n. 3, p. 255-261. 2006.
- DE KLOET, E. R. Stress, cortisol and cognition: Towards understanding a vulnerable phenotype for stress-related psychopathology. **Nordic Journal of Psychiatry**, v. 59, n. 5, p. 398-398. 2005.
- DE KLOET, E. R., SIBUG, R. M., HELMERHORST, F. M., SCHMIDT, M. Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 2, p. 271-281. 2005.
- DEMBIEC, D. P.; SNIDER, R. J.; ZANELLA, A. J. The effects of transport stress on tiger physiology and behavior. **Zoo Biology**, v. 23, n. 4, p. 335-346. 2004.
- DE ROUCK, M., KITCHENER, A. C., LAW, G., NELISSEN, M. A comparative study of the influence of social housing conditions on the behaviour of captive tigers (*Panthera tigris*). **Animal Welfare**, v. 14, n. 3, p. 229-238. 2005.
- ENGEL, G. L. A psychological setting of somatic disease: the giving up–given up complex. **Proceedings of Royal Society Medicine**, v. 60, p. 553–555. 1967.
- FOX, C. M., Z, HARRISON, C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. **Behavioural Brain Research**, v. 175, p. 1–8. 2006.
- FREZARD, A.; LE PAPE, G. Contribution to the welfare of captive wolves (*Canis lupus lupus*): A behavioral comparison of six wolf packs. **Zoo Biology**, v. 22, n. 1, p. 33-44. 2003.
- GARIBALDI, A.; TURNER, N. Cultural keystone species: Implications for ecological conservation and restoration. **Ecology and Society**, v. 9, n. 3, p. 2004.
- GARNER, J. P.; MASON, G. J. Evidence for a relationship between cage

- stereotypies and behavioural disinhibition in laboratory rodents. **Behavioural Brain Research**, v. 136, n. 1, p. 83-92. 2002.
- GOOSSENS, M. M. C., MEYER, H. P., VOORHOUT, G., SPRANG, E. P. M. Urinary-excretion of glucocorticoids in the diagnosis of hyperadrenocorticism in cats. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 12, n. 4, p. 355-362. 1995.
- GOYMANN, W., MOSTL, E., VAN'T HOF, T., EAST, M. L., HOFER, H. Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas, *Crocuta crocuta*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 114, p. 340-348. 1999.
- GOYMANN, W., EAST, M. L., WACHTER, B., HONER, O. P., MOSTL, E., VAN'T HOF, T. J., HOFER, H. Social, state-dependent and environmental modulation of faecal corticosteroid levels in free-ranging female spotted hyenas. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 268, n. 1484, p. 2453-2459. 2001.
- GRAHAM, L. H., BROWN, J.L. Cortisol metabolism in the domestic cat and implications for developing a non-invasive measure of adrenocortical activity in non-domestic felids. **Zoo Biology**, v. 15, p. 71-82. 1996.
- HARPER, J. M.; AUSTAD, S. N. Fecal glucocorticoids: A noninvasive method of measuring adrenal activity in wild and captive rodents. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 73, n. 1, p. 12-22. 2000.
- HENNESSY, M. B., HEYBACH, J. P., VERNIKOS, J., LEVINE, S. Plasma-corticosterone concentrations sensitively reflect levels of stimulus-intensity in the rat. **Physiology and Behavior**, v. 22, n. 5, p. 821-825. 1979.
- HENNESSY, M. B., KAPLAN, J. N., MENDOZA, S. P., LOWE, E. L., LEVINE, S. Separation distress and attachment in surrogate - reared squirrel - monkeys **Physiology and Behavior**, v. 23, n. 6, p. 1017-1023. 1979.
- IBAMA. Lista da fauna Brasileira ameaçada de extinção. Disponível em: <Disponível em <http://www.ibama.gov.br/fauna/downloads/lista%20spp.pdf>>. Acesso em: 05 de novembro de 2009.
- INDRUSIAK, C. E., E. Carnívoros. In: C. S. B. FONTANA, G.A.; REIS, R.E. (ORGANIZADORES) (Org.). **Livro vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no RS**: EDIPUCRS. Porto Alegre, 2003, p. 507-533.
- IUCN. IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/11510/0>>. Acesso em: 05 de novembro de 2009.
- JASNOW, A. M., DRAZEN, D. L., HUHMANN, K. L., NELSON, R. J., DEMAS, G. E. Acute and chronic social defeat suppresses humoral immunity of male Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Hormones and Behavior**, v. 40, n. 3, p. 428-433. 2001.
- JORDAN, B. Science-based assessment of animal welfare: wild and captive animals. **Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties**, v.

- 24, n. 2, p. 515-528. 2005.
- JURKE, M. H., CZEKALA, N. M., LINDBURG, D. G., MILLARD, S. E. Fecal corticoid metabolite measurement in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). **Zoo Biology**, v. 16, n. 2, p. 133-147. 1997.
- LINDBURG, D. G., FITCH-SNYDER, H. Use of behavior to evaluate reproductive problems in captive mammals. **Zoo Biology**, v. 13, p. 433-455. 1994.
- LYONS, J.; YOUNG, R. J.; DEAG, J. M. The effects of physical characteristics of the environment and feeding regime on the behavior of captive felids. **Zoo Biology**, v. 16, n. 1, p. 71-83. 1997.
- MACHADO, A. B., DRUMMOND, G. M., PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção**: Brasília - DF: MMA; Belo Horizonte - MG: Fundação Biodiversitas, v.2. 2008. 1420 p.
- MALLAPUR, A.; CHELLAM, R. Environmental influences on stereotypy and the activity budget of Indian leopards (*Panthera pardus*) in four zoos in southern India. **Zoo Biology**, v. 21, n. 6, p. 585-595. 2002.
- MARGULIS, S. W., HOYOS, C., ANDERSON, M. Effect of felid activity on zoo visitor interest. **Zoo Biology**, v. 22, p. 587-599. 2003.
- MASON, G. J. Stereotypies - a critical review **Animal Behaviour**, v. 41, p. 1015-1037. 1991.
- MASON, G. J.; LATHAM, N. R. Can't stop, won't stop: is stereotypy a reliable animal welfare indicator? **Animal Welfare**, v. 13, p. 57-69. 2004.
- MCGEEHAN, L., LI, X. B., JACKINTELL, L., HUANG, S. Q., WANG, A. P., CZEKALA, N. M. Hormonal and behavioral correlates of estrus in captive giant pandas. **Zoo Biology**, v. 21, n. 5, p. 449-466. 2002.
- MCPHEE, M. E. Intact carcasses as enrichment for large felids: Effects on on- and off-exhibit behaviors. **Zoo Biology**, v. 21, n. 1, p. 37-47. 2002.
- MEEHAN, C. L.; MENCH, J. A. The challenge of challenge: Can problem solving opportunities enhance animal welfare? **Applied Animal Behaviour Science**, v. 102, n. 3-4, p. 246-261. 2007.
- MELLEN, J. D. Factors influencing reproductive success in small captive exotic felids (*Felis* spp) - a multiple - regression analysis **Zoo Biology**, v. 10, n. 2, p. 95-110. 1991.
- MENDL, M. Performing under pressure: stress and cognitive function. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 65, n. 3, p. 221-244. 1999.
- MOBERG, G. P. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: G. P. MOBERG, MENCH, J.A. (EDS.) (Org.). **The Biology of Animal Stress**. New York: CABI Publishing, 2000, p. 1-21.
- MORATO, R. G., VERRESCHI, I. T. N., GUIMARÃES, M. A. B. V., CASSARO, K.,

- PESSUTI, C., BARNABE, R. C., Seasonal variation in the endocrine-testicular function of captive jaguars (*Panthera onca*). **Theriogenology** v. 61, p. 1273-1281. 2004.
- MOREIRA, N., MONTEIRO-FILHO, E. L. A., MORAES, W., SWANSON, W.F., GRAHAM, L.H., PASQUALI, O.L., GOMES, M. L. F., MORAIS, R. M., WILDT, D. E., BROWN, J. L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. **Zoo Biology**, v. 20, p. 103-116. 2001.
- MOREIRA, N., BROWN, J. L., MORAES, W., SWANSON, W. F., MONTEIRO, E. L. A. Effect of housing and environmental enrichment on adrenocortical activity, Behavior and reproductive cyclicity in the female tigrina (*Leopardus tigrinus*) and margay (*Leopardus wiedii*). **Zoo Biology**, v. 26, n. 6, p. 441-460. 2007.
- MORGAN, K. N.; TROMBORG, C. T. Sources of stress in captivity. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 102, n. 3-4, p. 262-302. 2007.
- MOSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 67-74. 2002.
- NEWELL-FUGATE, A., KENNEDY-STOSKOPF, S., BROWN, J. L., LEVINE, J. F., SWANSON, W. Seminal and endocrine characteristics of male Pallas' cats (*Otocolobus manul*) maintained under artificial lighting with simulated natural photoperiods. **Zoo Biology**, v. 26, n. 3, p. 187-199. 2007.
- NOGUEIRA, G. P.; SILVA, J. C. R. Plasma cortisol levels in captive wild felines after chemical restraint. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 11, p. 1359-1361. 1997.
- NOWELL, K., JACKSON, P. **Wild Cats: status survey and conservation action plan**. Gland, Switzerland: IUCN/SSC Cat Specialist Group. 1996. 382 p.
- OLIVEIRA, T. G. **Neotropical cats: ecology and conservation**. Sao Luis: Brasil: EDUFMA. 1994. 222 p.
- OLIVEIRA, T. G. **Leopardus wiedii**. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Ed. Biodiversitas, MMA, p. 789-790. 2008
- OLIVEIRA, T. G. **Leopardus tigrinus**. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Ed. Biodiversitas, MMA, p. 787-788. 2008
- OLIVEIRA, T. G.; BIANCHI, R. C. **Leopardus pardalis**. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Ed. Biodiversitas, MMA, p. 785-786. 2008
- PALMEIRA, F. B. L., CRAIVSHAW, P. G., HADDAD, C. M., FERRAZ, KMPMB, VERDAD, L. M. Cattle depredation by puma (*Puma concolor*) and jaguar (*Panthera onca*) in central-western Brazil. **Biological Conservation**, v. 141, n. 1, p. 118-125. 2008.
- POWELL, D. M. Preliminary evaluation of environmental enrichment techniques for African lions (*Panthera leo*). **Animal Welfare**, v. 4, p. 361-370. 1995.
- PRIMACK, R. B., RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina. 2002. 328

p.

- RABIN, L. A. Maintaining behavioural diversity in captivity for conservation: Natural behaviour management. **Animal Welfare**, v. 12, n. 1, p. 85-94. 2003.
- RABINOWITZ, A. R. W., WALKER, S.R. The carnivore community in a dry tropical forest mosaic in Huai Kha Khaeng Wildlife Sancturay, Thailand. **Journal Tropical Ecology**, v. 7, n. 1, p. 37-47. 1991.
- RAMINELLI, J. L. F., DE SOUZA, M. B. C., CUNHA, M. S., BARBOSA, M. F. V. Morning and afternoon patterns of fecal cortisol excretion among reproductive and non-reproductive male and female comom marmosets, *Callithrix jacchus*. **Biological Rhythm Research**, v. 32, p. 159-167. 2001.
- SAPOLSKY, R. M. Why stress is bad for your brain. **Science**, v. 273, n. 5276, p. 749-750. 1996.
- _____. Stress and plasticity in the limbic system. **Neurochemical Research**, v. 28, n. 11, p. 1735-1742. 2003.
- SCHONEWALD-COX, C. Scale, Variable Density, and Conservation Planning for Mammalian Carnivores. **Conservation Biology**, v. 5, n. 4, p. 491-495. 1991.
- SCHWARZENBERGER, F. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. **International Zoo Yearby**, v. 41, p. 52-74. 2007.
- SCOTT, J. M.; MURRAY, D.; GRIFFITH, B. Lynx reintroduction. **Science**, v. 286, n. 5437, p. 49-51. 1999.
- SKIBIEL, A. L.; TREVINO, H. S.; NAUGHER, K. Comparison of several types of enrichment for captive felids. **Zoo Biology**, v. 26, p. 371-381. 2007.
- SNYDER, N. F. R. Limitations of captive breeding in endangered species. **Conservation Biology**, v. 10, n. 2, p. 338-348. 1996.
- STOINSKI, T. S., BECK, B. B., BLOOMSMITH, M. A., MAPLE, T. L., . A behavioral comparison of captive-born, reintroduced golden lion tamarins and their wild-born offspring. **Behaviour**, v. 140, p. 137-160. 2003.
- SWAISGOOD, R. R.; SHEPHERDSON, D. J. Scientific approaches to enrichment and stereotypies in zoo animals: What's been done and where should we go next? **Zoo Biology**, v. 24, n. 6, p. 499-518. 2005.
- SWANSON, W. F., JOHNSON, W. E., CAMBRE, R. C., CITINO, S. B., OUIGLEY, K. B., BROUSSET, D. M., MORALS, R. N., MOREIRA, N., O'BRIEN, S. J., WILDT, D. E. Reproductive status of endemic felid species in Latin American zoos and implications for ex situ conservation. **Zoo Biology**, v. 22, n. 5, p. 421-441. 2003.
- SWANSON, W. F.; BROWN, J. L. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. **Animal Reproduction Science**, v. 82-3, p. 21-34. 2004.

- TERBORGH, J., LOPEZ, L., NUNEZ, P. V., RAO, M., SHAHABUDDIN, G., ORIHUELA, G., RIVEROS, M., ASCANIO, R., ADLER, G. H., LAMBERT, T. D., BALBAS, L. . Ecological Meltdown in Predator-Free Forest Fragments. **Science**, v. 294, p. 2001.
- TERIO, K. A.; MARKER, L.; MUNSON, L. Evidence for chronic stress in captive but not free-ranging cheetahs (*Acinonyx jubatus*) based on adrenal morphology and function. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 40, n. 2, p. 259-266. 2004.
- TOATES, F. Cognition, motivation, emotion and action: a dynamic and vulnerable interdependence. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 86, n. 3-4, p. 173-204. 2004.
- VALLADARES-PADUA, C. B., MARTINS, C.S., RUDRAN, R. Manejo integrado de espécies ameaçadas. In: L. V.-P. CULLEN JR., C.; RUDRAN, R. (ORGANIZADORES) (Org.). **Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**. Curitiba: Ed. Da UFPR; Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, 2003, p. 647-665.
- VAN DEN BOS, R. Post-conflict stress-response in confined group-living cats (*Felis silvestris catus*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 59, n. 4, p. 323-330. 1998.
- VAN HEEZIK, Y., OSTROWSKI, S. . Conservation breeding for reintroductions: assessing survival in a captive flock of houbara bustards. **Animal Conservation**, v. 4, p. 195–201. 2001.
- VIDOLIN, G. P., VELASTIN, G. O., MANGINI, P. R. **Felinos Silvestres como indicadores de qualidade ambiental na reserva natural Salto Morato, Guaraqueçaba, Paraná, Brasil**. XXVII Congresso de Zoológicos do Brasil. Bauru, São Paulo, 2003. p.
- WASHBURN, B. E.; MILLSPAUGH, J. J. Effects of simulated environmental conditions on glucocorticoid metabolite measurements in white-tailed deer feces. **General and Comparative Endocrinology**, v. 127, n. 3, p. 217-222. 2002.
- WASSER, S. K., HUNT, K. E., BROWN, J. L., COOPER, K., CROCKETT, C. M., BECHERT, U., MILLSPAUGH, J. J., LARSON, S., MONFORT, S. L., . A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 120, p. 260-275. 2000.
- WELLER, S. H.; BENNETT, C. L. Twenty-four hour activity budgets and patterns of behavior in captive ocelots (*Leopardus pardalis*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 71, n. 1, p. 67-79. 2001.
- WELLS, D. L.; EGLI, J. M. The influence of olfactory enrichment on the behaviour of captive black-footed cats, *Felis nigripes*. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 85, n. 1-2, p. 107-119. 2004.
- WIELEBNOWSKI, N. C., ZIEGLER, K., WILDT, D. E., LUKAS, J., BROWN, J. L.

Impact of social management on reproductive, adrenal and behavioural activity in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). **Animal Conservation**, v. 5, p. 291-301. 2002b.

WIELEBNOWSKI, N. C., FLETCHALL, N., CARLSTEAD, K., BUSO, J. M., BROWN, J. L., Noninvasive assessment of adrenal activity associated with husbandry and behavioral factors in the North American clouded leopard population. **Zoo Biology**, v. 21, n. 1, p. 77-98. 2002a.

WIEPKEMA, P. R., KOOLHAAS, J. M. Stress and animal welfare. **Animal Welfare**, v. 2, p. 195-218. 1993.

WILDT, D. E., PHILLIPS, L. G., SIMMONS, L. G., CHAKRABORTY, P. K., BROWN, J. L., HOWARD, J. G., TEARE, A., BUSH, M., . A comparative - analysis of ejaculate and hormonal characteristics of the captive male cheetah, tiger, leopard and puma **Biology of Reproduction**, v. 38, n. 2, p. 245-255. 1998.

WOODROFFE, R. Predators and people: using human densities to interpret declines of large carnivores. **Animal Conservation**, v. 3, p. 165-173. 2000.

YOUNG, K. M., WALKER, S. L., LANTHIER, C., WADDELL, W. T., MONFORT, S. L., BROWN, J. L. Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. **General and Comparative Endocrinology**, v. 137, n. 2, p. 148-165. 2004.

CAPÍTULO II

INFLUÊNCIAS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NO COMPORTAMENTO E NÍVEL DE CORTISOL EM FELÍDEOS SILVESTRES

- Introdução

Os felídeos estudados no presente trabalho (*L. pardalis*, *L. tigrinus* e *L. wiedii*) são representantes de três das cinco menores espécies de gatos selvagens que ocorrem no Brasil. Eles estão dentre os gatos selvagens pequenos (peso menor que 20 kg), representando 80% das 37 espécies de felídeos no mundo (Swanson e Wildt, 1997).

De acordo com a classificação de condição ecológica de vulnerabilidade à extinção da lista vermelha da IUCN – União Internacional para a Conservação da Natureza e Recursos Naturais (2009), as espécies de gatos selvagens deste estudo se enquadram nas seguintes categorias: *L. tigrinus* e *L. pardalis* de vulnerável à extinção, e *L. wiedii* de quase ameaçado.

Os fatores antropogênicos são considerados a principal ameaça para a vida selvagem (Scott et al., 1999; Valladares-Pádua et al., 2003): a destruição e extração de recursos ambientais, o tráfego de veículos e a caça (Scott et al., 1999) são as principais causas do declínio das populações naturais de carnívoros.

Uma das importantes estratégias para evitar a extinção de espécies é a manutenção de indivíduos em cativeiro (conservação *ex-situ*) (Primack e Rodrigues, 2002) e a reprodução *ex-situ* (Swanson e Brown, 2004). O cativeiro propicia um ambiente que permite realizar pesquisas em condições controladas, oferecendo uma oportunidade de entendimento dos fatores relacionados às espécies animais com abordagens que não são viáveis em estudos em ambiente natural (Wielebnowski et al., 2002a).

Porém, as condições de cativeiro são adversas àquelas apresentadas em ambiente natural, causando geralmente alterações no comportamento e na fisiologia dos animais (Lindburg e Fitch-Snyder, 1994). Em consequência à estas condições desenvolvem-se processos de estresse, comprometendo a capacidade de adaptação, a sobrevivência e condições mínimas de conforto dos animais (Wielebnowski, 2002a).

Responder à situações estressantes de curto prazo, por exemplo durante uma caçada, é uma parte normal na vida de todos os animais e resulta na liberação dos glicocorticóides (Goymann et al., 1999; Mostl e Palme, 2002; Sapolsky, 2003). Porém, quando uma situação de estresse passa a se tornar longa, por exemplo quando os animais enfrentam péssimas condições de cativeiro, suas respostas são mal-adaptativas, o que leva a um estresse crônico chamado de **distresse** (Sapolsky, 1996; de Kloet et al., 2005).

Algumas causas possíveis do nível elevado de estresse dos animais mantidos em condições do cativeiro são o tamanho inadequado do recinto, a falta de estímulos, a dieta imprópria, o manejo não adaptado (Moreira et al., 2001; Mallapur e Chellam, 2002; Swanson et al., 2003; Brown, 2006), a exposição dos animais a luz artificial, ao barulho e a alguns odores, temperaturas extremas (Morgan e Tromborg, 2007), o contato visual, olfativo e auditivo com predadores ou espécies co-específicas (Carlstead et al., 1993; Moreira et al., 2001; Swanson et al., 2003;

Brown, 2006), a quantidade de indivíduos no recinto (de Rouck et al, 2005), contato (visual, auditivo, olfativo) entre o animal e pessoas próximas ao recinto, como visitantes (Margulis et al, 2003) e os tratadores responsáveis pela manutenção dos recintos (Moreira et al., 2001; Swanson et al., 2003; Brown, 2006).

Más condições ambientais favorecem a ocorrência de comportamentos anormais e estereotipados em felídeos, como *pacing* (Wielebnowski et al., 2002a; de Rouck et al, 2005), lambar-se, mordiscar-se excessivamente (Lyons et al., 1997; van den Bos, 1998), coçar-se demasiadamente, balançar a cabeça (van den Bos, 1998), reingerir e regurgitar alimento, coprofagia (Lyons et al., 1997), apatia e esconder-se (Wielebnowski et al., 2002a).

Um método de análise de corticóides que tem sido muito utilizado com animais em cativeiro e em vida livre é a medição de concentração em metabólitos em amostras fecais (Goymann et al., 2001; Washburn e Millspaugh, 2002; Wielebnowski et al., 2002a; Millspaugh e Washburn, 2004; Shepherdson et al., 2004; Young et al., 2004; Gusset, 2005; Lane, 2006; Moreira et al., 2007; schwarzenberger, 2007; Accorsi et al., 2008; Dias et al., 2008). A característica não-invasiva do método evita o estresse causado por outros procedimentos (Lane, 2006) e possui um risco mínimo para os animais (Mostl e Palme, 2002).

Estudos relacionando relatos etológicos e análises de níveis hormonais de estresse têm mostrado que alta frequência de comportamentos como: *pacing*, dormir, esconder-se e autoflagelar-se estão ligados a altas concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais (Wielebnowski et al., 2002a).

Através da introdução de enriquecimentos ambientais, os animais podem ser estimulados a expressarem comportamentos naturais (Rabin, 2003) como forragear, investigar, caçar, esconder-se quando não quiser ser visto, enfim, estimular a expressão dos comportamentos mais próximos aos que apresentariam em ambiente natural (Swaigood e Shepherdson, 2005). Pode-se alcançar esse objetivo aumentando a complexidade do ambiente, adicionando substratos como troncos (Powell, 1995) e galhos (Moreira et al., 2007), alimentos inteiros (carcaças) (McPhee, 2002), presas vivas (Bashaw et al., 2003), ossos (Bashaw et al., 2003; Skibiel et al., 2007), alimento congelado (peixe) (Powell, 1995; Skibiel et al, 2007),

odores (Powell, 1995; Wells e Egli, 2004; Skibieli et al., 2007) e locais de esconderijo (Moreira et al., 2007).

Porém, uma metodologia que ainda não foi muito explorada é o oferecimento de diversos tipos de enriquecedores simultaneamente. Alguns autores aconselham a realização de mais estudos com este método a fim de entender melhor as diferentes estratégias de enriquecimento ambiental que são utilizadas rotineiramente por zoológicos a fim de promover maior bem-estar dos animais em cativeiro (Boinski et al., 1999; Swaisgood e Shepherdson, 2005; Skibieli et al., 2007).

Esta pesquisa teve como objetivo testar diferentes tipos de enriquecedores ambientais oferecidos em conjunto nos recintos de três espécies de felídeos silvestres (*L. pardalis*, *L. wiedii* e *L. tigrinus*). Foi avaliada a eficiência deste método de enriquecimento ambiental para prover bem-estar aos animais, sendo analisado através dos comportamentos e análises dos níveis de corticóides.

MATERIAIS E MÉTODOS

○ Analises de comportamento

A coleta de dados foi realizada entre os meses de julho e setembro de 2008 no Centro de Reabilitação de Pequenos Felídeos do projeto Gato do Mato na área do CETAS (Centro de Triagem de Animais Silvestres), IBAMA, em São Luís, Maranhão, Brasil. O IBAMA emprestou esta área para que fosse construído o Centro de Reabilitação de Pequenos Felídeos. Apenas pessoas autorizadas e pesquisadores têm acesso aos recintos, sendo o Centro fechado ao público em geral.

Foram estudados 12 indivíduos das espécies *L. pardalis* (N = 6, três machos e três fêmeas), *L. wiedii* (N = 1, um macho) e *L. tigrinus* (N = 5, três machos e duas fêmeas) (Figura 1, 2 e 3) os quais não eram aparentados (Tabela 1). Os locais de nascimento dois indivíduos (cativeiro ou meio natural) são indeterminados. Os animais foram resgatados de cativeiro ilegal ou apreendidos de tráfico de animais silvestres e alojados no Centro há pelo menos um ano.

Adultos e jovens foram discriminados através das informações passadas pelo biólogo responsável pelos animais do Centro, o qual identifica a categoria etária através do tamanho, padrões de pelagem e dentição. Os recintos, reunidos em um único prédio (Figura 4), foram construídos em paredes de alvenaria com chão de terra, exceto uma pequena área na entrada coberta por cimento (Figura 5). A superfície de cada recinto era de 21 m³ (3,5 x 2,0 x 3,0 m). Cada recinto tinha uma área de crescimento e um tronco separados por uma barreira de gradeado duplo e bambu ou madeira por cima deste. Todos os indivíduos estavam distribuídos em recintos individuais.

Tabela 1. Lista dos indivíduos estudados com o código, por espécie, sexo e categoria etária

Indivíduo (código)	Espécie	Sexo	Categoria etária
1 (P01)	<i>L. pardalis</i>	Macho	Adulto
2 (P02)	<i>L. pardalis</i>	Fêmea	Adulto
3 (P03)	<i>L. pardalis</i>	Fêmea	Adulto
4 (P04)	<i>L. pardalis</i>	Macho	Adulto
5 (P05)	<i>L. pardalis</i>	Macho	Adulto
6 (P07)	<i>L. pardalis</i>	Fêmea	Jovem
7 (W08)	<i>L. wiedii</i>	Macho	Adulto
8 (T09)	<i>L. tigrinus</i>	Fêmea	Adulto
9 (T10)	<i>L. tigrinus</i>	Macho	Adulto
10 (T11)	<i>L. tigrinus</i>	Macho	Adulto
11 (T12)	<i>L. tigrinus</i>	Macho	Adulto
12 (T13)	<i>L. tigrinus</i>	Fêmea	Adulto

Adultos e jovens foram discriminados através das informações passadas pelo biólogo responsável pelos animais do Centro, o qual identifica a categoria etária através do tamanho, padrões de pelagem e dentição. Os recintos, reunidos em um único prédio foram construídos em paredes de alvenaria com chão de terra, exceto uma pequena área na entrada coberta por cimento (Figura 5). A superfície de cada recinto era de 21 m³ (3,5 x 2,0 x 3,0 m). Cada recinto tinha uma área de crescimento e um tronco separados por uma barreira de gradeado duplo e bambu ou madeira por cima deste. Todos os indivíduos estavam distribuídos em recintos individuais.

Além dos 12 indivíduos estudados, o centro só possuía um gato-mourisco (*H. yaguaroundi*), todos sendo membros de espécies ocorrendo naturalmente no Brasil. Os animais eram normalmente manejados por um único tratador, que os alimentava a cada dois dias com pedaços de frango, não tendo um horário fixo para a alimentação. O Centro utiliza os serviços da médica veterinária do CETAS, porém ela não utilizou nenhum procedimento nos felinos do centro durante o experimento.

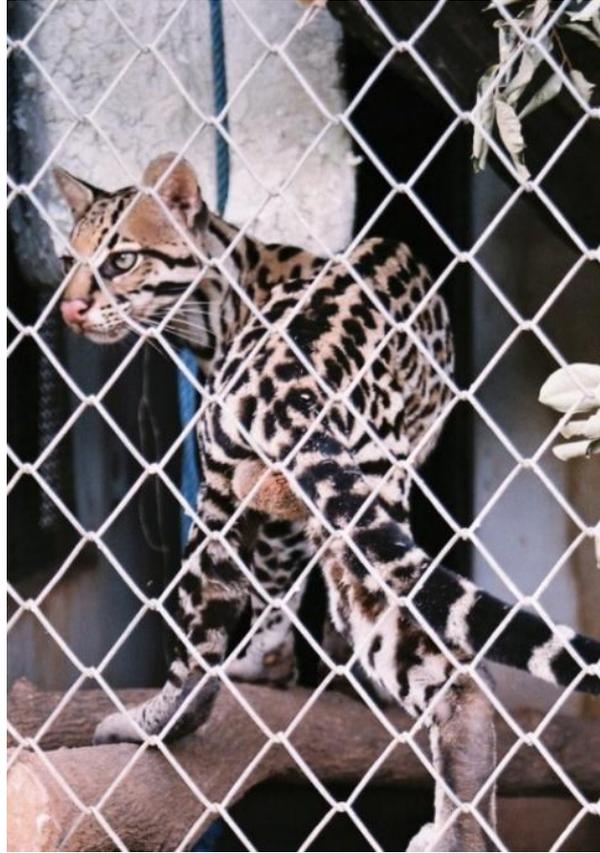


Figura 1. Foto de *L. pardalis*



Figura 2. Foto de *L. wiedii*



Figura 3. Foto de *L. tigrinus*



Figura 4. Centro de reabilitação

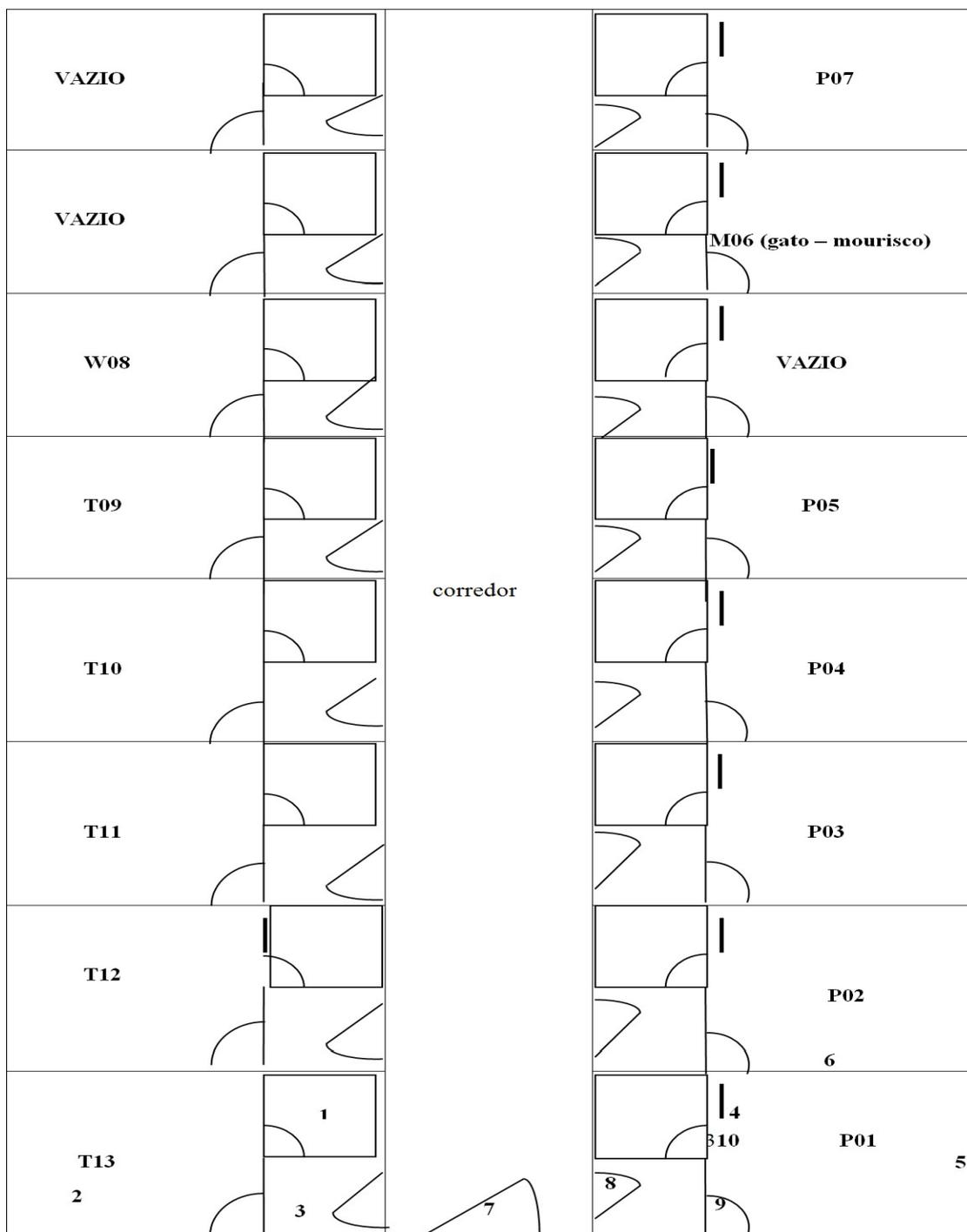


Figura 5. Planta baixa do Centro de reabilitação de pequenos felídeos do CETAS de São Luis, Brasil. 1. Cambiamento; 2. Área do recinto maior; 3. Área de entrada do recinto (separada da área 2 pela porta 9 somente quando realizado algum manejo no cambiamto); 4. Porta de roldana de acesso ao cambiamto para os animais; 5. Parede de contato dos animais com o meio externo através de gradeado; 6. Divisão entre recintos com gradeado duplo com bambu ou madeira; 7. Portão principal de acesso ao Centro; 8. Porta principal do recinto; 9. Porta para prender o animal na área maior do recinto enquanto realizado qualquer manejo do cambiamto; 10. Porta de acesso do tratador ao cambiamto. Os códigos (ex: PO1) correspondem ao código do animal informado na tabela 1.

○ Tratamentos

A coleta de dados foi realizada durante três fases:

- A primeira fase de coleta (pré-enriquecimento) foi realizada do dia 24 de julho até o dia 6 de agosto de 2008. Os recintos foram deixados como eram anteriormente ao estudo (Figura 6).
- A segunda fase (fase de enriquecimento ambiental) foi executada do dia 7 até o dia 27 de agosto de 2008. Vários enriquecedores foram colocados em diferentes níveis de altura e introduzidos ao mesmo tempo em todos os recintos, sendo alguns repostos e outros substituídos em média uma vez por semana. Testamos o efeito da variação da complexidade ambiental sobre o comportamento de gatos selvagens utilizando conjuntamente diversos enriquecimentos tais como vegetação, barreira visual, brinquedos, diferentes métodos de fornecimento da alimentação e fontes olfativas. O objetivo era estimular diferentes sistemas sensoriais (olfato, visão, gustação e tato) e aumentar a oportunidade para os animais explorar o ambiente (Tabela 2 e Figura 7).
- A terceira fase (pós-enriquecimento) foi realizada entre o dia 28 de agosto e o dia 5 de setembro de 2008. Todos os enriquecedores que tinham sido postos na segunda fase foram retirados, com vistas de comparar o comportamento e os níveis de corticóide dos felídeos aos registrados durante as fases anteriores.

Tabela 2. Introdução de enriquecimentos por semana durante a fase de enriquecimento

Tipos de enriquecimento*	Enriquecedores	Semana 1	Semana 2	Semana 3
Vegetação	Galhos e folhagens	X	X	X
	Troncos novos			X
Barreira física	Folhas de bananeira	X		
	Lona plástica verde		X	X
Olfatório	Canela em pau	X		
	Cravo-da-índia		X	X
Brinquedos	Bóia de isopor			X
	Bolinha de plástico	X	X	X
	Garrafa plástica			X
Alimentar	Frango congelado enrolado em jornal	X	X	X
	Presas vivas (peixe, codorna, coelho e hamster)	X	X	X

*Adaptado de Swaisgood e Shepherdson (2005)

Na primeira semana de enriquecimento foram introduzidos para todas as espécies (*L. pardalis*, *L. tigrinus* e *L. wiedii*) os seguintes tipos de enriquecimentos:

vegetação (galhos com folhagens – Figura 8); barreira física (folhas de bananeiras – figura 11) na porta principal de cada recinto (número 8 da Figura 5) impedindo o contato visual das duas espécies menores com *L. pardalis*, e vice-versa; olfatório (canela em pau, introduzida nos recintos uma vez e deixada durante toda a semana, Figura 12); brinquedos (uma bolinha de plástico do tamanho de uma bolinha de pingue-pongue para cada um dos indivíduos das espécies *L. wiedii* e *L. tigrinus*) foram oferecidos somente para as duas espécies menores (*L. wiedii* e *L. tigrinus*) devido ao tamanho das bolinhas, as quais *L. pardalis* poderiam engolir; alimentar (pedaços de frango, oferecido congelado, enrolado em jornal e pendurado no teto (Figuras 9 e 13), e presas vivas – hamsters, um por indivíduo).

Na segunda semana os tipos de enriquecimentos fornecidos foram: vegetação (galhos – trocados por novos); barreira física (lona verde - substituindo as folhas de bananeira), olfatório (cravos-da-índia) para todas as espécies; brinquedos (bolinhas de plástico para as espécies *L. wiedii* e *L. tigrinus*); alimentar (frango e presas vivas - hamster para os *L. tigrinus* e o *L. wiedii*, e coelho para os *L. pardalis*, um por indivíduo).

Na terceira semana foram oferecidos os seguintes tipos de enriquecimentos: vegetação (introduzidos galhos novos e foram inseridos os enriquecimentos troncos para todas as espécies); barreira física (lona plástica verde); olfatório (cravo-da-índia); brinquedos (bolinhas de plástico para as espécies *L. wiedii* e *L. tigrinus*) e (bóias de isopor (figura 14) penduradas no teto dos recintos para *L. pardalis* e garrafas plásticas (figura 10) também penduradas no teto dos recintos para *L. wiedii* e *L. tigrinus*); alimentar (frango e presas vivas – codornas para todas as espécies e um peixe de aquário no pote de água, para *L. wiedii* e *L. tigrinus*),

Os galhos com folhagens e folhas de bananeira eram trocados sempre que estavam murchas e/ou secas, porém como as folhas de bananeira murchavam muito rápido, na segunda semana foram substituídas por lona plástica verde que perdurou até o final da fase de enriquecimento. O frango congelado era oferecido em dias alternados (os dias de alimentação normal), com as presas vivas que eram apresentadas de uma a duas vezes por semana a todos os indivíduos do estudo. Os

indivíduos que eram observados no mesmo dia, esperava-se pelo menos uma hora após o oferecimento das presas vivas.



Figura 6. Recinto na primeira fase



Figura 7. Recinto na segunda fase



Figura 8. Foto dos enriquecimentos galhos e folhagens no recinto de *L. wiedii*



Figura 9. *L. pardalis* escalando para pegar frango embrulhado no jornal



Figura 10. Foto do recinto de *L. tigrinus* com os enriquecimentos: tronco, garrafa plástica e galhos



Figura 11. Foto do enriquecimento folha de bananeira preso no portão (barreira física) (Fonte: S. Granta, 2008)



Figura 12. Foto do enriquecimento canela em pau (Fonte: S. Granta, 2008)



Figura 13. Foto do enriquecimento frango embrulhado (Fonte: S. Granta, 2008)



Figura 14. Foto de *L. pardalis* brincando com a bóia (Fonte: S. Granta, 2008)

○ Coleta de dados comportamentais

Foi realizada uma fase de habituação dos animais à presença do observador de cinco dias pela manhã, tarde e noite (4h–11h e 15h–23h) simulando a coleta de dados comportamentais e nenhum comportamento aversivo ou agressivo contra o observador foi registrado. A coleta de dados comportamentais foi realizada através do registro contínuo dos comportamentos individuais durante sessões de amostragem do tipo animal focal (Altmann, 1974). Todos os comportamentos emitidos pelo animal focal e suas respectivas durações eram anotados em um caderno de campo. O observador estava localizado a dois metros da parte externa do recinto. Esta distância foi mantida durante as três fases de observação para evitar que a variação da proximidade do observador ao recinto influenciasse no

comportamento. Pesquisas etológicas foram desenvolvidas anteriormente no centro utilizando a mesma distância do observador para o recinto.

O etograma utilizado foi baseado no trabalho de Rouck et al. (2005), acrescentando alguns outros comportamentos observados durante um estudo piloto no Zoológico de Brasília, realizado no mês de junho de 2008, e durante a coleta de dados. Os comportamentos foram distribuídos nas seguintes categorias (Tabela 3):

Tabela 3. Definição das categorias comportamentais e o número de comportamentos em cada categoria

Categorias	Definição	Número de comportamentos e exemplos
Movimento	Comportamentos relacionados a deslocamento dos indivíduos no espaço, à exceção dos comportamentos relacionados à categoria estresse.	Quatro comportamentos: correr, andar, escalar e pular
Marcação	Comportamentos relacionados à deposição de odores químicos presentes em urina, fezes e glândulas epidérmicas.	Quatro comportamentos: defecar, urinar, afiar as garras e esfregar-se
Descanso	Comportamentos relacionados à diminuição de atividade motora	Três comportamentos: deitado, parado e sentado
Estresse	Comportamentos relacionados à agressividade, medo, estereotipia e anormalidade	Nove comportamentos como: pacing, mostrar os dentes, rodar a cabeça (lista na Tabela 1 do Apêndice)
Reação ao enriquecedor	Comportamentos relacionados aos enriquecedores	19 comportamentos como: cheirar enriquecedor, brincar com enriquecedor, lambar enriquecedor (lista na Tabela 1 do Apêndice)
Outros	Comportamentos que não foram classificados em categorias anteriores	11 comportamentos como: cheirar, rolar, bocejar (lista na Tab. do Anexo 1)
Fora de visão	Animal não visualizado	Animal dentro do cambiamento, fora do campo visual do observador

As observações foram realizadas em dois períodos noite-manhã (de 4h a 11h) e tarde-noite (de 15h a 23h). A escolha da ordem de observação dos animais foi realizada de forma aleatória, através de sorteio. As sessões de observação foram realizadas de forma a completar 7h30min de observação por período, por fase para cada indivíduo, totalizando 530 horas de observação. Quando a sessão de

observação de um indivíduo era interrompida, normalmente por motivos independentes do observador, reiniciava-se a partir do horário interrompido em outro dia selecionado em novo sorteio.

- Coleta de amostras fecais

Foi estabelecido que seriam coletadas duas amostras por semana, logo quando o observador chegasse ao centro pela manhã, antes de começar as observações comportamentais. Porém, nem todos os indivíduos haviam defecado até a hora de coleta. Por isso não foi possível coletar o número pré-definido. Então, quando não houve coleta de algum indivíduo, tentava coletar no dia seguinte. Foram coletadas, em média 15 (de 10 a 20) amostras fecais frescas por indivíduo, sendo em média cinco (de duas a oito) amostras em cada uma das três fases do experimento, totalizando 182 amostras (Tabela 2.2, Apêndice 2). Esperou-se um dia após o início de cada fase para começar as coletas das amostras fecais.

- Conservação e processamento das amostras

O material fecal recolhido foi acondicionado em sacos plásticos identificados com a sigla de cada indivíduo e data da coleta. Estas amostras foram armazenadas em freezer a -20°C . O processo de liofilização (liofilizador Freezone da Labcom) foi realizado no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz, o qual as amostras ficaram no vácuo, que atingiu 0,07 mBar a uma temperatura de -54°C , e durou aproximadamente 24 horas. Este procedimento foi adotado para evitar a proliferação de bactérias e permitir a padronização do peso do material fecal a ser utilizado, independente do conteúdo de água do material fecal. Depois de liofilizada, cada amostra foi mantida em freezer (-20°C) até o envio sob refrigeração em caixa de isopor com gelo seco, para a extração e análise dos metabólitos de glicocorticóides fecais (MGF) no Laboratório de Fisiologia Endócrina

e Reprodutiva Animal do Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba - PR.

○ Extração e dosagem hormonal

Todos os reagentes utilizados no presente estudo, exceto quando especificados, foram adquiridos da Sigma-Aldrich, e as soluções utilizadas foram preparadas com água ultrapura (Sistema Puritech – Permution, E.J. Krieger e Cia Ltda). Para a extração dos MGF $0,5 \pm 0,1$ g de fezes liofilizadas foram pesadas em tubo de ensaio de vidro, adicionando-se 5 mL de etanol (80% v:v em água ultrapura). Em seguida os tubos foram tampados e agitados por turbilhonamento, com pulsos de 1-2 segundos, durante 30 minutos em agitador de multi pulso (Multi-Pulse Vortexer, modelo 099A VB4, 50/60Hz – Glass-Col®). Após centrifugação (1000 x g, 15 min) o extrato sobrenadante foi transferido para tubo de polipropileno (12 X 75 mm) com tampa, devidamente identificado e mantido a -20°C para posterior análise.

A dosagem dos MGF foi feita por meio do método de enzima imunoensaio (ELISA - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) conforme descrito e validado previamente para felinos por Young et al. (2004). Resumidamente, utilizou-se o anticorpo anti-cortisol (Polyclonal R4866) e o hormônio conjugado cortisol-HRP (Coralie Munro – Universidade da Califórnia, Davis, CA, USA) diluídos a 1: 8.500 e 1:20.000, respectivamente. A curva padrão foi preparada a partir de cortisol na concentração de $20.000 \text{ pg.mL}^{-1}$, diluída serialmente (1:1) com solução de ensaio de ELISA (NaH_2PO_4 ; NaH_2PO_4 ; NaCl; BSA; pH ajustado para 7,0) até a concentração de 78 pg mL^{-1} .

Antes de iniciar os ensaios, foi realizado o teste de paralelismo para validar o ensaio nas nossas condições e definir a melhor diluição dos extratos para a dosagem. Para tanto, preparou-se uma mistura (*pool*) dos extratos fecais (n=182), a qual foi em seqüência diluída em solução tampão (NaH_2PO_4 ; NaH_2PO_4 ; NaCl ; pH ajustado para 7,0) de forma seriada (1:8 até 1:256). As diluições mais baixas 1:2 e 1:4, pelo alto teor de álcool foram desprezadas, já que o álcool interfere com a ação da enzima HRP, utilizada no ensaio. A partir dos resultados definiu-se a diluição 1:32 como sendo a melhor para obter aproximadamente 50% de ligação, tendo sido, entretanto, repetir as análises de algumas amostras, em diluições a 1:16 ou 1:64.

A sensibilidade do ensaio, calculada com base no limiar de detecção, foi de $0,09 \text{ ng.mL}^{-1}$. As amostras foram analisadas em duplicatas, com um coeficiente de variação intra-ensaio de 3,6% e coeficiente de variação inter-ensaios de 6,1% e 8,8%, com base nos controles de alta concentração (30 % de ligação) e baixa concentração (70% de ligação), respectivamente. Os resultados obtidos foram corrigidos para a diluição do extrato e expressos em ng.g^{-1} de fezes.

- Análise estatística dos dados

Os indivíduos foram observados por tempos diferentes em cada fase. Portanto, foi necessário relativizar a duração de registro de cada comportamento em função do total tempo de observação por fase para realizar as análises estatísticas, conforme a fórmula abaixo:

$$P_c(i, f) = T_c(i, f) * 100 / T(i, f)$$

$P_c(i, f)$ = Duração relativa de expressão do comportamento c pelo individuo i durante a fase f (%)

$T_c(i, f)$ = Duração total de expressão do comportamento c pelo indivíduo i durante a fase f .

$T(i, f)$ = Tempo de observação do indivíduo i durante a fase f

Testamos a hipótese de que não houve diferença na duração relativa do conjunto dos comportamentos da categoria estresse entre as três fases do experimento ($n = 12$). Foram realizados testes não paramétricos de Friedman com o programa BioEstat 5.0 (2007). Quando uma diferença entre as três fases era detectada, o teste de Friedman já mostrava o pos-teste automaticamente. O mesmo teste foi empregado para verificar que não houve diferença na duração relativa de cada um dos comportamentos da categoria estresse ($n = 12$), separadamente, do comportamento brincar ($n = 12$), do conjunto de comportamentos da categoria marcação ($n = 12$) e do tempo em que os indivíduos permaneceram fora de visão ($n = 12$) entre as fases.

Testamos a hipótese de que não houve diferença no nível de atividade de cada indivíduo ($n = 12$) entre as três fases do experimento. Foi calculada a proporção do tempo que os animais passavam em atividade, definida com todos os comportamentos exceto os de descanso. Foi testado se existiu uma diferença da proporção do tempo em atividade entre as fases com o teste de Friedman.

Com intuito de testar a hipótese de que não houve diferença dos níveis de corticóides entre as fases do experimento, comparamos as concentrações dos corticóides das três espécies entre as três fases do experimento utilizando o teste de Friedman. O mesmo foi realizado para *L. pardalis* e *L. tigrinus*, separadamente.

Foram considerados picos todos os valores iguais ou maiores que a média das concentrações de corticóides fecais + 1,5 x desvio padrão, para cada espécie, em cada fase do experimento. Para o cálculo dos níveis basais foram recalculadas as médias de cada indivíduo excluindo os picos.

Com o intuito de verificar a porcentagem da ocorrência dos picos de concentrações de metabólitos de corticóides fecais em cada uma das fases, foram calculadas as porcentagens de amostras representadas por pico relacionadas ao número de amostras analisadas em cada fase para as espécies estudadas. O

mesmo foi realizado para o cálculo da porcentagem da ocorrência dos níveis basais de concentrações de metabólitos de corticóide fecal.

Com o objetivo de avaliar quanto as concentrações de corticóides fecais variaram em um mesmo indivíduo durante o experimento, foi calculado para cada animal o coeficiente de variação $(\text{desvio padrão}/\text{média}) \cdot 100$, de todas as concentrações de corticóides fecais coletadas ao longo do experimento.

Foram realizadas análises de correlação entre alguns comportamentos (estresse e lúdico) e concentrações de corticóides, de cada indivíduo em cada fase utilizando o coeficiente de correlação de Spearman. Foram utilizadas as medidas de nível basal e pico das concentrações de corticóides fecais e a duração relativa dos comportamentos de cada indivíduo em cada fase para verificar se existe relação entre estas variáveis.

RESULTADOS

Os 12 indivíduos foram observados em média (\pm desvio padrão) 14h12min23s (\pm 2h1min46s), 14h57min30s (\pm 8min40s) e 15h5s (\pm 17s) na primeira, segunda e terceira fase, respectivamente, totalizando 530 horas de observação (Tabela 4).

Tabela 4. Comportamentos da categoria estresse com suas durações relativas (%) em cada fase.

Comportamentos de estresse	Duração relativa (%) por fase		
	Antes do enriquecimento	Durante o enriquecimento	Após o enriquecimento
Duração total de observação (horas)	170h28m41s	179h30m	180h01m
Rodar a cabeça	5,91	4,02	3,19
Bote	0,67	0,24	0,13
Brincar	0,02	-	-
Chupando o rabo	2,86	1,47	3,79
Coçar-se	0,13	-	-
Coluna curva	0,17	0,03	0,55
Mostrar os dentes	0,03	0,01	-
<i>Pacing</i>	80,15	29,25	60,06
Recuar	0,42	0,05	-
Vocalizar	9,11	3,70	3,38

- Duração total dos comportamentos da categoria estresse nas três fases do experimento

Houve diferença significativa da duração relativa dos comportamentos da categoria estresse entre as fases ($p = 0,0017$) (Figuras 15 e 16).

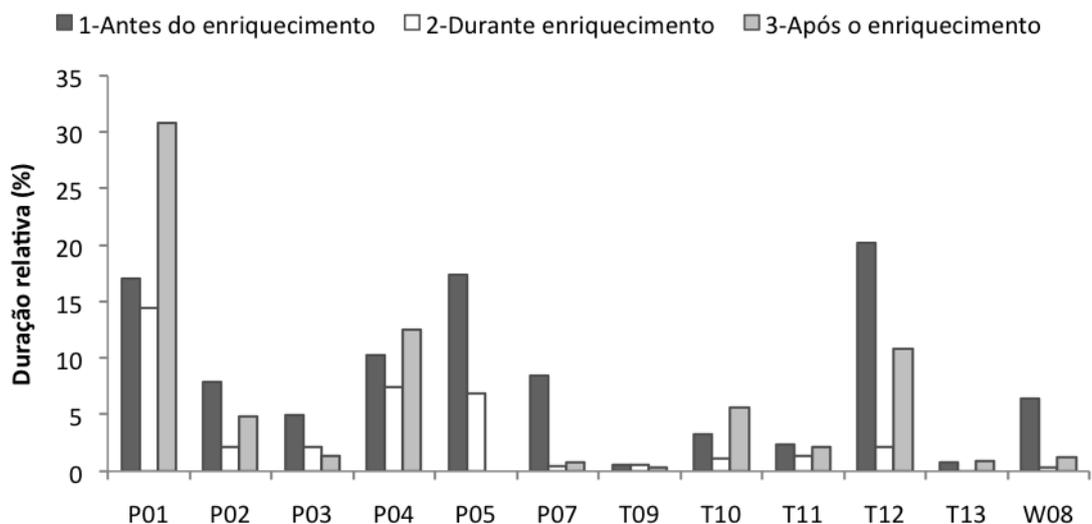


Figura 15. Duração relativa dos comportamentos da categoria estresse expressada por indivíduo ($n = 12$) em cada fase do experimento (P = *L. pardalis*, T = *L. tigrinus*, W = *L. wiedii*).

O tempo alocado à realização dos comportamentos indicadores de estresse foi significativamente menor durante a segunda fase em relação à primeira fase ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre a primeira e terceira fase ($p > 0,05$) nem entre a segunda e a terceira fase ($p > 0,05$): o tempo durante os quais os animais realizavam comportamentos indicadores de estresse não subiu novamente ao mesmo nível da primeira fase após a retirada dos enriquecimentos (Figura 16). Durante a terceira fase, a duração dos comportamentos relacionados a estresse só aumentou em dois indivíduos de *L. pardalis* (no terceiro e quarto dia), enquanto que diminuiu em quatro, e em dois destes indivíduos começou a aumentar somente no oitavo dia.

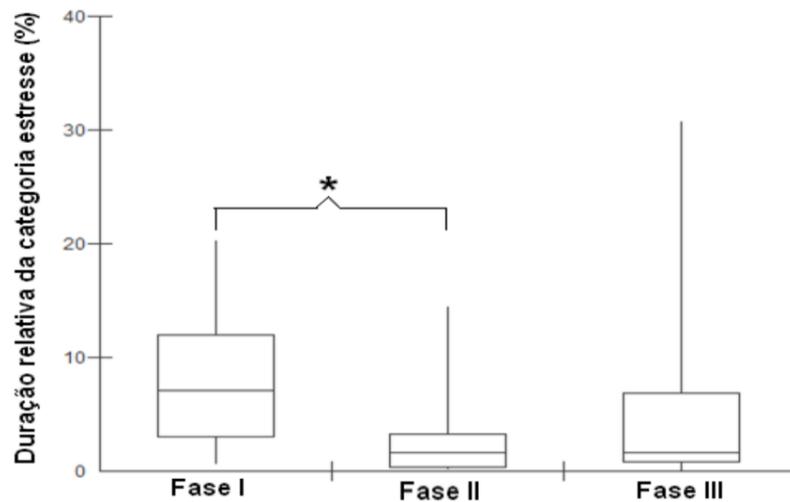


Figura 16. Box-plot das durações relativas (%) com mediana e quartis dos comportamentos da categoria estresse dos indivíduos (n = 12) nas três fases do experimento. * ($p < 0,05$).

O tempo alocado à realização de dois comportamentos da categoria estresse diminuiu significativamente entre a primeira e segunda fase: *pacing* ($p = 0,0123$) e “coçar-se” ($p = 0,0335$). O tempo alocado a realização desses comportamentos durante a terceira fase ficou intermediário entre os valores da primeira e da segunda fase ($p > 0,05$) (Figura 17). Os animais expressaram os outros comportamentos da categoria estresse durante um tempo similar durante as três fases: bote ($p = 0,2063$), curvar a coluna ($p = 0,2806$), rodar a cabeça ($p = 0,4083$), vocalizar ($p = 0,2096$), recuar ($p = 0,2691$). O comportamento chupar o rabo não foi analisado estatisticamente por ter sido observado somente em um indivíduo (P01) e mostrar os dentes por ter sido observado somente em dois indivíduos (P04 e P05) e somente em duas fases (Figura 17).

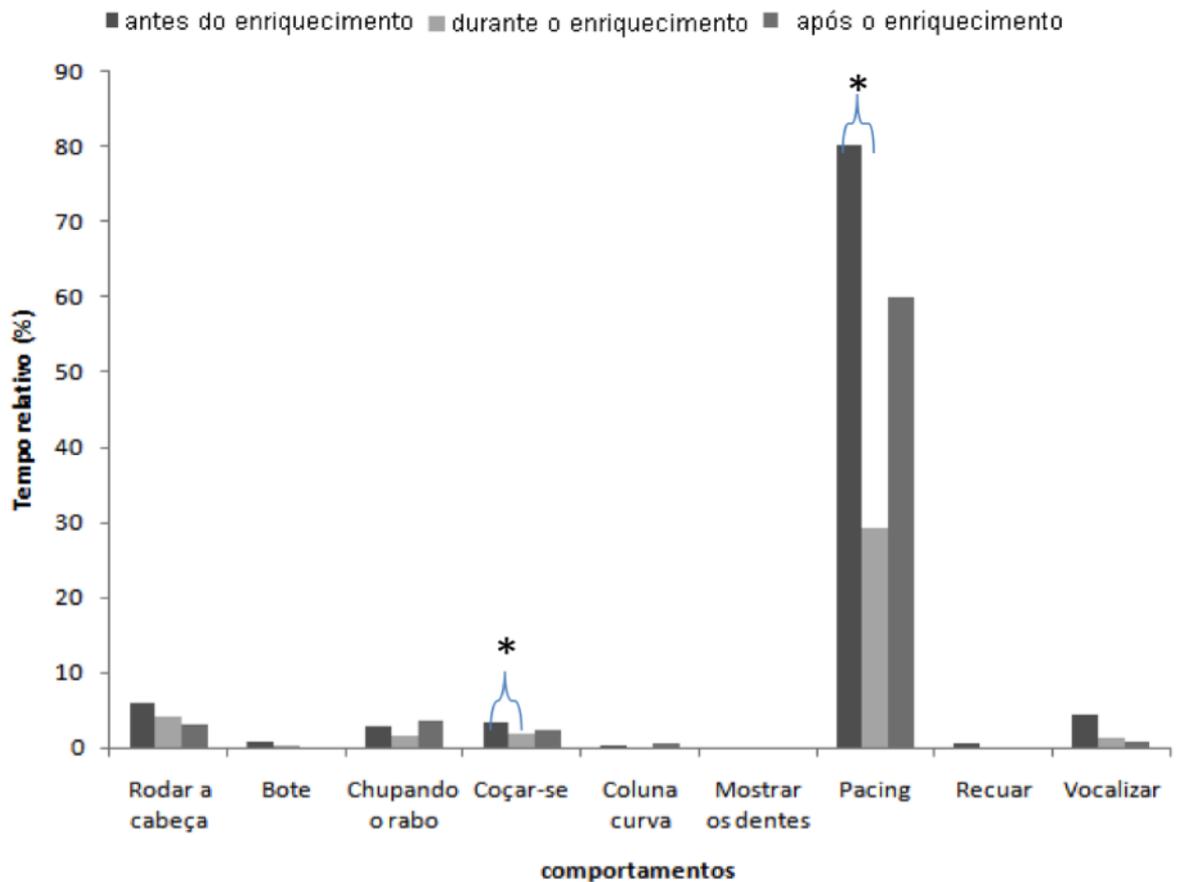


Figura 17. Duração relativa dos comportamentos da categoria estresse entre as fases observados em todos os indivíduos (n = 12).

* (p < 0,05)

- Comportamento lúdico “brincar”

Não houve diferença significativa na duração relativa do comportamento “brincar” (p = 0,097) entre as três fases do experimento (Figura 18).

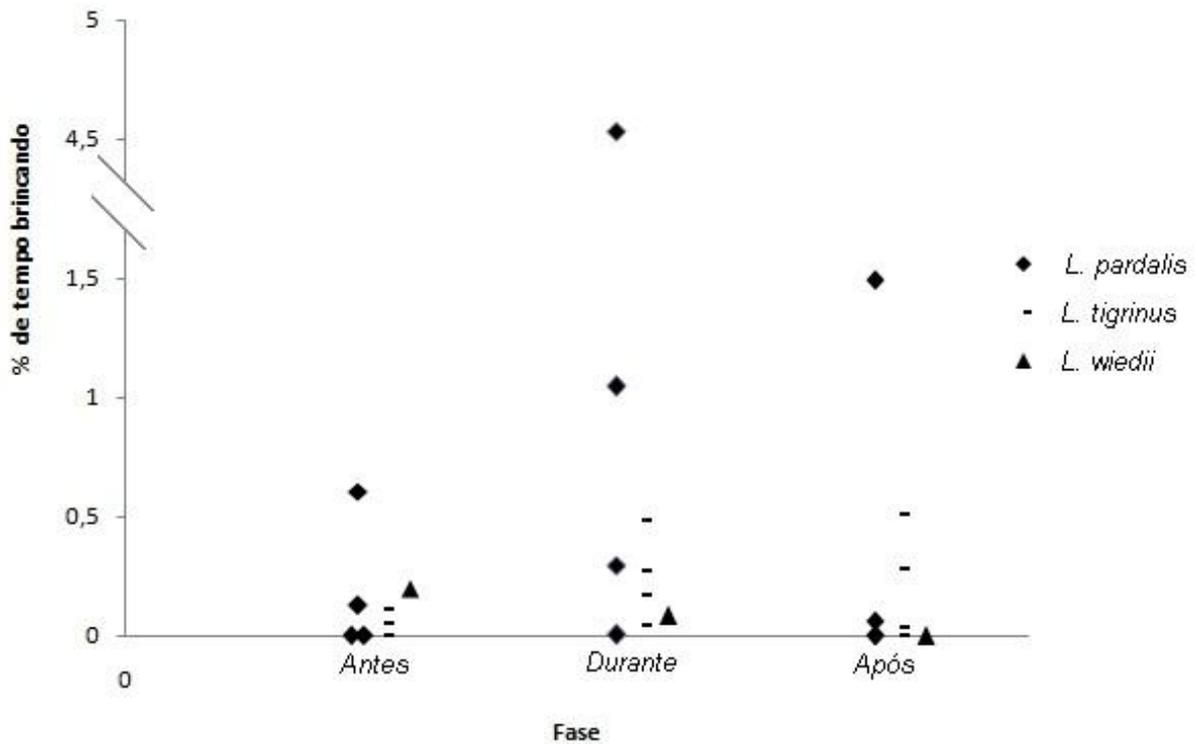


Figura 18. Duração relativa media do comportamento “brincar” nas três fases do experimento.

Os animais realizaram comportamentos de marcação ($p = 0,7788$) e ficaram fora de visão do observador ($p = 0,097$) durante tempos similares nas três fases do experimento

Houve diferença significativa na duração relativa dos comportamentos relacionados à alimentação entre as fases ($p = 0,0085$). A duração relativa dos comportamentos relacionados à alimentação foi significativamente maior na segunda fase quando comparada com a primeira fase ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre a terceira com nenhuma das outras duas fases ($p > 0,05$).

Houve diferença significativa no nível de atividade dos indivíduos entre as fases do experimento ($p = 0,0388$). O nível de atividade foi significativamente maior na primeira fase em relação à terceira fase ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre a primeira e segunda fase ($p > 0,05$) nem entre a segunda e a terceira fase ($p > 0,05$).

- Tempo de interação com cada enriquecimento

Os enriquecimentos com os quais os animais interagiram por mais tempo foram tronco (51,3%), frango congelado (11,2%), presa viva (10,2%), bóia de isopor (9,4%), garrafa plástica (9,1%) e galhos (7,3%), enquanto que todos os outros tiveram uma duração relativa abaixo de 1%.

- Variação da concentração de corticóides nas três fases do experimento (antes, durante e após o enriquecimento)

Não houve diferença significativa na concentração de corticóides fecais dos 12 felídeos entre as três fases do experimento ($p = 0,1738$) (Tabela 5). O resultado foi similar para cada espécie analisada separadamente: *L. pardalis* ($p = 0,2231$, $n = 6$) e *L. tigrinus* ($p = 0,8187$, $n = 5$). Não foi realizado um teste estatístico para *L. wiedii* entre as fases, por só ter um indivíduo. A média da concentração de corticóides fecais em cada fase deste indivíduo está na tabela 5 e os resultados da cada amostra fecal estão na Figura 21. Na primeira fase as concentrações de corticóides fecais nas fêmeas da espécie *L. pardalis* (Figura 19) foram maiores que nos machos (Figura 20).

L. pardalis foi quem apresentou uma concentração média geral de glicocorticóide fecal ($211,91 \pm 223,17$ ng/g) maior que *L. tigrinus* ($177,85 \pm 143,42$ ng/g) e *L. wiedii* ($151,29 \pm 107,03$ ng/g). Porém, as variações tanto inter-individuais quanto intra-individuais foram muito grandes, com níveis variando de 18,48 a 1983,54 ng/g entre os indivíduos de *L. pardalis* (Figura 19 e 20), e de 28,93 a 1112,84 ng/g entre os indivíduos de *L. tigrinus* (Figura 22 e 23) e dentro do mesmo indivíduo de *L. wiedii* verificamos uma variação de 31,09 à 382,01ng/g (Figura 21). As médias (\pm desvio padrão) e os coeficientes de variação das concentrações de corticóides fecais de cada indivíduo nas três fases do experimento estão apresentados na Tabela 5. Os níveis basais e picos das concentrações de corticóides fecais de cada espécie e indivíduo, em cada fase, estão representados na Tabela 6. Na primeira fase ocorreram 30,76% dos 13 picos de concentração de corticóides, 23,07% durante a segunda e 46,15% na terceira fase (Tabela 7).

Tabela 5. Média (\pm desvio padrão) e coeficiente de variação das concentrações de corticóides fecais de cada indivíduo nas três fases do experimento.

Indivíduo	Sexo	Espécie	Fase			Média geral \pm dp	Coeficiente de variação (%)
			Antes	Durante	Após		
			Média \pm dp	Média \pm dp	Média \pm dp		
1	Macho	<i>L. pardalis</i>	148,60 \pm 49,22	215,08 \pm 65,36	135,77 \pm 75,69	168,11 \pm 70,00	42
2	Fêmea	<i>L. pardalis</i>	170,89 \pm 136,81	255,89 \pm 137,89	242,31 \pm 163,03	224,96 \pm 145,17	65
3	Fêmea	<i>L. pardalis</i>	227,40 \pm 162,60	151,15 \pm 88,40	199,51 \pm 182,86	189,03 \pm 143,65	70
4	Macho	<i>L. pardalis</i>	151,45 \pm 143,35	458,77 \pm 729,14	219,95 \pm 47,18	312,51 \pm 474,06	152
5	Macho	<i>L. pardalis</i>	104,61 \pm 32,18	208,36 \pm 86,28	81,21 \pm 34,00	142,39 \pm 83,48	59
6	Fêmea*	<i>L. pardalis</i>	212,82 \pm 115,57	325,85 \pm 272,38	118,42 \pm 47,92	225,71 \pm 191,85	85
7	Macho	<i>L. wiedii</i>	175,46 \pm 142,80	156,18 \pm 110,84	125,12 \pm 88,05	151,29 \pm 107,03	71
8	Fêmea	<i>L. tigrinus</i>	144,48 \pm 44,82	169,63 \pm 99,84	118,58 \pm 126,78	152,10 \pm 80,79	53
9	Macho	<i>L. tigrinus</i>	169,73 \pm 68,25	117,45 \pm 45,62	158,55 \pm 115,09	148,58 \pm 80,08	54
10	Macho	<i>L. tigrinus</i>	124,81 \pm 37,30	121,22 \pm 67,75	169,38 \pm 83,28	139,70 \pm 64,42	46
11	Macho	<i>L. tigrinus</i>	161,72 \pm 86,64	366,70 \pm 373,38	180,75 \pm 111,00	240,78 \pm 241,96	100
12	Fêmea	<i>L. tigrinus</i>	136,35 \pm 63,13	360,52 \pm 99,75	159,12 \pm 123,93	210,43 \pm 133,34	63
Média			163,23 \pm 95,38	238,72 \pm 271,02	169,47 \pm 114,79	193,11 \pm 187,19	

* Indivíduo jovem

Tabela 6. Média do nível basal e pico das concentrações de metabólitos de corticóides fecais (ng/g de fezes) de cada espécie (*L. pardalis*, *L. wiedii* e *L. tigrinus*) e de cada indivíduo, em cada fase do experimento.

Espécies e código dos indivíduos	Amostras (n)	Fases					
		Antes do enriquecimento		Durante o enriquecimento		Após o enriquecimento	
		Nível ^a basal	Pico ^b	Nível basal	Pico	Nível basal	Pico
<i>L. pardalis</i>	94	151,89	450,10	219,80	1938,54	146,36	525,78
1	11	148,60		215,08		135,77	
2	20	170,89		255,89		162,16	482,73
3	19	156,93	509,29	151,15		130,78	611,87
4	14	151,45		162,82	1938,54	219,95	
5	14	104,61		208,36		81,21	
6	16	168,30	390,91	325,85		118,42	
<i>L. wiedii</i>	16	175,46		121,88	361,98	87,51	275,55
7	16	175,46		121,88	361,98	87,51	275,55
<i>L. tigrinus</i>	72	137,04	283,49	145,96		141,87	379,93
8	13	144,48		169,63		118,58	
9	18	149,82	269,26	117,45		116,40	369,28
10	14	124,81		121,22		169,38	
11	17	127,73	297,72	217,47	1112,84	138,79	390,57
12	10	136,35		360,52		159,12	

^a Nível basal = Todas as amostras que estavam abaixo da média das concentrações dos metabólitos de todos os indivíduos da mesma espécie + 1,5 dp (desvio padrão), em cada fase.

^b Pico = Todas as amostras maiores ou iguais a média das concentrações dos metabólitos de todos os indivíduos de mesma espécie + 1,5 dp, em cada fase.

Tabela 7. Número de amostras representadas por picos e níveis basais das concentrações de metabólitos de corticóides fecais em cada espécie estudada (*L. pardalis*, *L. wiedii* e *L. tigrinus*), em cada fase do experimento.

Espécies e código dos indivíduos	Amostras (n)	Fases					
		Antes do enriquecimento		Durante o enriquecimento		Após o enriquecimento	
		Nível basal (%)	Pico (%)	Nível basal (%)	Pico (%)	Nível basal (%)	Pico (%)
<i>L. pardalis</i>	94	23 (92)	2 (8)	34 (97)	1 (3)	31 (91)	3 (9)
<i>L. wiedii</i>	16	4 (100)	0(0)	6 (86)	1 (14)	4 (80)	1 (20)
<i>L. tigrinus</i>	72	23 (92)	2 (8)	24 (96)	1 (4)	20 (91)	2 (9)

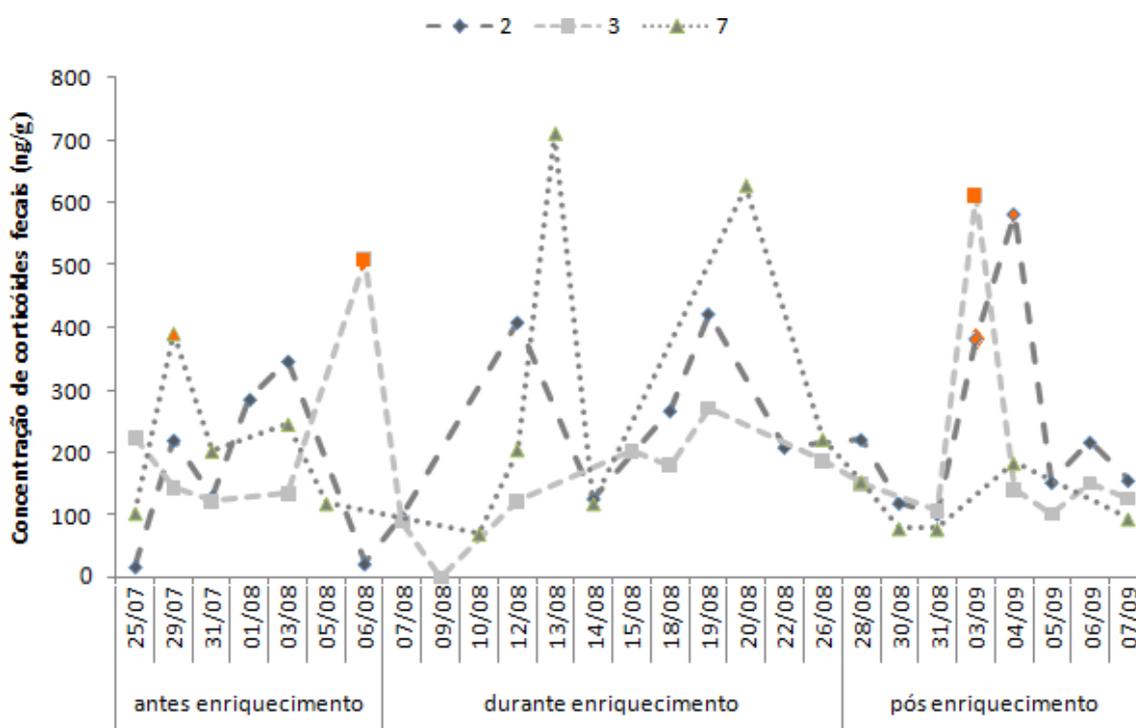


Figura 19. Concentração de corticóides fecais em fêmeas de *L. pardalis* (2 e 3 adultas e 7 jovem), alojados em recintos individuais durante as fases do experimento realizado no Centro de reabilitação de pequenos felídeos. Pontos laranja no gráfico representam os picos de cada fase do experimento.

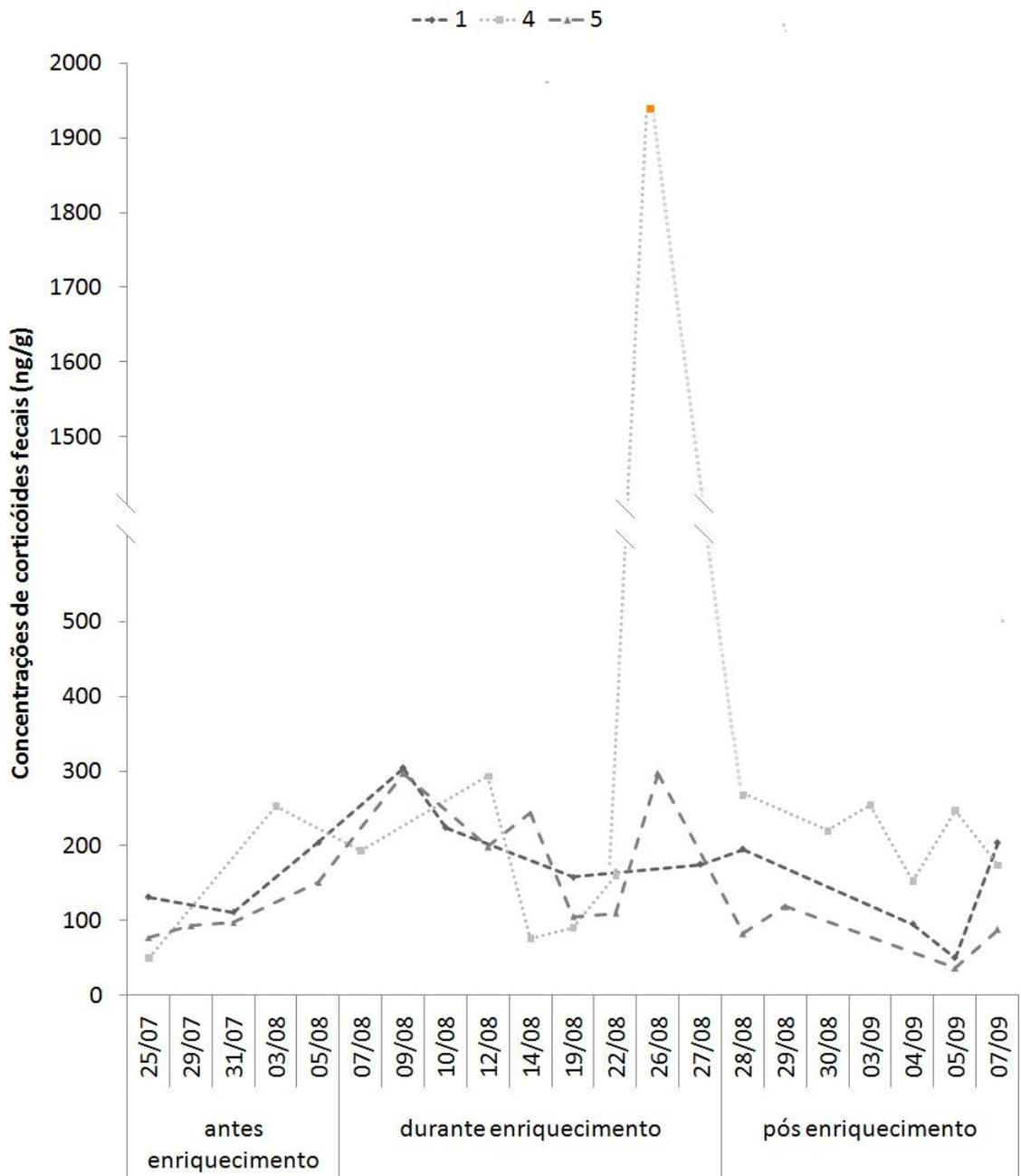


Figura 20. Concentração de corticóides fecais em machos adultos de *L. pardalis* (1, 4 e 5), alojados em recintos individuais durante as fases do experimento realizado no Centro de reabilitação de pequenos felídeos. Ponto laranja no gráfico representa o pico ocorrido durante o experimento.

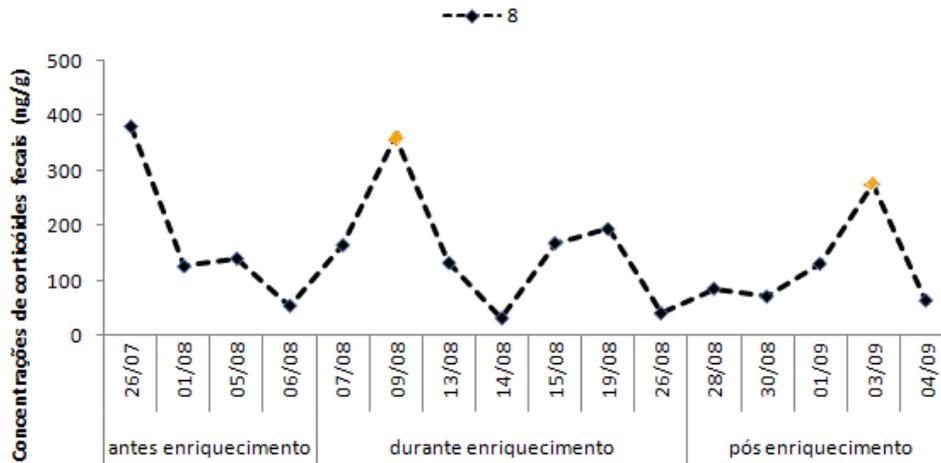


Figura 21. Concentração de corticóide fecal em um macho adulto de *L. wiedii* (8), alojado em recinto individual durante as fases do experimento realizado no Centro de reabilitação de pequenos felídeos. Pontos laranja no gráfico representam os picos ocorridos em cada fase do experimento.

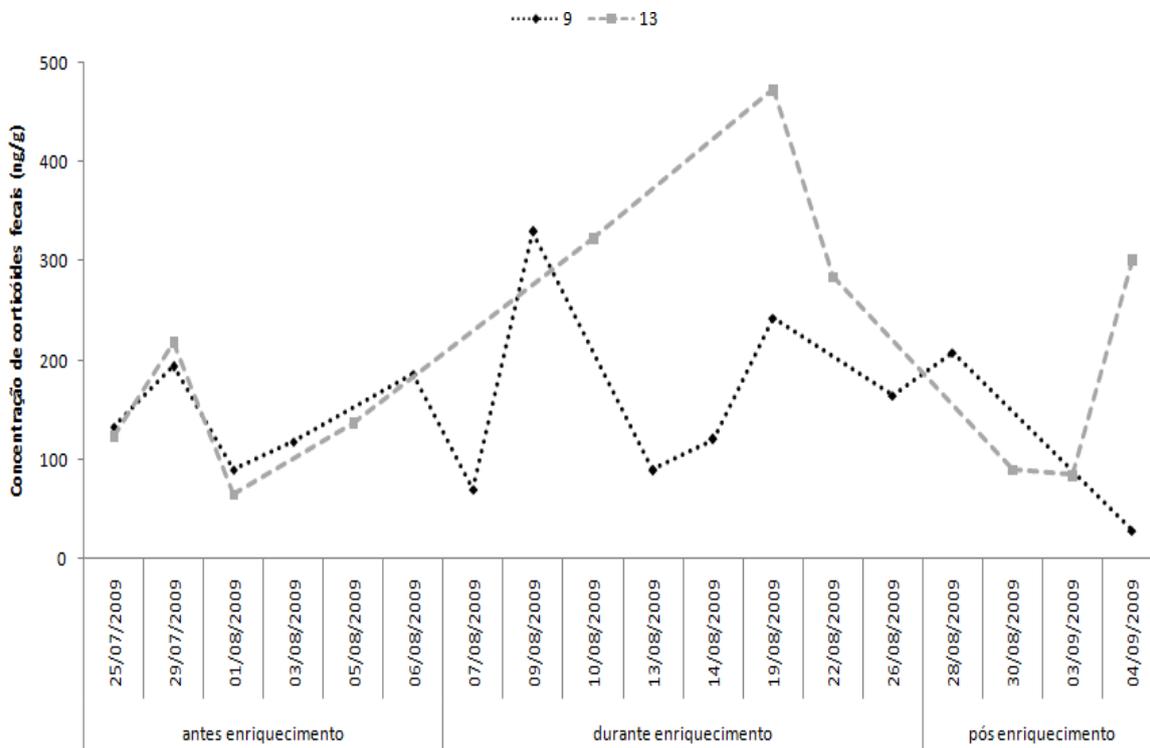


Figura 22. Concentração de corticóides fecais em duas fêmeas adultas de *L. tigrinus* (9 e 13), alojadas em recintos individuais durante as fases do experimento realizado no Centro de reabilitação de pequenos felídeos.

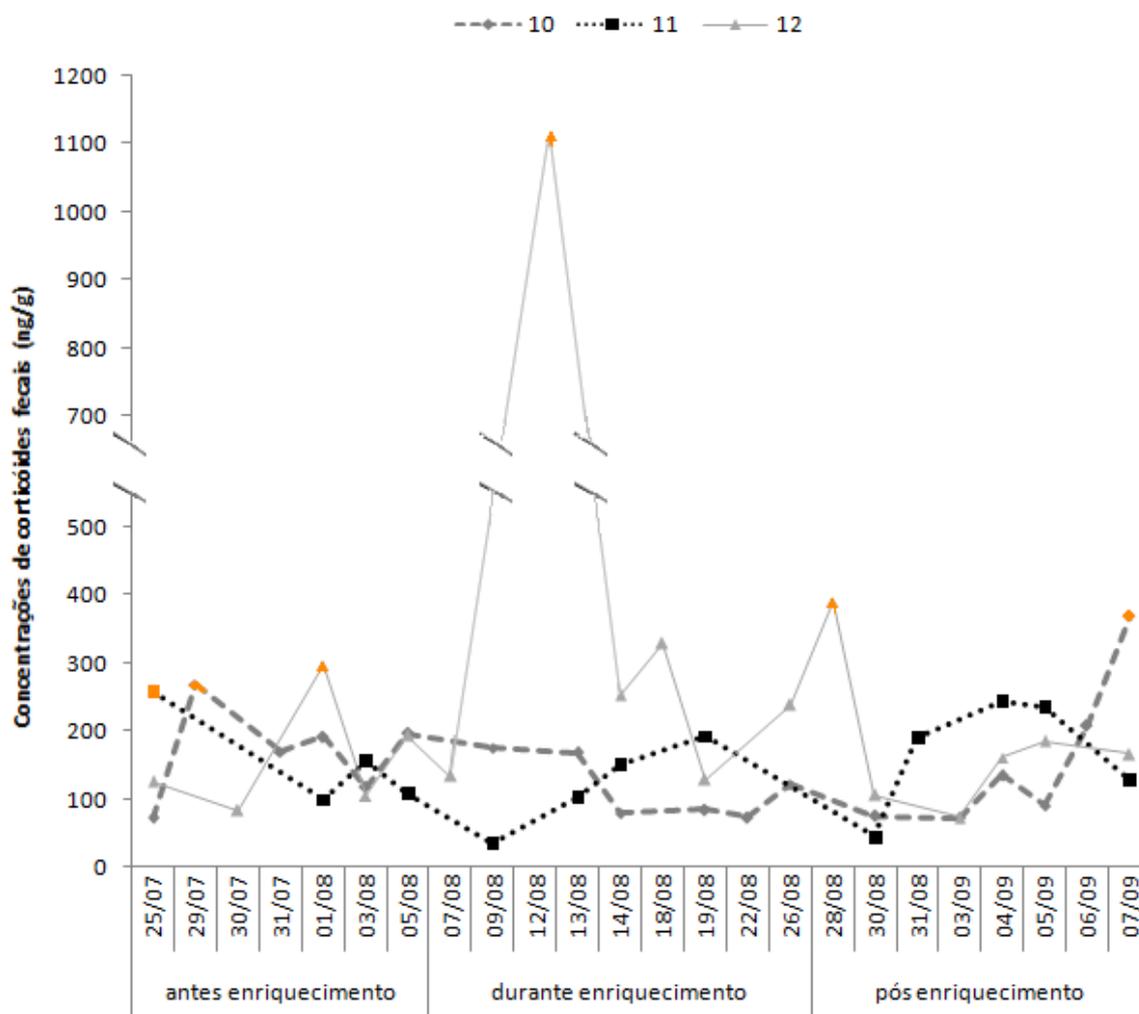


Figura 23. Concentração de corticóides fecais em três machos adultos de *L. tigrinus* (10, 11 e 12), alojados em recintos individuais durante as fases do experimento realizado no Centro de reabilitação de pequenos felídeos. Pontos laranja no gráfico representam os picos ocorridos em cada fase do experimento.

- Correlação dos níveis basais e picos das concentrações de corticóides com os comportamentos relacionados ao estresse, à alimentação e à brincar nas três fases do experimento

Todas as correlações realizadas entre concentrações de corticóides e os comportamentos em cada fase encontram-se na tabela 8.

Na primeira fase houve correlação negativa significativa entre o nível basal de corticóide fecal e a duração relativa do comportamento de coçar ($r_s = -0,6573$, $p = 0,0201$) e de rodar a cabeça ($r_s = 0,6862$, $p = 0,0137$) e uma correlação positiva significativa entre o nível basal de corticóide fecal e a duração relativa do comportamento vocalizar ($r_s = 0,6643$, $p = 0,0184$).

Na segunda fase houve correlação positiva significativa entre o nível basal das concentrações de corticóides e a duração relativa dos comportamentos relativos à marcação ($r_s = 0,6294$, $p = 0,0283$), Apesar de não ter havido uma correlação significativa ($r_s = 0,5324$, $p = 0,0747$), houve uma correlação de 53,24% entre pico de corticóide fecal e comportamentos relacionados à alimentação.

Na terceira fase houve correlação positiva significativa entre o nível basal das concentrações de corticóides e a duração relativa dos comportamentos *padding* ($r_s = 0,7817$, $p = 0,0027$) e coçar ($r_s = 0,6573$, $p = 0,0201$).

Tabela 8. Correlações de Spearman entre os níveis basais e picos das concentrações de corticóides fecais e as durações relativas dos comportamentos dos indivíduos do estudo (n = 12) em cada fase (antes, durante e após o enriquecimento).

Comportamento	rs e p	Fase I		Fase II		Fase III	
		Nível basal	Pico	Nível basal	Pico	Nível basal	Pico
Pacing	rs	-0,480	-0,515	0,106	-0,028	0,782	-0,338
	p	0,114	0,087	0,744	0,932	0,003	0,283
Coçar	rs	-0,657	-0,150	-0,025	0,401	0,657	-0,070
	p	0,020	0,642	0,940	0,196	0,020	0,828
Bote	rs	-0,188	0,293	-0,027	-0,325	0,234	-0,009
	p	0,557	0,355	0,932	0,302	0,464	0,979
Curvar a coluna	rs	-0,521	0,080	0,075	-0,254	0,281	-0,113
	p	0,082	0,805	0,816	0,426	0,377	0,726
Rodar a cabeça	rs	-0,686	0,060	-0,316	0,098	0,162	0,014
	p	0,014	0,852	0,317	0,761	0,614	0,966
Vocalizar	rs	0,664	0,279	0,218	-0,028	0,444	0,141
	p	0,018	0,380	0,495	0,932	0,148	0,661
Marcação	rs	-0,182	-0,195	0,629	0,165	-0,098	0,101
	p	0,572	0,542	0,028	0,608	0,762	0,754
Alimentar	rs	-0,106	0,162	-0,231	0,532	-0,063	0,055
	p	0,743	0,616	0,470	0,075	0,846	0,866
Brincar	rs	0,262	0,011	0,310	-0,369	0,390	-0,139
	p	0,411	0,973	0,327	0,238	0,210	0,666

rs = coeficiente de Spearman; p = valor de probabilidade

DISCUSSÃO

Animais em cativeiro são expostos a ambientes caracterizados por possibilidade de deslocamento limitada em um espaço reduzido, uma proximidade forçada com humanos, e alimentação pouco diversa (Morgan e Tromborg, 2007). Estas condições podem ser verificadas tanto em zoológicos quanto em centros de reabilitação e triagem, onde pesquisas são raramente conduzidas. As más condições ambientais destes centros podem levar os animais a um estado de estresse crônico, verificado através de índices comportamentais e fisiológicos,

podendo interferir na funcionalidade do sistema imune e na reabilitação destes animais (Fox et al., 2006).

Os indivíduos que estudamos apresentaram comportamentos indicadores de mudanças psicológicas e/ou fisiológicas (Vickery e Mason, 2003; Mason et al., 2007), tais como coçar-se em excesso, *padding*, girar a cabeça, entre outros. Coçar-se é considerado indicador de resposta a estresse agudo em gatos (van den Bos, 1998) enquanto *padding*, observado também por Wielebnowski et al. (2002a; 2002b), Carlstead e Brown (2005) e Mason et al. (2007) e girar a cabeça são comportamentos estereotipados.

O comportamento estereotipado girar a cabeça não foi citado nos trabalhos revisados sobre felídeos. Entretanto, um comportamento indicativo de estresse semelhante a este foi observado em gatos domésticos por van den Bos (1998). Este comportamento caracterizava-se por um movimento rápido da cabeça de um lado para o outro, enquanto que o comportamento observado neste estudo consistia em girar a cabeça em movimentos circulares.

Os comportamentos estereotipados são indicadores de bem-estar reduzido (Wielebnowski et al., 2002a; Shepherdson et al., 2004), constituindo uma das categorias de comportamentos anormais prevalentes em estudos de animais silvestres em cativeiro como, por exemplo, girafas e okapis (Bashaw et al., 2001; Swaisgood e Shepherdson, 2005), primatas (Boinski et al., 1999), urso polar (Shepherdson et al., 2004; Vickery e Mason, 2004), leopardos (Shepherdson et al., 2004) e carnívoros em geral (Swaisgood e Shepherdson, 2005; Clubb e Mason, 2007; Mason et al., 2007).

A duração relativa da categoria estresse diminuiu significativamente na segunda fase quando comparada com a primeira. A diminuição de comportamentos relacionados a estresse durante o enriquecimento ambiental já foi registrada em estudos com diversas espécies de gatos selvagens (McPhee, 2002; Bashaw et al., 2003; Swaisgood e Shepherdson, 2005; Skibieli et al., 2007), bem como de outros mamíferos (Swaisgood e Shepherdson, 2005; Cummings et al., 2007). De acordo com Shyne (2006) e Clubb e Mason (2007), os comportamentos estereotipados

raramente são completamente abolidos, mesmo após a introdução de enriquecimentos no ambiente.

A reação comportamental de um animal a qualquer mudança ambiental (introdução, alteração ou retirada de enriquecimentos) não é imediata: o prazo de alteração comportamental varia de um indivíduo para outro. A duração relativa dos comportamentos da categoria estresse durante a terceira fase não diferiu significativamente das fases anteriores. Quando retiramos os enriquecimentos, ela diminuiu em três indivíduos e aumentou para os nove outros animais, mas sem alcançar a duração relativa dos comportamentos de estresse observados antes do enriquecimento. A terceira fase foi realizada em nove dias: um período de amostragem maior poderia ter resultado no registro de um aumento da duração relativa dos comportamentos de estresse. Nesta fase, a duração dos comportamentos relacionados a estresse aumentou em dois indivíduos de *L. pardalis* no terceiro e quarto dia e dois no oitavo. Todavia, o retiro dos enriquecimentos induziu o aumento dos comportamentos indicadores de estresse somente após alguns dias em alguns animais, não aumentando até o último dia do experimento em outros.

Quando analisados separadamente, apenas as durações dos comportamentos *pacing* e coçar-se diminuíram significativamente na fase de enriquecimento, quando comparadas com a primeira fase.

Pacing foi apresentado por todos os indivíduos do nosso estudo. Foi o comportamento estereotipado mais comumente registrado em 25 estudos sobre comportamentos estereotipados e enriquecimento ambiental analisados por Swaisgood e Shepherdson (2005). Foi o comportamento mais prevalente em girafas (*Giraffa camelopardalis*) e okapis (*Okapi johnstoni*) no estudo de Bashaw et al. (2001).

Clubb e Mason (2003, 2007) defendem a hipótese de que em carnívoros as características ambientais (por exemplo, tamanho do recinto inadequado) causam *pacing* mais do que outros fatores, como a alimentação. Mason et al. (2007) realizaram uma ampla análise dos comportamentos estereotípicos em carnívoros em

zoológicos e centros de reprodução e concluíram que o *pacing* é uma resposta do animal a frustração por não poder desenvolver um hábito natural de forrageamento.

De acordo com Clubb e Mason (2007) em carnívoros a incidência de comportamentos estereotipados em cativeiro está correlacionada ao tempo de atividade em meio natural. Felídeos em geral passam a maior parte do tempo de atividade percorrendo sua área de vida e caçando (Pontes e Chivers, 2007). Assim, a ocorrência de *pacing* em felídeos cativos pode ser explicado tanto pelas possibilidades limitadas do animal se deslocar o quanto faria em uma área de vida natural geralmente grande, como pela incapacidade de caçar presas.

O tamanho do cativeiro como fator de estresse é motivo de debate entre pesquisadores que chegaram a conclusões divergentes. Kaufman et al. (2004) relatam que o aumento do recinto de algumas espécies de macacos não teve efeito algum na expressão dos comportamentos individuais de estresse. Em outros casos, o aumento do recinto resultou na diminuição de comportamentos anormais (Draper e Bernstein, 1963; Paulk et al., 1977) mas também na diminuição de comportamentos de brincadeira, enquanto que comportamentos estereotipados aumentavam (Goerke et al., 1987). Clubb e Mason (2003, 2007) encontraram uma correlação positiva entre tamanho da área natural e a ocorrência de *pacing* em cativeiro das mesmas espécies. Os mesmos autores detectaram também uma correlação positiva entre o tamanho de área natural e a mortalidade infantil em carnívoros cativos, evidenciando a importância de oferecer recintos de tamanho suficiente para as espécies com ampla área de vida. Morgan e Tromborg (2007) relataram que a qualidade das condições ambientais é até mais importante que o tamanho do recinto para espécies selvagens em cativeiro.

A duração relativa do comportamento *pacing* durante a fase de enriquecimento ambiental diminuiu para todos os indivíduos que estudamos, com exceção de um macho de *L. tigrinus*. Swaisgood e Shepherdson (2005) encontraram uma diminuição de *pacing* durante o uso de enriquecimentos em 53% dos estudos que eles revisaram. Forthman et al. (1992), Carlstead et al. (1993), Shepherdson et al. (1993), Wielebnowski et al. (2002a) e Bashaw et al. (2003) também notaram uma redução do comportamento de *pacing* em ursos e felinos durante o uso de

enriquecimentos. Se a expressão de comportamentos estereotipados indica uma deficiência na relação do animal com o ambiente, uma diminuição do tempo alocado à realização destes comportamentos indica um aumento do bem-estar dos animais. Bashaw et al. (2001) e Tarou et al. (2003) chegaram a conclusões semelhantes.

Os animais ficaram menos ativos durante a segunda fase em relação à primeira e ainda menos ativos durante a terceira fase. Alguns autores defendem que o aumento do nível de atividade é um indício de bem-estar (Bashaw et al., 2003; Skibieli et al., 2007). Outros autores, que obtiveram resultado semelhante ao nosso com lobos (*Canis lupus baileyi* e *Canis lupus lupus*), afirmam o contrário, explicando que um nível de atividade menor é indício de bem estar por refletir o comportamento natural do animal (Bernal e Packard, 1997; Frézard e Le Pape, 2003). Frézard e Le Pape (2003) sugerem que lobos em ambiente natural ficam mais tempo descansando do que em atividade quando tiverem escolha. Bernal e Packard (1997) verificaram que lobos em recintos sem enriquecimento tinham um nível de atividade maior que os que viviam em ambiente natural. De acordo com Cummings et al (2007) lobos pouco ativos em cativeiro podem estar se comportando mais naturalmente que os mais ativos. Logo, o nível de atividade comportamental não é um bom indicador de bem estar e baixo nível de estresse para essa espécie.

O nível de atividade não diminuiu significativamente entre a primeira e a segunda fase porque, apesar da redução significativa do *pacing*, houve interação com os enriquecimentos que contribuíram para manter o nível de atividade. Portanto, a redução do nível de atividade pode ser indicador de bem-estar para pequenos gatos selvagens, assim como o observado para lobos. Todavia, o nível de atividade continuou diminuindo da segunda para a terceira fase apesar do aumento atenuado do *pacing* devido a ausência de interação com os enriquecimentos.

Não houve diferença significativa do tempo em que os indivíduos ficaram fora de visão entre as fases do nosso estudo enquanto Forthman et al. (1992), Carlstead et al. (1993), Shepherdson et al. (1993), Wielebnowski et al. (2002a) e Bashaw et al. (2003) encontraram uma redução do tempo em que ursos (*Ursus ursinus*) e diversas espécies de felídeos estavam fora de visão durante o uso de enriquecimentos.

Verificamos que o uso de vários enriquecimentos utilizados ao mesmo tempo (*everything-but-the-kitchen-sink*, senso Swaisgood e Shepherdson, 2005; Swaisgood *et al.*, 2006; Skibieli *et al.*, 2007) é um meio de melhorar o bem-estar de animais cativos. A diminuição da ocorrência de comportamentos da categoria estresse na fase de enriquecimento, principalmente o *padding*, confirma a hipótese de que a introdução simultânea de vários tipos de enriquecimento ambiental diminui a duração de comportamentos de estresse e aumenta o bem estar dos pequenos felídeos em cativeiro. Sugerimos a realização de estudos complementares abrangendo fases de enriquecimento e pós-enriquecimento de maior duração para confirmar esses resultados.

Na terceira fase, foram observados os comportamentos e coletadas as amostras fecais por somente nove dias, não observando o aumento da duração relativa de *padding* ao mesmo nível da primeira fase. Se esta fase fosse mais longa poderíamos ter verificado se os animais responderiam aumentando a duração de comportamentos de estresse e o nível de cortisol.

Aconselhamos aos zoológicos, centros de reabilitação e parques utilizarem este tipo de método de enriquecimento, oferecendo uma condição maior de bem estar aos animais. Sugerimos também que as metodologias de uso de vários enriquecimentos ao mesmo tempo sejam aperfeiçoadas para verificar quais tipos de enriquecimentos oferecem maior bem estar aos indivíduos das espécies em estudo.

Mellen e MacPhee (2001) e Morgan e Tromborg (2007) relatam que o maior estressor para o animal silvestre em cativeiro é a situação que ele não pode controlar ou da qual não pode escapar. O enriquecimento ambiental pode prover ao animal maior controle sobre o ambiente e possibilidade de escapar de situações adversas. Verificamos que a introdução de determinados enriquecimentos alterou o comportamento e o bem-estar dos animais: os felídeos interagiram mais com os troncos do que os outros enriquecimentos introduzidos. Este enriquecimento possibilitou aos gatos selvagens ficar em local mais alto dentro do recinto, simulando situação semelhante ao ambiente natural onde o animal pode subir em árvores para escapar de predadores ou espreitar presas.

A luz do sol pode bater diretamente no recinto certas horas do dia, produzindo temperatura e luminosidade demasiada para os animais. Galhos com folhagens providenciam proteção contra o calor excessivo, podendo também funcionar como isolante térmico em caso de baixas temperaturas, proporcionando termorregulação e sombra (Langman et al., 1996; Morgan e Tromborg, 2007). Os animais usaram os galhos para se proteger do calor e da luz, ficando deitados embaixo destes ao invés de ficarem expostos diretamente ao sol. Essas situações não foram anotadas sistematicamente porque privilegiamos o registro das interações envolvendo contato do animal com cada enriquecimento, como por exemplo, quando eles brincavam, escalavam ou mastigavam os galhos. Pequenas mudanças que refletem na temperatura do ambiente e conseqüentemente na termorregulação do indivíduo podem contribuir significativamente tanto no comportamento quanto no bem-estar dos indivíduos (Morgan e Tromborg, 2007).

Clubb e Mason (2007) e Mason et al. (2007) afirmam que *pacing* decorre da impossibilidade de desenvolver o hábito de forrageamento (Mason et al., 2007; Clubb e Mason, 2007). Para carnívoros que desempenham busca ativa por presas como um hábito natural, o fato de não poder desenvolver comportamentos de caça no cativeiro torna-se frustrante, ocasionando assim comportamentos estereotipados (Terlouw et al., 1991; Mason e Mendl, 1997).

Dois dentre os enriquecimentos com os quais os indivíduos interagiram por mais tempo estão relacionados à alimentação: o oferecimento tanto do frango congelado e pendurado no teto quanto de presas vivas aumentou significativamente a duração relativa dos comportamentos de alimentação durante a fase de enriquecimento.

A variação tanto espacial quanto temporal do oferecimento do alimento influenciou o forrageamento em raposas, aumentando o tempo que os animais alocavam à expressão de comportamentos relacionados à alimentação (Kistler et al., 2009). O mesmo tipo de enriquecimento quase extinguiu o *pacing* realizado por ursos-negros (*U. americanus*) (Carlstead e Seidensticker, 1991).

Diversos estudos compararam os efeitos do modo de oferecimento de alimento sobre o comportamento de felídeos. O oferecimento de carcaça inteira

diminuiu a ocorrência de comportamentos estereotipados *P. pardus pardus*, *P. leo* e *P. uncia* e aumentaram a expressão de comportamentos relacionados à alimentação (McPhee, 2002). O oferecimento de peixe vivo aumentou a variedade e frequência dos comportamentos relacionados à alimentação e reduziu comportamentos estereotipados em tigres (Bashaw et al., 2003). Quando ofertado peixe congelado, *P. tigris*, *L. pardalis*, *P. onca*, *P. concolor*, *A. jubatus*, *P. leo* foram mais ativas, enquanto *P. concolor*, *P. leo*, *L. pardalis* e *P. tigris* realizaram *pacing* durante menos tempo até sete dias depois da remoção deste enriquecimento (Skibieli et al., 2007). O oferecimento de ossos aumentou a atividade em *L. pardalis* e *P. tigris* (Skibieli et al., 2007) e reduziu comportamentos estereotipados para *P. leo* e *P. tigris* (Bashaw et al., 2003).

Em ambiente natural, os animais não têm previsão do horário, local ou tipo de presa que irão caçar, portanto oferecer alimento de maneira imprevisível pode contribuir ao aumento do bem-estar.

Kistler et al. (2009) compararam os efeitos sobre o comportamento de raposas de uma rotina convencional de oferecimento do alimento (horário e espaços preditos) com o oferecimento de alimento em horários e locais diversificados. O manejo alimentar aleatório aumentou o tempo dos comportamentos de forrageamento quando comparado à rotina convencional, indicando que este tipo de enriquecimento pode estimular comportamentos naturais.

Odores podem ser tanto uma fonte de estresse, quando oriundos de predadores naturais ou animais da mesma espécie (Morgan e Tromborg, 2007), quanto utilizados como enriquecedor ambiental (Jones et al., 2002; Wells e Egli, 2004), com intuito de reduzir comportamentos que indicam estresse (Jones et al., 2002; Wells e Egli, 2004).

Devido à maioria das espécies de mamíferos utilizarem o sistema olfatório como fonte fundamental de informação (Slotnick et al., 2005), trabalhos com fontes de odores têm sido realizados em cativeiro para promover uma diminuição de comportamentos que indicam estresse (Powell, 1995; Skibieli et al., 2007). A proporção do comportamento *pacing* diminuiu em 21% com a apresentação de

canela, pimenta em pó e cominho (borrifado no chão) para 14 indivíduos das espécies *P. tigris*, *P. onca*, *P. concolor*, *A. jubatus* e *P. leo* (Skibieli et al. 2007).

Apesar de terem sido ofertados tanto canela em pau quanto cravo-da-índia, os indivíduos interagiram muito pouco com a canela em pau e nenhum animal interagiu com os cravos-da-índia durante as sessões de observação. Todavia, um indivíduo da espécie *L. tigrinus* (macho adulto) foi observado em diferentes ocasiões cheirando, brincando e se rolando nos cravos fora das sessões de observação. Os indivíduos de *L. tigrinus* percebiam o odor dos cravos, mas talvez não era atrativo para os outros indivíduos. Na ausência total de interação dos indivíduos de *L. pardalis* e *L. wiedii* com os cravos, não sabemos se eles não perceberam ou não foram atraídos por esse enriquecimento. Este resultado pode ter ocorrido também devido ao oferecimento dos temperos em pedaços, enquanto no estudo de Skibieli et al. (2007) os temperos estavam em pó, exalando os odores com maior intensidade. Skibieli et al. (2007) não relataram interações dos animais com os enriquecimentos, mas somente alterações comportamentais quando oferecidos os enriquecimentos. Ademais, oferecemos diferentes tipos de enriquecimento ao mesmo tempo, facilitando uma dispersão de atenção dos indivíduos, enquanto que Skibieli et al. (2007) ofereceram os temperos sem a presença de outro tipo de enriquecimento. É essencial que mais estudos sejam realizados para identificar os odores que aumentam e diminuem o bem-estar aos animais em cativeiro.

Estudar o comportamento e a fisiologia relacionados a estresse nos permite compreender o que causa o bem-estar animal e os efeitos do enriquecimento ambiental (Swaisgood e Shepherdson, 2005). Verificamos que um ambiente propiciando novas fontes de informações oferece oportunidade para os animais desenvolverem comportamentos exploratórios (Cummings et al., 2007) e estimula a cognição (Laule e Desmond, 1998). Programas em zoológicos e principalmente em centros de reabilitação deveriam ser desenvolvidos para oferecer as condições favoráveis ao bem estar dos animais alojados. É obrigação legal da sociedade envolvida com manejo e pesquisa com animais silvestres pelo menos tentar aumentar o bem estar, e com a introdução dos enriquecimentos é um meio para que isto aconteça. Mais estudos precisam ser realizados nesta área e desenvolver um método de análise verificando como cada enriquecimento causa impacto no

comportamento e fisiologia do animal é essencial para trazer maior conhecimento na área de bem estar animal.

O interesse e preocupação dos pesquisadores e outros profissionais com o bem estar dos animais selvagens em cativeiro cresceram nos últimos anos. Aumentou assim a demanda de métodos não-invasivos permitindo analisar o estresse decorrente de práticas de manejo e condições ambientais inadequadas (Young et al., 2004; Acorsi et al., 2008). Pesquisas sobre o manejo de carnívoros em cativeiro têm criado a oportunidade de juntar informações científicas detalhadas sobre a biologia das espécies para que sejam desenvolvidas estratégias visando minimizar o estresse em cativeiro (Young et al., 2004).

A melhoria da saúde e bem estar de carnívoros requer a identificação das condições ambientais e práticas de manejo que são estressantes para os animais (Young et al., 2004). Durante situações de estresse, repostas endócrinas envolvendo glicocorticóides e catecolaminas são desencadeadas para adequar o indivíduo a escapar ou enfrentar tais situações (Mostl e Palme, 2002). Devido à atuação do cortisol sobre o estado fisiológico, imunológico e reprodutivo dos organismos, as análises dos níveis de metabólitos de glicocorticóides que são excretados no corpo dos animais podem ser uma ferramenta valiosa para auxiliar estudos de bem estar animal, etologia, ecologia evolutiva e biologia da conservação (Goymann et al., 1999; Mostl e Palme, 2002).

As medidas de níveis de glicocorticóides servem de parâmetro da atividade e/ou dos distúrbios das adrenais (Wielebnowski et al., 2002a; 2002b). Entretanto, amostras fecais oferecem a vantagem de serem facilmente coletadas de modo não-invasivo, pois os animais não precisam ser capturados ou manuseados, evitando o estresse decorrente de eventos de captura que podem confundir ou dificultar as análises (Mostl e Palme, 2002; Acorsi et al., 2008). Ademais, amostras fecais contendo metabólitos de cortisol são um indicador da atividade adrenocortical nos animais que podem ser conservadas por um tempo longo e usadas em estudos longitudinais (Mostl e Palme, 2002; Young et al., 2004).

Muitas amostras podem ser obtidas do mesmo indivíduo (Goymann et al., 1999; Harper e Austad, 2000), e metabólitos de corticóides fecais provêm frações

agrupadas de níveis de cortisol (Goymann et al., 1999). Em geral, cerca de 85% dos hormônios esteróidais aparecem como metabólitos nas fezes de 12 a 24 horas depois da secreção (Brown et al., 2001), e devido a este tempo de agrupação dos glicocorticóides antes da excreção, o monitoramento de esteróide fecal pode ser mais apropriado para avaliar atividade adrenal longitudinal em felídeos do que através de outras vias de fluidos ou excretas (Wielebnowski et al., 2002a). Estudos anteriores demonstram que as concentrações de cortisol fecal refletem corretamente as respostas da adrenocortical para os felídeos (Brown et al., 1994; Mostl e Palme, 2002; Wielebnowski et al., 2002a; 2002b).

Não houve diferença significativa nas concentrações de corticóides fecais entre as três fases do nosso experimento para *L. pardalis* e *L. tigrinus*. Não foi possível comparar estatisticamente o nível de cortisol de *L. wiedii* entre as fases por se tratar de apenas um indivíduo. Houve muitas oscilações nas concentrações de cortisol fecal ao longo das três fases para todas as espécies, como ilustrado nas figuras 19 – 23.

Nosso estudo apresenta resultados contrastantes com o trabalho de Moreira et al. (2007). Esses autores verificaram que a mudança de um recinto grande e enriquecido (primeira fase) para um recinto pequeno e não-enriquecido (segunda fase) resultou no aumento dos níveis de cortisol fecal de *L. tigrinus*. Ademais, as médias de cortisol em fêmeas de *L. tigrinus* diminuíram quando os recintos pequenos foram enriquecidos (terceira fase). Diferentemente de *L. tigrinus*, o nível de cortisol fecal das fêmeas de *L. wiedii* também estudadas pelos mesmos autores aumentou tanto na segunda quanto na terceira fase, mesmo com o enriquecimento ambiental dos recintos pequenos.

Os recintos considerados pequenos na segunda e terceira fase do estudo de Moreira et al. (2007) de 3,43 x 1,61 x 2,0 m, tinham aproximadamente o tamanho dos recintos de nosso estudo (3,5 x 2,0 x 3,0 m), permitindo a comparação das situações a que foram submetidos os animais nestas fases com as duas primeiras fases do nosso estudo. Todavia, no estudo de Moreira et al. (2007), os animais foram removidos de um recinto grande e enriquecido para um recinto pequeno e vazio. A mudança e diminuição da complexidade do ambiente, e a restrição de

movimento pode ter tido um impacto psicológico nos animais maior do que em nosso estudo, onde a segunda fase consistiu em enriquecimento do recinto onde os animais já estavam. Essa diferença pode explicar os maiores picos de cortisol registrados por Moreira et al. (2007) na segunda fase (recinto pequeno e vazio) do seu estudo.

Wielebnowski et al. (2002a) não evidenciaram correlação entre tamanho de recintos e concentração de corticóide fecal em estudo com leopardos. Moreira et al. (2007) encontraram relação entre o aumento das concentrações de corticóides fecais e a transferência dos indivíduos das espécies *L. wiedii* e *L. tigrinus* de um recinto grande para um pequeno.

A introdução semanal de novos enriquecimentos provocou um aumento do nível de cortisol para *L. pardalis* em geral, variou entre os indivíduos de *L. tigrinus* (em três indivíduos aumentou e em dois diminuiu) e diminuiu em *L. wiedii*. Boinski et al. (1999) relataram que a produção de cortisol está fortemente influenciada pelas alterações ambientais, tanto na introdução quanto na remoção de enriquecimentos.

Algumas respostas fisiológicas às condições ambientais diferem entre espécies, indivíduos, e às vezes entre varias análises em um mesmo indivíduo (Mason e Mendl, 1993; Nogueira e Silva, 1997). Espécies diferentes são adaptadas evolutivamente para condições de vida distintas, portanto, respondem de maneiras diferentes quando afetadas pelo mesmo estressor. Conseqüentemente, algumas medidas de bem-estar serão mais apropriadas para certas espécies do que para outras (Mason e Mendl, 1993). O mecanismo fisiológico controlando a secreção de cortisol em reação a um estímulo estressante pode também diferir entre espécies, ou gerar respostas específicas para alguns estressores, como manuseio inadequado, certas características ambientais, alimentação inapropriada, presença de outras espécies (Genaro et al., 2007).

Estudos comparando níveis de corticóides entre espécies de felídeos neotropicais em cativeiro obtiveram concentrações de cortisol plasmático maiores em sussuarana e gato-mourisco do que em gato-do-mato, jaguatirica, onça-pintada, gato geoffroy (*Leopardus geoffroyi*) e maracajá (Genaro et al., 2007). No nosso estudo, a concentração média de cortisol fecal foi maior em *L. pardalis* do que em

L. tigrinus e *L. wiedii*. Porém, houve uma grande variação entre os indivíduos da mesma espécie.

Considerável variação inter-individual das concentrações de glicocorticóides têm sido evidenciada em outras espécies (Baker et al. 1998), tanto relacionada ao manejo social (Shively e Kaplan, 1984; Wielebnowski et al., 2002b) quanto as características do ambiente de cativeiro (Carlstead et al., 1993, Wielebnowski et al., 2002a).

Antes do enriquecimento, as fêmeas de *L. pardalis* apresentaram concentração de cortisol fecal média mais elevada do que os machos da mesma espécie. Wielebnowski et al. (2002a) encontraram o mesmo para leopardo (*Neofelis nebulosa*) quando estudaram a influência do manejo sobre o comportamento e a produção de cortisol fecal. Isto sugere que as fêmeas têm maior sensibilidade a situações prejudiciais e estressantes em cativeiro. Isso pode refletir uma resposta evolutiva devido as fêmeas serem geralmente menores que os machos e suscetíveis aos ataques deles. Assim uma fêmea com níveis de corticóides elevados apresenta maior vigilância e protege melhor os filhotes de possível agressão e até infanticídio por machos. Todavia, Wielebnowski et al. (2002a) não detectaram diferenças de concentração de esteróides entre sexos em leopardos. Cummings et al. (2007) registraram um aumento na concentração de corticóides fecais em machos de lobos-guará durante o enriquecimento, entretanto não em fêmeas.

Terio et al. (2004) não detectaram diferença significativa nas concentrações de metabólitos de cortisol fecal entre machos e fêmeas de guepardos em cativeiro. Outros felídeos selvagens em cativeiro (*L. pardalis*, *L. tigrinus*, *L. wiedii*, *O. geoffroyi*, *H. yaguaroundi* e *Oncifelis colocolo*) também não apresentaram diferença de nível de cortisol plasmático entre sexos durante exames de rotina (Genaro et al., 2007). Encontramos diferenças entre machos e fêmeas na espécie de *L. pardalis* e Wielebnowski et al. (2002a) na espécie de *N. nebulosa*. A diferença dos resultados entre nosso estudo com *L. pardalis* e o de Genaro et al. (2007) pode se explicar pela diferença da fonte dos metabólitos de corticóides, fecal no nosso estudo e plasmática no de Genaro et al. (2007).

Em nosso estudo, o nível basal das concentrações de corticóides variou tanto entre espécies quanto entre indivíduos da mesma espécie. Tais variações inter-individuais foram registradas em outras espécies de felídeos: os níveis basais das concentrações de glicocorticóides fecais variaram muito de um indivíduo para outro em tigres (Dembiec et al., 2004), guepardos (Jurke et al., 1997; Terio et al., 2004), leopardos (Wielebnowski et al., 2002a) e gatos selvagens asiáticos (*O. manul*) (Newell-Fugate et al., 2007). Estas variações inter-individuais podem refletir a diversidade das experiências passadas de cada indivíduo, a heterogeneidade das respostas a tais experiências, e a variabilidade do funcionamento metabólico de cada um (Wielebnowski et al., 2002a; Dembiec et al., 2004).

Observamos que as respostas fisiológicas ao enriquecimento não tiveram um padrão único para as três espécies estudadas. A média dos níveis basais de *L. wiedii* foi maior que a média dos níveis basais de *L. tigrinus* e de *L. pardalis* na primeira fase. Este quadro se inverteu nas fases subseqüentes, onde tanto a média dos níveis basais quanto dos picos foram maiores para a espécie *L. tigrinus* comparando com *L. wiedii*, e maior em *L. pardalis* comparando com ambas outras espécies. Moreira et al. (2007) relataram que indivíduos de *L. tigrinus* tiveram um aumento maior das concentrações dos níveis basais de corticóides que *L. wiedii*, depois de serem transferidos dos recintos grandes e enriquecidos para recintos pequenos e vazios. Os níveis basais de corticóides são diferentes de uma espécie para outra não permitindo comparações entre indivíduos de duas espécies. Da mesma maneira, não podemos afirmar que uma espécie tem maior nível de estresse que outra, baseando-se na diferença de concentração dos níveis basais dos corticóides.

O nível basal das concentrações de corticóides do *L. wiedii* diminuiu da primeira para a segunda e da segunda para a terceira fase. Ao mesmo tempo o indivíduo apresentou um pico de metabólitos de corticóides fecais na segunda e terceira fase. A diminuição dos níveis basais e o registro dos picos refletem a diminuição do estresse crônico (Lane, 2006). A resposta aos enriquecimentos é evidenciada pelos picos, decorrentes provavelmente de descargas de corticóides liberadas durante eventos como caça (presa viva) e a introdução de novos enriquecimentos. O estresse crônico, indicado por níveis basais elevados de

corticóides, pode causar deficiências fisiológicas, contribuir para a prevalência de doenças e baixo índice reprodutivo (Terio et al., 2004).

No presente estudo, picos de concentração de corticóides fecais foram registrados em todas as fases para todas as espécies. Porém, diferente do esperado, a menor quantidade de picos ocorreu durante a fase de enriquecimento, enquanto que a maior quantidade foi observada na terceira fase. Picos de concentração de metabólitos de corticóides estão associados a estímulos externos que desencadeiam respostas agudas da adrenal, podendo decorrer de eventos de estresse agudo, como anestesia, ou mesmo de eventos prazerosos como caça e captura de presa (Moreira et al. 2007). Portanto, esperava-se que alterações ambientais e introdução de presas vivas desencadeassem maior número de picos de concentrações de corticóides na segunda fase do experimento do que nas outras fases, o que não ocorreu. Apesar disto, os picos das concentrações de corticóides fecais mais altos de cada espécie foram registrados durante a segunda fase, o que pode ser decorrente da introdução de enriquecimentos.

Moreira et al. (2007) também verificaram picos de cortisol em todas as fases, e, muitos ocorreram também quando as fêmeas de *L. tigrinus* estavam em recintos pequenos e vazios e não em recintos enriquecidos, sendo estes grandes ou pequenos. Os picos de concentrações de corticóides representam respostas a estímulos, normalmente do ambiente externo, ativando o sistema simpático-adrenal acima do basal.

Os picos das concentrações de corticóides também variaram entre os indivíduos no nosso estudo, não tendo sido apresentado por todos os indivíduos. Dembiec et al. (2004) relataram uma variação inter-individual dos picos das concentrações de corticóides em tigres. Esta variação pode indicar diferenças no tempo de passagem intestinal (Dembiec et al., 2004).

Análises isoladas de concentrações de glicocorticóide não representam o melhor indicador da resposta individual ao estresse, sendo necessário examinar outros indicadores junto com a análise de cortisol (Wielebnowski et al., 2002a). Reações comportamentais e hormonais variam dependendo das estratégias utilizadas por cada indivíduo (Moreira et al., 2007). Estudos usando medidas

comportamentais e fisiológicas juntas para avaliar estresse geralmente provêm um conjunto melhor de informações e uma avaliação integrativa das respostas ao estresse (Wielebnowski et al., 2002a).

Estudos correlacionando aspectos comportamentais e fisiológicos têm sido realizados em felídeos (Wielebnowski et al., 2002a, 2002b; Dembiec et al., 2004; Moreira et al., 2007;), canídeos (Cummings et al., 2007), primatas (Boinski et al., 1999), ursídeos (Liu et al., 2006) e suínos (Barnett et al., 1992).

Os resultados das observações comportamentais e das análises de cortisol foram conflitantes em nosso estudo. Apesar de termos encontrado uma diminuição significativa na expressão dos comportamentos relacionados à estresse durante a segunda fase, o nível de cortisol fecal não diferiu significativamente entre as três fases para nenhuma das espécies. Talvez as expressões comportamentais relacionadas a situações aversivas sejam alteradas mais rapidamente que as alterações fisiológicas nos animais.

Por outro lado, evidenciamos correlações, positivas e negativas, entre os comportamentos relacionados a estresse, como *pacing*, coçar, rodar a cabeça e vocalizar, comportamentos relacionados a marcação, e os níveis basais das concentrações de corticóides. Evidenciamos correlações negativas na primeira fase entre o nível basal de corticóides e o tempo dedicado à realização de dois comportamentos: coçar-se e rodar a cabeça. Tal fenômeno pode ser explicado pela adoção pelo animal de uma estratégia comportamental visando alcançar uma proteção mental chamado “efeitos do mantra” (“mantra effects” seguindo Mason e Latham, 2004). Esta estratégia tem relacionado o aumento do *pacing* com a diminuição do estresse, ou do nível da concentração de corticóides (Gusset, 2005). Mason e Latham (2004) sustentam que os indivíduos que realizam *pacing* ou outro comportamento repetitivo podem melhorar seu bem estar em ambientes pobres. Foi encontrada na primeira fase do nosso estudo uma correlação entre a duração relativa aos comportamentos repetitivos rodar a cabeça e coçar e os níveis basais das concentrações de corticóides. Swaigood e Shepherdson (2005) relataram também que os indivíduos com comportamentos estereotipados são fisiologicamente menos estressados que os indivíduos não realizando este tipo de comportamento.

Cummings et al (2007) observaram comportamentos e coletaram amostras fecais de quatro lobos guará adultos alojados em recintos separadamente durante 14 semanas. Os recintos não estavam enriquecidos durante as primeiras oito semanas, eram enriquecidas com ratos mortos escondidos durante a nona e décima semana, sem enriquecimento durante a décima primeira e décima segunda semana, e enriquecidas com bolas de carne durante as duas últimas semanas. Os autores reportaram diferenças nas respostas comportamentais e fisiológicas aos enriquecimentos entre sexo e indivíduos: todos os indivíduos responderam melhor aos ratos mortos escondidos do que as bolas de carne realizando mais comportamentos exploratórios. O único indivíduo, que realizava *pacinig*, uma fêmea, apresentou também o nível de corticóide fecal mais baixo. Os autores propõem duas explicações complementares. A primeira seria a existência de um mecanismo de defesa do organismo: a alta concentração de corticóides plasmáticos decorrente de um estresse crônico desencadearia um *feedback* negativo do sistema do eixo HPA com a diminuição da atividade da adrenal (Wiepkema e Koolhaas, 1993), e conseqüentemente uma diminuição da produção e excreção dos corticóides. A segunda explicação seria que o comportamento de *pacinig* desempenha um papel de auto-aliviar o estresse no indivíduo, relacionando este tipo de comportamento a diminuição da atenção a eventos externos ou fontes de estímulos ou de estresse (Mason, 1991), refletindo na diminuição da ativação do sistema simpático-adrenal. O mesmo processo pode se aplicar para outros comportamentos estereotipados, como rodar a cabeça e coçar-se.

Nenhuma correlação significativa entre os valores médios dos picos de concentração de corticóides e a realização de comportamentos foi evidenciada em nenhuma das fases. Todavia, a correlação com os comportamentos relacionados a alimentação, apesar de não ter sido significativo, apresentou um o coeficiente de Spearman de 0,53, refletindo o efeito do uso do frango congelado, enrolado em jornal e preso no teto e das presas vivas. Neste caso o aumento da produção de glicocorticóide pode ser uma resposta a estímulos positivos, como também relatado por Dembiec et al. (2004).

Mostl e Palme (2002) verificaram um aumento de metabólitos de cortisol fecal em vacas devido a mudança para um ambiente novo. Suínos em recintos

enriquecidos tiveram níveis de cortisol salivares maiores que suínos em recintos menos enriquecidos (Jong et al., 1998), um sinal de resposta a introdução de elementos novos no ambiente. Portanto, dados comportamentais devem ser analisados juntamente com os de glicocorticóides, para melhor compreender as respostas fisiológicas aos estímulos. Afinal, o aumento do nível de cortisol nos organismos pode decorrer de uma situação de estresse considerada positiva (por exemplo, escapar de um predador ou capturar uma presa) ou de uma situação de estresse crônico (*distresse*), por exemplo, devido a um longo período de restrição de movimentos (Dembiec et al., 2004).

Na segunda fase houve correlação dos comportamentos relacionados à marcação e os níveis basais das concentrações de corticóides. Como foi a primeira vez que introduziu enriquecimento ambiental nos recintos destes indivíduos, e enriquecimentos novos foram inseridos semanalmente, toda esta mudança de objetos e cheiros novos pode ter ocasionado novidade sensorial, pode ter induzido o aumento dos corticóides, levando ao aumento da marcação. Os felídeos são territorialistas, e demarcam seu território através do cheiro (urina e glândulas). Reconhecem seu território e outros indivíduos através do olfato, a introdução de novos objetos influencia seus comportamentos de marcação.

Correlações positivas de *pacing* e coçar com níveis basais de corticóides foram verificadas na terceira fase. Boinski et al (1999) relataram que a correlação positiva de *pacing* com os níveis basais de glicocorticóides se devem a mudanças ambientais. A retirada dos enriquecimentos dos recintos constitui uma mudança ambiental e pode explicar a correlação positiva entre os comportamento de *pacing* e coçar com os níveis basais de corticóides fecais. Estranhamente correlação entre *pacing* e os níveis basais de glicocorticóides não ocorreu na segunda fase, quando foram introduzidos os enriquecimentos. Nesta fase o *pacing* diminuiu significativamente e a média dos níveis basais das concentrações de corticóides fecais aumentou. Este aumento ocorreu, provavelmente, devido à introdução semanal dos enriquecimentos, sendo neste caso um estímulo positivo.

Alguns autores detectaram a existência de correlação positiva entre níveis de cortisol e comportamentos estereotipados. Por exemplo, Wielebnoski et al. (2002b)

encontraram uma correlação positiva entre comportamento de *padding* e a concentração de corticóides em leopardos. Liu et al. (2006) também acharam correlação entre comportamento estereotipado e as concentrações de cortisol fecal em urso panda. Já em guepardos, não foi detectada nenhuma relação entre comportamentos de *padding* e medidas de glicocorticóides fecais (Wielebnowski et al., 2002a).

Liu et al. (2006) afirmaram que apesar do cortisol ser conhecido como hormônio do estresse, ainda não está claro se níveis elevados desse hormônio no organismo desencadeiam comportamentos de estresse, se os comportamentos de estresse estimulam a secreção de cortisol, ou se ambos os fenômenos ocorrem.

Boinski et al (1999) não observaram diferenças entre níveis de cortisol em macaco-prego (*Cebus apella*) submetidos a ambientes enriquecidos e sem enriquecimento. Entretanto, comportamentos normais aumentaram e os anormais diminuíram em situações de enriquecimento. Não foi detectada qualquer relação entre níveis de cortisol fecal e tempo alocado a comportamentos normais ou anormais.

O uso de vários enriquecimentos introduzidos de uma vez só é interessante por avaliar o que os zoológicos, parques e centros de reabilitação realizam normalmente. Um problema com que lidamos aplicando esta metodologia foi como avaliar o impacto de cada enriquecimento nos felídeos estudados. Apesar de termos verificado uma interação maior com alguns dos enriquecimentos, maiores estudos testando cada um destes precisariam ser realizados, sistemática e separadamente. Ou o conjunto de dois ou três enriquecimentos por vez, como aconselhado por Boinski et al. (1999).

CONCLUSÕES

Pequenos felídeos silvestres respondem bem a nível comportamental ao método de oferecimento de vários enriquecimentos ao mesmo tempo. Porém o mesmo não foi observado a nível fisiológico.

A introdução simultânea de vários enriquecimentos nos recintos de *L. pardalis*, *L. wiedii* e *L. tigrinus* causou uma diminuição da duração relativa de comportamentos estereotipados, como *pacing* e coçar-se.

Houve variação inter-individual e intra-individual das concentrações dos metabólitos de glicocorticóides nas três espécies estudadas, nas três fases.

Correlações dos níveis basais das concentrações de corticóides e comportamentos relacionados ao estresse só foram observadas na primeira e terceira fase, quando os recintos estavam sem enriquecimento.

Picos das concentrações de corticóides não foram correlacionados significativamente com nenhum comportamento em nenhuma fase do experimento.

REFERÊNCIAS

- ACCORSI, P. A., CARLONI, E., VALSECCHI, P., VIGGIANI, R., GARNBERONI, M., TARNANINI, C., SEREN, E. Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. **General and Comparative Endocrinology**, v. 155, n. 2, p. 398-402. 2008.
- ALTMANN, J. Observational study of behavior sampling methods. **Behaviour** v. 49, p. 227-267. 1974.
- BAKER, M. L., GEMMELL, E., GEMMELL, R. T. Physiological changes in brushtail possums, *Trichosurus vulpecula*, transferred from the wild to captivity. **Journal of Experimental Zoology**, v. 280, p. 203-212. 1998.
- BARNETT, J. L., CRONIN, G. M., WINFIELD, C. G., DEWAR, A. M. The welfare of adult pigs - the effects of 5 housing treatments on behavior, plasma corticosteroids and injuries **Applied Animal Behaviour Science**, v. 12, n. 3, p. 209-232. 1984.
- BASHAW, M. J., TAROU, L. R., MAKI, T. S., MAPLE, T. L. A survey assessment of variables related to stereotypy in captive giraffe and okapi. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 73, n. 3, p. 235-247. 2001.
- BASHAW, M. J., BLOOMSMITH, M. A., MARR, M. J., MAPLE, T. L. To hunt or not to hunt? A feeding enrichment experiment with captive large felids. **Zoo Biology**, v. 22, n. 2, p. 189-198. 2003.
- BERNAL, J. F.; PACKARD, J. M. Differences in winter activity, courtship, and social behavior of two captive family groups of Mexican wolves (*Canis lupus baileyi*). **Zoo Biology**, v. 16, n. 5, p. 435-443. 1997.

- BOINSKI, S., SWING, S. P., GROSS, T. S., DAVIS, J. K. Environmental enrichment of brown capuchins (*Cebus apella*): Behavioral and plasma and fecal cortisol measures of effectiveness. **American Journal of Primatology**, v. 48, n. 1, p. 49-68. 1999.
- BROWN, J. L., WASSER, S. K., WILDT, D. E., GRAHAM, L. H. Comparative aspects of steroid-hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 4, p. 776-786. 1994.
- BROWN, J. L. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 25-36. 2006.
- BROWN, J. S.; KOTLER, B. P.; BOUSKILA, A. Ecology of fear: Foraging games between predators and prey with pulsed resources. **Annales Zoologici Fennici**, v. 38, n. 1, p. 71-87. 2001.
- BROWN, J. W., S.; STEINMAIN, K. . **Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestics species**. Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park, Front Royal. Virginia – EUA, p. 2004
- CARLSTEAD, K., SEIDENSTICKER, J. Seasonal-variation in stereotypic pacing in an american black bear (*Ursus americanus*). **Behavioural Processes**, v. 25, n. 2-3, p. 155-161. 1991.
- CARLSTEAD, K., BROWN, J. L., STRAWN, W. Behavioral and physiological correlates of stress in laboratory cats. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 38, n. 2, p. 143-158. 1993.
- CARLSTEAD, K.; BROWN, J. L. Relationships between patterns of fecal corticoid excretion and behavior, reproduction, and environmental factors in captive black (*Diceros bicornis*) and white (*Ceratotherium simum*) rhinoceros. **Zoo Biology**, v. 24, n. 3, p. 215-232. 2005.
- CLUBB, R.; MASON, G. Captivity effects on wide-ranging carnivores. **Nature**, v. 425, n. 6957, p. 473-474. 2003.
- CLUBB, R.; MASON, G. J. Natural behavioural biology as a risk factor in carnivore welfare: How analysing species differences could help zoos improve enclosures. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 102, n. 3-4, p. 303-328. 2007.
- CUMMINGS, D., BROWN, J. L., RODDEN, M. D., SONGSASEN, N. Behavioral and physiologic responses to environmental enrichment in the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). **Zoo Biology**, v. 26, p. 331-343. 2007.
- DAVENPORT, M. D., TIEFENBACHER, S., LUTZ, C. K., NOVAK, M. A., MEYER, J. S. Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. **General and Comparative Endocrinology**, v. 147, n. 3, p. 255-261. 2006.

- DE JONG, I. C., EKKELE, E. D., VAN DE BURGWAL, J. A., LAMBOOIJ, E., KORTE, S. M., RUIS, M. A. W., KOOLHAAS, J. M., BLOKHUIS, H. J. Effects of straw bedding on physiological responses to stressors and behavior in growing pigs. **Physiology and Behavior**, v. 64, p. 303-310. 1998.
- DE KLOET, E. R., SIBUG, R. M., HELMERHORST, F. M., SCHMIDT, M. Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 2, p. 271-281. 2005.
- DE ROUCK, M., KITCHENER, A. C., LAW, G., NELISSEN, M. A comparative study of the influence of social housing conditions on the behaviour of captive tigers (*Panthera tigris*). **Animal Welfare**, v. 14, n. 3, p. 229-238. 2005.
- DEMBIEC, D. P.; SNIDER, R. J.; ZANELLA, A. J. The effects of transport stress on tiger physiology and behavior. **Zoo Biology**, v. 23, n. 4, p. 335-346. 2004.
- DIAS, E. A.; NICHI, M.; GUIMARAES, M. Comparison of two commercial kits and two extraction methods for fecal glucocorticoid analysis in ocelots (*Leopardus pardalis*) submitted to ACTH challenge. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 28, n. 7, p. 329-334. 2008.
- DRAPER, W. A., BERNSTEIN, I. S. Stereotyped behaviour and cage size. **Perceptual and Motor Skills**, v. 16, p. 231-234. 1963.
- FORTHMAN, D. L., ELDER, S. D., BAKEMAN, R., KURKOWSKI, T. W., NOBLE C. C., WINSLOW, S. W. . Effects of feeding enrichment on three species of captive bears. **Zoo Biology**, v. 11, p. 187-195. 1992.
- FOX, C. M., Z, HARRISON, C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. **Behavioural Brain Research**, v. 175, p. 1–8. 2006.
- FREZARD, A.; LE PAPE, G. Contribution to the welfare of captive wolves (*Canis lupus lupus*): A behavioral comparison of six wolf packs. **Zoo Biology**, v. 22, n. 1, p. 33-44. 2003.
- GENARO, G., MORAES, W., SILVA, J. C. R., ADANIA, C. H., FRANCI, C. R. Plasma hormones in neotropical and domestic cats undergoing routine manipulations. **Research in Veterinary Science**, v. 82, n. 2, p. 263-270. 2007.
- GOERKE, B., FLEMING, L., CREEL, M. Behavioral changes of a juvenile gorilla after transfer to a more naturalistic environment. **Zoo Biology**, v. 6, p. 283–295. 1987.
- GOOSSENS, M. M. C., MEYER, H. P., VOORHOUT, G., SPRANG, E. P. M. Urinary-excretion of glucocorticoids in the diagnosis of hyperadrenocorticism in cats. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 12, n. 4, p. 355-362. 1995.
- GOYMANN, W., MOSTL, E., VAN'T HOF, T., EAST, M. L., HOFER, H. Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas, *Crocuta crocuta*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 114, p. 340-348. 1999.

- GOYMANN, W., EAST, M. L., WACHTER, B., HONER, O. P., MOSTL, E., VAN'T HOF, T. J., HOFER, H. Social, state-dependent and environmental modulation of faecal corticosteroid levels in free-ranging female spotted hyenas. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 268, n. 1484, p. 2453-2459. 2001.
- GRAHAM, L. H., BROWN, J.L. Cortisol metabolism in the domestic cat and implications for developing a non-invasive measure of adrenocortical activity in non-domestic felids. **Zoo Biology**, v. 15, p. 71-82. 1996.
- GUSSET, M. Faecal glucocorticoid level is not correlated with stereotypic pacing in two captive margays (*Leopardus wiedii*). **Animal Welfare**, v. 14, p. 157-159. 2005.
- HARPER, J. M.; AUSTAD, S. N. Fecal glucocorticoids: A noninvasive method of measuring adrenal activity in wild and captive rodents. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 73, n. 1, p. 12-22. 2000.
- HENNESSY, M. B., HEYBACH, J. P., VERNIKOS, J., LEVINE, S. Plasma-corticosterone concentrations sensitively reflect levels of stimulus-intensity in the rat. **Physiology and Behavior**, v. 22, n. 5, p. 821-825. 1979.
- IUCN. IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/11510/0>>. Acesso em: 05 de novembro de 2009.
- JONES, R. B.; FACCHIN, L.; MCCORQUODALE, C. Social dispersal by domestic chicks in a novel environment: reassuring properties of a familiar odourant. **Animal Behaviour**, v. 63, p. 659-666. 2002.
- JURKE, M. H., CZEKALA, N. M., LINDBURG, D. G., MILLARD, S. E. Fecal corticoid metabolite measurement in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). **Zoo Biology**, v. 16, n. 2, p. 133-147. 1997.
- KAUFMAN, B. M., POULIOT, A. L., TIEFENBACHER, S., NOVAK, M. A. Short and long-term effects of a substantial change in cage size on individually housed, adult male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 88, n. 3-4, p. 319-330. 2004.
- KISTLER, C., HEGGLIN, D., WURBEL, H., KONIG, B., . Feeding enrichment in an opportunistic carnivore: The red fox. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 116, n. 2-4, p. 260-265. 2009.
- LANE, J. Can non-invasive glucocorticoid measures be used as reliable indicators of stress in animals? **Animal Welfare**, v. 15, n. 4, p. 331-342. 2006.
- LANGMAN, V. A., ROWE, M., FORTHMAN, D., WHITTON, N., LANGMAN, T., ROBERTS, T., HUSTON, K., BOLING, C., MALONEY, D. . Thermal assessment of zoological exhibits 1: sea lion enclosure at the Audubon zoo. **Zoo Biology**, v. 15, p. 403-411. 1996.
- LAULE, G., DESMOND, T. Positive reinforcement training as an enrichment strategy.

In: D. J. SHEPHERDSON, MELLEN, J.D., HUTCHINS, M. (EDS.) (Org.). **Second Nature: Environmental Enrichment for Captive Animals**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1998, p. 31–46.

- LINDBURG, D. G., FITCH-SNYDER, H. Use of behavior to evaluate reproductive problems in captive mammals. **Zoo Biology**, v. 13, p. 433-455. 1994.
- LIU, J., CHEN, Y., GUO, L. R., GU, B., LIU, H., HOU, A. Y., LIU, X. F., SUN, L. X., LIU, D. Z. Stereotypic behavior and fecal cortisol level in captive giant pandas in relation to environmental enrichment. **Zoo Biology**, v. 25, n. 6, p. 445-459. 2006.
- LYONS, J.; YOUNG, R. J.; DEAG, J. M. The effects of physical characteristics of the environment and feeding regime on the behavior of captive felids. **Zoo Biology**, v. 16, n. 1, p. 71-83. 1997.
- MALLAPUR, A.; CHELLAM, R. Environmental influences on stereotypy and the activity budget of Indian leopards (*Panthera pardus*) in four zoos in southern India. **Zoo Biology**, v. 21, n. 6, p. 585-595. 2002.
- MARGULIS, S. W., HOYOS, C., ANDERSON, M. Effect of felid activity on zoo visitor interest. **Zoo Biology**, v. 22, p. 587-599. 2003.
- MASON, G., MENDEL, M. Do the stereotypies of pigs, chickens and mink reflect adaptive species differences in the control of foraging. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 53, p. 45-58. 1997.
- MASON, G., CLUBB, R., LATHAM, N., VICKERY, S. Why and how should we use environmental enrichment to tackle stereotypic behaviour? **Applied Animal Behaviour Science**, v. 102, n. 3-4, p. 163-188. 2007.
- MASON, G. J. Stereotypies - a critical review **Animal Behaviour**, v. 41, p. 1015-1037. 1991.
- MASON, G. J.; LATHAM, N. R. Can't stop, won't stop: is stereotypy a reliable animal welfare indicator? **Animal Welfare**, v. 13, p. S57-S69. 2004.
- MCPHEE, M. E. Intact carcasses as enrichment for large felids: Effects on on- and off-exhibit behaviors. **Zoo Biology**, v. 21, n. 1, p. 37-47. 2002.
- MELLEN, J. D., MCPHEE, M. S. Philosophy of environmental enrichment: past, present and future. **Zoo Biology**, v. 20, p. 211-226. 2001.
- MOREIRA, N., MONTEIRO-FILHO, E. L. A., MORAES, W., SWANSON, W.F., GRAHAM, L.H., PASQUALI, O.L., GOMES, M. L. F., MORAIS, R. M., WILDT, D. E., BROWN, J. L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. **Zoo Biology**, v. 20, p. 103-116. 2001.
- MOREIRA, N., BROWN, J. L., MORAES, W., SWANSON, W. F., MONTEIRO, E. L. A. Effect of housing and environmental enrichment on adrenocortical activity, Behavior and reproductive Cyclicity in the female tigrina (*Leopardus tigrinus*) and margay (*Leopardus wiedii*). **Zoo Biology**, v. 26, n. 6, p. 441-460. 2007.

- MORGAN, K. N.; TROMBORG, C. T. Sources of stress in captivity. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 102, n. 3-4, p. 262-302. 2007.
- MOSTL, E., MAGGS, J. L., SCHROTTER, G., BESENFELDER, U., PALME, R. Measurement of cortisol metabolites in faeces of ruminants. **Veterinary Research Communications**, v. 26, n. 2, p. 127-139. 2002.
- MOSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 67-74. 2002.
- MOSTL, E.; RETTENBACHER, S.; PALME, R. Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: An analytical approach. **Bird Hormones and Bird Migrations: Analyzing Hormones in Droppings and Egg Yolks and Assessing Adaptations in Long-Distance Migration**, v. 1046, p. 17-34. 2005.
- NATELSON, B. H., OTTENWELLER, J. E., COOK, J. A., PITMAN, D., MCCARTY, R., TAPP, W. N. Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. **Physiology and Behavior**, v. 43, n. 1, p. 41-46. 1988.
- NEWELL-FUGATE, A., KENNEDY-STOSKOPF, S., BROWN, J. L., LEVINE, J. F., SWANSON, W. Seminal and endocrine characteristics of male Pallas' cats (*Otocolobus manul*) maintained under artificial lighting with simulated natural photoperiods. **Zoo Biology**, v. 26, n. 3, p. 187-199. 2007.
- NOWELL, K., JACKSON, P. **Wild Cats: status survey and conservation action plan**. Gland, Switzerland: IUCN/SSC Cat Specialist Group. 1996. 382 p.
- OLIVEIRA, T. G. **Neotropical cats: ecology and conservation**. Sao Luis: Brasil: EDUFMA. 1994. 222 p.
- PAULK, H. H., DIENSKE, H., RIBBENS, L.G. Abnormal behavior in relation to cage size in rhesus monkeys. **Journal of Abnormal Psychology**, v. 86, p. 87-92. 1977.
- PONTES, A. R. M.; CHIVERS, D. J. Peccary movements as determinants of the movements of large cats in Brazilian Amazonia. **Journal of Zoology**, v. 273, n. 3, p. 257-265. 2007.
- POWELL, D. M. Preliminary evaluation of environmental enrichment techniques for African lions (*Panthera leo*). **Animal Welfare**, v. 4, p. 361-370. 1995.
- PRIMACK, R. B., RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina. 2002. 328 p.
- RABIN, L. A. Maintaining behavioural diversity in captivity for conservation: Natural behaviour management. **Animal Welfare**, v. 12, n. 1, p. 85-94. 2003.
- SAIBABA, R., SALES, G.D., STODULSKI, G., HAU. Behaviour of rats in their home cages: daytime variations and effects of routine husbandry procedures analyzed by time sampling techniques. **Journal of**

- Laboratory Animal**, v. 30, p. 13–21. 1996.
- SAPOLSKY, R. M. Why stress is bad for your brain. **Science**, v. 273, n. 5276, p. 749-750. 1996.
- _____. Stress and plasticity in the limbic system. **Neurochemical Research**, v. 28, n. 11, p. 1735-1742. 2003.
- SCHWARZENBERGER, F. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. **International Zoo Yearly**, v. 41, p. 52–74. 2007.
- SCOTT, J. M.; MURRAY, D.; GRIFFITH, B. Lynx reintroduction. **Science**, v. 286, n. 5437, p. 49+. 1999.
- SHEPHERDSON, D. J., CARLSTEAD, K., MELLEN, J. D., SEIDENSTICKER, J. THE INFLUENCE OF FOOD PRESENTATION ON THE BEHAVIOR OF SMALL CATS IN CONFINED ENVIRONMENTS. **Zoo Biology**, v. 12, n. 2, p. 203-216. 1993.
- SHEPHERDSON, D. J.; CARLSTEAD, K. C.; WIELEBNOWSKI, N. Cross-institutional assessment of stress responses in zoo animals using longitudinal monitoring of faecal corticoids and behaviour. **Animal Welfare**, v. 13, p. S105-S113. 2004.
- SHIVELY, C., KAPLAN, J. Effects of social factors on adrenal weight and related physiology of *Macaca fascicularis*. **Physiology and Behavior**, v. 33, p. 777-782. 1984.
- SHYNE, A. Meta-analytic review of the effects of enrichment on stereotypic behavior in zoo mammals. **Zoo Biology**, v. 25, n. 4, p. 317-337. 2006.
- SKIBIEL, A. L.; TREVINO, H. S.; NAUGHER, K. Comparison of several types of enrichment for captive felids. **Zoo Biology**, v. 26, p. 371-381. 2007.
- SLOTNICK, B., SCHELLINCK, H., BROWN, R. Olfaction. In: I. Q. WHISHAW, KOLB, B. (EDS.) (Org.). **The Behavior of the Laboratory Rat**. New York, NY: Oxford University Press, 2005, p. 90–104.
- SWAISGOOD, R. R.; DICKMAN, D. M.; WHITE, A. M. A captive population in crisis: Testing hypotheses for reproductive failure in captive-born southern white rhinoceros females. **Biological Conservation**, v. 129, n. 4, p. 468-476. 2006.
- SWAISGOOD, R. R.; SHEPHERDSON, D. J. Scientific approaches to enrichment and stereotypies in zoo animals: What's been done and where should we go next? **Zoo Biology**, v. 24, n. 6, p. 499-518. 2005.
- SWANSON, W. F., WILDT, D. E. Strategies and progress in reproductive research involving small cat species. **International Zoo Yearbook**, v. 35, p. 152-159. 1997.
- SWANSON, W. F., JOHNSON, W. E., CAMBRE, R. C., CITINO, S. B., OUGLEY, K. B., BROUSSET, D. M., MORALS, R. N., MOREIRA, N., O'BRIEN, S. J.,

- WILDT, D. E. Reproductive status of endemic felid species in Latin American zoos and implications for ex situ conservation. **Zoo Biology**, v. 22, n. 5, p. 421-441. 2003.
- SWANSON, W. F.; BROWN, J. L. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. **Animal Reproduction Science**, v. 82-3, p. 21-34. 2004.
- TAROU, L. R.; BASHAW, M. J.; MAPLE, T. L. Failure of a chemical spray to significantly reduce stereotypic licking in a captive giraffe. **Zoo Biology**, v. 22, n. 6, p. 601-607. 2003.
- TERIO, K. A.; MARKER, L.; MUNSON, L. Evidence for chronic stress in captive but not free-ranging cheetahs (*Acinonyx jubatus*) based on adrenal morphology and function. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 40, n. 2, p. 259-266. 2004.
- TERLOUW, E. M. C.; LAWRENCE, A. B.; ILLIUS, A. W. Influences of feeding level and physical restriction on development of stereotypies in sows. **Animal Behaviour**, v. 42, p. 981-991. 1991.
- VALLADARES-PADUA, C. B., MARTINS, C.S., RUDRAN, R. Manejo integrado de espécies ameaçadas. In: L. V.-P. CULLEN JR., C.; RUDRAN, R. (ORGANIZADORES) (Org.). **Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**. Curitiba: Ed. Da UFPR; Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, 2003, p. 647-665.
- VAN DEN BOS, R. Post-conflict stress-response in confined group-living cats (*Felis silvestris catus*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 59, n. 4, p. 323-330. 1998.
- VICKERY, S.; MASON, G. Stereotypic behavior in Asiatic black and Malayan sun bears. **Zoo Biology**, v. 23, n. 5, p. 409-430. 2004.
- WASHBURN, B. E.; MILLSPAUGH, J. J. Effects of simulated environmental conditions on glucocorticoid metabolite measurements in white-tailed deer feces. **General and Comparative Endocrinology**, v. 127, n. 3, p. 217-222. 2002.
- WASSER, S. K., HUNT, K. E., BROWN, J. L., COOPER, K., CROCKETT, C. M., BECHERT, U., MILLSPAUGH, J. J., LARSON, S., MONFORT, S. L., . A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 120, p. 260-275. 2000.
- WELLS, D. L.; EGLI, J. M. The influence of olfactory enrichment on the behaviour of captive black-footed cats, *Felis nigripes*. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 85, n. 1-2, p. 107-119. 2004.
- WIELEBNOWSKI, N. C., ZIEGLER, K., WILDT, D. E., LUKAS, J., BROWN, J. L. Impact of social management on reproductive, adrenal and behavioural activity in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). **Animal Conservation**, v. 5, p. 291-301. 2002b.

- WIELEBNOWSKI, N. C., FLETCHALL, N., CARLSTEAD, K., BUSO, J. M., BROWN, J. L., Noninvasive assessment of adrenal activity associated with husbandry and behavioral factors in the North American clouded leopard population. **Zoo Biology**, v. 21, n. 1, p. 77-98. 2002a.
- WIEPKEMA, P. R., KOOLHAAS, J. M. Stress and animal welfare. **Animal Welfare**, v. 2, p. 195-218. 1993.
- YOUNG, K. M., WALKER, S. L., LANTHIER, C., WADDELL, W. T., MONFORT, S. L., BROWN, J. L. Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. **General and Comparative Endocrinology**, v. 137, n. 2, p. 148-165. 2004.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Houve efeito positivo nos comportamentos dos indivíduos, porém nos níveis de corticóides não houve diferença entre as fases. Um fator que pode ter influenciado os resultados foi a duração de cada fase. A parâmetro comportamental, a primeira e segunda fase podem ter sido suficientemente longas, porém o período de coleta foi muito curto na terceira fase e pode ter sido insuficiente para os parâmetros comportamentais voltarem aos níveis da primeira fase. Para análise do estresse fisiológico utilizando parâmetros de concentrações de corticóides, o tempo das três fases pareceram insuficientes para podermos observar uma diferença dos níveis de concentração de corticóides entre elas. Precisam ser realizados estudos com fases de maior duração, analisando parâmetros comportamentais e fisiológicos com intuito de interpretar o impacto dos enriquecimentos nas espécies de felídeos pequenos, a fim de melhorar as estratégias que propiciem o bem-estar dos animais.

Um fator limitante no nosso estudo foi o número de animais de cada espécie. Porém, não é possível conseguir muitos indivíduos de felídeos silvestres em um mesmo local de estudo, porque não há instituição com um número grande da mesma espécie. Outras pesquisas com felídeos foram realizadas com um número de indivíduos ainda menor. Os estudos conduzidos com muitos indivíduos da mesma espécie envolvem geralmente animais alojados em vários locais. A variabilidade dos históricos individuais, condições ambientais e climáticas associadas aos diferentes locais de pesquisa dificultam a interpretação dos resultados comportamentais e fisiológicos. O ideal seria estudar um número maior do que 30 indivíduos da mesma espécie, sexo, idade e nas mesmas condições, respeitando assim o valor mínimo indicado pelo teorema do limite central para que haja distribuição normal dos dados permitindo a realização de análises estatísticas mais robustas. Porém, como só é possível estudar um número reduzido de animais da mesma espécie ou em vários locais e sabe-se muito pouco do comportamento e fisiologia relacionados ao estresse, novas informações são preciosas mesmo quando os estudos são realizados com um número restrito de indivíduos.

Aconselho que mais estudos sejam realizados em centros de reabilitação, uma vez que atualmente a maioria dos estudos é conduzida em zoológicos. As condições ambientais de centros de reabilitação, algumas vezes, são piores que em zoológicos, quando deveriam ser melhores, já que estes animais estão nestes locais para serem reabilitados. Os animais acabam sendo “armazenados” em recintos inadequados com a desculpa dos responsáveis pelo centro que os animais irão permanecer por um período curto, sendo soltos depois do tempo de quarentena. Avaliar o impacto das condições destes locais nos animais é importante para tentar melhorar o bem estar deles nestes centros.

APÊNDICE I

Etograma: categoria comportamental, comportamentos e suas descrições

Categoria	Comportamento	Descrição
Movimento	Correr ou trotar*	Locomoção de movimentação rápida, impulsionando com as patas traseiras. Todos os membros deixam o substrato simultaneamente sem pausa entre o impulso seguinte.
Movimento	Escalar	Movimento vertical subindo ou descendo o substrato. Garras são usadas para agarrar-se ao substrato. Na segunda fase, foi reportado quando o indivíduo escalou um enriquecedor (tabela 2).
Movimento	Pular*	Sujeito salta de um ponto a outro, verticalmente ou horizontalmente.
Movimento	Locomover (andar)*	Locomoção quadrupedal, movendo dois membros opostos (1 dianteiro e 1 traseiro) com dois membros na superfície.
Descanso	Deitado*	Posicionado sobre o substrato, esternalmente, lateralmente ou sobre o dorso. Com a cabeça inclinada sobre o substrato.

Categoria	Comportamento	Descrição
Descanso	Parado*	Sujeito fica estacionário, em posição quadrupedal.
Descanso	Sentado*	Posicionado com o esterno sobre o substrato com a cabeça levantada ou com membros anteriores estendidos.
Marcação	Esfregar-se*	A face ou/e corpo são esfregados contra um objeto.
Marcação	Afiar garras*	Garras dianteiras são usadas esfregando vigorosamente. Na segunda fase, foi reportado quando o indivíduo usou um enriquecedor para afiar as garras (tabela 2).
Marcação	Urinar*	Sujeito direciona urina horizontalmente ou verticalmente sobre um objeto ou substrato.
Marcação	Defecar*	Excreção de resíduos sólidos.
Estresse	Recuar	Indivíduo anda para trás, de costas para a direção para onde está andando.
Estresse	Girar a cabeça	Sujeito gira a cabeça em movimentos circulares. Podendo estar em posição quadrúpede ou bípede, neste caso apoiando as patas dianteiras ou não.
Estresse	Pacing*	Movimento repetitivo, apresentando características únicas de cada indivíduo.
Estresse	Chupando o rabo	Sujeito chupando a ponta do rabo incessantemente.
Estresse	Mostrar os dentes	Indivíduo levanta o lábio superior para mostrar seus dentes, abrindo a boca.
Estresse	Coluna curva	Sujeito curva a coluna dorso-lombar para cima.
Estresse	Vocalizar*	Sujeito vocalizando. Vocalização não foi especificada.
Estresse	Bote	Após se encolher no solo olhando um objeto específico, o sujeito pula para cima do objeto.
Estresse	Coçar-se*	Indivíduo leva as garras da pata inferior ao corpo ou a cabeça e esfrega vigorosamente contra este.
Fora de visão	Esconder-se	Animal não está visível – Sujeito não pode ser visto pelo observador.
Outros	Olhar fixo*	Olhando um objeto específico, mantendo sua atenção fixamente nele.

Categoria	Comportamento	Descrição
Outros	Outros comportamentos*	Qualquer outro comportamento que não está no etograma.
Outros	Lambendo-se	Lambendo o corpo e patas, podendo passar as patas na cabeça após lambê-las.
Outros	Beber água*	Levando a água a boca, com a língua, e deglutindo em seguida.
Outros	Bocejar*	Abrir a boca e fechar.
Outros	Espreguiçar*	Alongando os membros dianteiros e a coluna.
Outros	Comer*	Alimentando-se, pegando o alimento ou presa e mastigando, deglutindo-o então. Na segunda fase foi distinguido no caso de estar comendo uma presa viva ou alimento.
Outros	Olhar ao redor	Olhando ao redor sem um objeto específico mantendo sua atenção.
Outros	Rolar	Deitado, vira o corpo de um lado para o outro.
Outros	Cheirar*	Cheirar um objeto ou substrato. No caso da segunda fase, os substratos foram distinguidos (tabela 2).
Outros	Brincar	Brincando com algum objeto, com as patas e/ou boca. No caso da segunda fase, foi mencionado cada objeto com que o indivíduo estava brincando (tabela 2).
Reação ao enriquecedor	Cheirar + enriquecedor	Indivíduo cheirando o enriquecedor (lona presa no portão, presa morta ou viva, tronco, água com peixe, bolinha plástica, folha de bananeira presa no portão, bóia, canela em pau, cravo-da-índia, galhos e garrafa plástica).
Reação ao enriquecedor	Andar + tronco	Indivíduo andando por cima do tronco
Reação ao enriquecedor	Sentar + tronco	Sentado no tronco, com o esterno sobre o tronco e com a cabeça levantada ou com membros anteriores estendidos.
Reação ao enriquecedor	Pendurar-se+ galhos	Indivíduo pendurando-se nos galhos
Reação ao enriquecedor	Parar + tronco	Indivíduo parado em cima do tronco
Reação ao enriquecedor	Brincar + enriquecedor	Brincando com enriquecedor usando as patas e/ou boca (bolinha plástica, bóia, corda, galhos, garrafa

Categoria	Comportamento	Descrição
		plástica, tronco, canela).
Reação ao enriquecedor	Pescar	Indivíduo com a pata dianteira na água, fazendo movimentos rápidos, puxando em direção a ele.
Reação ao enriquecedor	Olhar + enriquecedor	Olhando para o enriquecedor (água onde estava o peixe, debaixo do portão, onde estava coberto por uma lona, para a lona).
Reação ao enriquecedor	Mastigar + enriquecedor	Mastigando enriquecedor (caixa, onde contém a presa viva, galhos, bóia, tronco).
Reação ao enriquecedor	Comer + enriquecedor	Alimentando-se, pegando a presa viva ou alimento, e mastigando, deglutindo-o então.
Reação ao enriquecedor	Escalar + bóia	Movimento vertical subindo ou descendo a bóia. Garras são usadas para agarrar-se a bóia.
Reação ao enriquecedor	Pular + enriquecedor	Indivíduo pulando em cima do enriquecedor (bóia, tronco)
Reação ao enriquecedor	Depenar + enriquecedor	Indivíduo depenando a presa viva ou alimento.
Reação ao enriquecedor	Desmanchar	Indivíduo desmanchando a bola de jornal que esta enrolando o alimento que foi pendurado, usando as patas e a boca.
Reação ao enriquecedor	Deitar + tronco	Posicionado sobre o tronco novo, esternalmente, lateralmente ou sobre o dorso. Com a cabeça inclinada sobre o tronco.
Reação ao enriquecedor	Arranhar caixa	Indivíduo usando as garras dianteiras, esfregando-as, na caixa com a presa viva.
Reação ao enriquecedor	Esfregar-se + enriquecedor	Indivíduo esfregando-se no enriquecedor (galhos, tronco, folha de bananeira)
Reação ao enriquecedor	Lamber + enriquecedor	Indivíduo lambendo enriquecedor (pau de canela, presa viva, alimento, tronco)
Reação ao enriquecedor	Investigar + caixa com presa viva internamente	Indivíduo investigando com as patas dianteiras a caixa posta em seu recinto.

*Comportamentos baseados no estudo de Rouck et al. (2005)

APÊNDICE II

Número de amostras fecais analisadas para corticóides por indivíduo em cada fase do experimento

Indivíduo	Espécie	Fase			Total
		1°	2°	3°	
1	<i>L. pardalis</i>	3	4	4	11
2	<i>L. pardalis</i>	6	6	8	20
3	<i>L. pardalis</i>	5	7	7	19
4	<i>L. pardalis</i>	2	6	6	14
5	<i>L. pardalis</i>	4	6	4	14
6	<i>L. pardalis</i>	5	6	5	16
7	<i>L. wiedii</i>	4	7	5	16
8	<i>L. tigrinus</i>	5	6	2	13
9	<i>L. tigrinus</i>	6	6	6	18
10	<i>L. tigrinus</i>	5	4	5	14
11	<i>L. tigrinus</i>	5	6	6	17
12	<i>L. tigrinus</i>	4	3	3	10
Total		54	67	61	182