



**PUC Minas**  
**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS**  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
Departamento de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-graduação em Biologia de Vertebrados

Luan de Jesus Matos de Brito

ESTUDO DOS EFEITOS DO TEMPERAMENTO E DO SEXO NAS RESPOSTAS  
COMPORTAMENTAIS E FISIOLÓGICAS DE LOBOS-GUARÁS (*Chrysocyon  
brachyurus*) AO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

Belo Horizonte  
2023

Luan de Jesus Matos de Brito

**ESTUDO DOS EFEITOS DO TEMPERAMENTO E DO SEXO NAS RESPOSTAS  
COMPORTAMENTAIS E FISIOLÓGICAS DE LOBOS-GUARÁS (*Chrysocyon  
brachyurus*) AO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Vertebrados da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito final para obtenção de título de Mestre em Biologia de Vertebrados.

Área de concentração: Conservação e Comportamento.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angélica da Silva Vasconcellos

Belo Horizonte  
2023

## FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

B862e Brito, Luan de Jesus Matos de  
Estudo dos efeitos do temperamento e do sexo nas respostas comportamentais e fisiológicas de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) ao enriquecimento ambiental / Luan de Jesus Matos de Brito. Belo Horizonte, 2023.  
75 f. : il.

Orientadora: Angélica da Silva Vasconcellos  
Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.  
Programa de Pós-Graduação em Biologia de Vertebrados

1. Lobo-Guará. 2. Animais silvestres em cativeiro. 3. Comportamento animal. 4. Temperamento. 5. Estresse. 6. Bem-estar animal. I. Vasconcellos, Angélica da Silva. II. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Vertebrados. III. Título.

SIB PUC MINAS

CDU: 598.45

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Luan de Jesus Matos de Brito

### **ESTUDO DOS EFEITOS DO TEMPERAMENTO E DO SEXO NAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E FISIOLÓGICAS DE LOBOS-GUARÁS (*Chrysocyon brachyurus*) AO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia dos Vertebrados da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito final para obtenção de título de Mestre em Biologia de Vertebrados. Área de concentração: Conservação e Comportamento.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angélica da Silva Vasconcellos – PUC Minas (Orientadora)

---

Prof. Vanner Boere Souza – Universidade Federal do Sul da Bahia (Banca Examinadora)

---

Prof. Dr. Cristiano Schetini de Azevedo – Universidade Federal de Ouro Preto (Banca Examinadora)

Belo Horizonte, 16 de outubro de 2023

## **AGRADECIMENTOS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;

À Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas) pelo financiamento do projeto através do Fundo de Incentivo à Pesquisa da PUC Minas (FIP/PUC Minas) edital 075/2022.

## RESUMO

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), espécie brasileira vulnerável à extinção, é largamente encontrado em zoológicos brasileiros. Restrições impostas pelo ambiente antropogênico podem limitar a diversidade comportamental desses animais e, assim, comprometer seu bem-estar. Técnicas de enriquecimento ambiental têm sido recomendadas às instituições de manutenção de animais silvestres, para promoção do aumento da imprevisibilidade ambiental - o que contribui para a exibição de uma maior diversidade de comportamentos pelos animais. Em trabalhos anteriores, foram registradas, em lobos-guarás, diferentes respostas comportamentais e hormonais a estímulos de imprevisibilidade, inclusive com aumento de hormônios de estresse em certas situações. Neste estudo, investigamos suas respostas a condições de forrageio que proporcionassem graus variáveis de imprevisibilidade com relação ao acesso dos recursos. Nosso objetivo neste trabalho foi levantar possíveis fatores relacionados às diferentes respostas de lobos-guarás ao enriquecimento. Foram implementadas condições controle e experimental, com manipulação da dificuldade de acesso ao alimento, visando investigar como a imprevisibilidade afeta cada sexo. Também foram aplicados testes de temperamento (por Índice de Cautela), como forma de correlacionar as respostas fisiológicas e comportamentais dos lobos com perfis individuais. Aplicamos técnicas de enriquecimento ambiental a 13 lobos-guarás mantidos em criadouros conservacionistas ou zoológicos, com amostragem comportamental pelo método animal focal e registros dos comportamentos por intervalos. Foram feitas oito sessões por dia para cada lobo, em três etapas diferentes: Linha de Base I, Enriquecimento e Linha de Base II, sendo 5 dias, intercalados, de observação por etapa e dosagem de metabólitos de glicocorticoides (hormônios relacionados à resposta ao estresse) das fezes. Os temperamentos dos lobos-guarás não se alteraram em função da apresentação de objetos diferentes, do Sexo, da Idade, da Origem ou da forma de Criação dos animais. Os comportamentos dos lobos-guarás foram influenciados pelo seu Temperamento, assim como pela oferta do Enriquecimento Ambiental, sua Idade, Sexo e Origem; a Criação dos indivíduos não afetou seu comportamento. Os níveis de metabólitos de glicocorticoides foram reduzidos durante a etapa de Enriquecimento Ambiental, e sofreram aumento durante a última fase (controle). Machos e Fêmeas apresentaram valores diferentes para todas as variáveis analisadas, demonstrando a influência do sexo destes animais em seu comportamento e fisiologia. Os dados demonstram a existência de uma necessidade de se conhecerem as individualidades dos animais cativos, para se estabelecer um modelo de manipulação ambiental que favoreça a manutenção de lobos-guarás em boas condições de bem-estar, contribuindo também para a conservação *ex-situ* da espécie.

**Palavras-chave:** Comportamento Animal; Bem-estar Animal; Conservação.

## ABSTRACT

The maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), a Brazilian species vulnerable to extinction, widely found in Brazilian zoos. Restrictions imposed by the anthropogenic environment can limit the behavioral diversity of these animals and thus compromise their well-being. Environmental enrichment techniques have been recommended to institutions that keep wild animals, to promote an increase in environmental unpredictability - which contributes to the display of a greater diversity of behavior by animals. In previous studies, different behavioral and hormonal responses to unpredictability stimuli were recorded in maned wolves, including an increase in stress hormones in certain situations. In this study, we investigated their responses to foraging conditions that provide varying degrees of unpredictability with regard to location and amount of available resources. Our objective in this work was to raise possible factors related to their different responses to enrichment. Control and experimental conditions were implemented, with manipulation of location and difficulty in accessing food, in order to investigate how unpredictability affects each sex. Temperament tests were also applied (by Caution Index), as a way to correlate the physiological and behavioral responses of the wolves with individual profiles. We applied environmental enrichment techniques to 13 maned wolves kept in conservationist or zoological breeding grounds, with behavioral sampling using the focal animal method and recording of behavior at intervals, with eight sessions per day, in three different stages: Baseline I, Enrichment and Baseline II, with 5 days, interspersed, of observation by stage and dosage of glucocorticoids (hormones related to the response to stress) in the stool. The Temperaments of maned wolves did not change due to the presentation of different objects, Sex, Age, Origin or Creation of the animals. The behaviors of the maned wolves were influenced by their Temperament, as well as by the offer of Environmental Enrichment, their Age, Sex and Origin, the Creation of individuals did not affect their behavior. The levels of glucocorticoid metabolites were reduced during the Environmental Enrichment step, and increased during the last phase. Males and females showed different values for all analyzed variables, demonstrating the influence of the sex of these animals on their behavior and physiology. The data demonstrate the existence of a need to know the individualities of captive animals, to establish a model of environmental manipulation that favors the maintenance of maned wolves in good welfare conditions, thus contributing to the ex-situ conservation of the species.

**Keywords:** Animal Behavior; Animal welfare; Conservation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Mapa de distribuição de *Chrysocyon brachyurus*. FONTE: International Union for Conservation of Nature (IUCN) (2016)..... 18
- Figura 2** Enriquecimentos Ambientais utilizados neste estudo nas instituições zoológicas, (A) Caixa de papelão, (B) Trough de folha de bananeira, (C) Caixa de papelão escondida na vegetação (D) Tora de Bambu, (E) Caixa de ovo, (F) Ninhos Artificiais. Os objetos foram escolhidos pela equipe técnica de cada instituição. Todos os itens continham a alimentação usual do indivíduo. .... 36
- Figura 3** Distribuição dos Índices de Cautela calculados através da apresentação de objetos novos aos lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) estudados em instituições zoológicas brasileiras entre dezembro/2022 e março/2023. Marcadores rosas: Fêmeas, Marcadores azuis: Machos. .... 39
- Figura 4** Dispersão dos registros de Locomoção de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) em função de seu Temperamento (Índice de Cautela), com curvas separadas para fêmeas (marcadores rosas) e machos (marcadores azuis), em experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. Os valores em azul e rosa representam os resultados das correlações de Pearson entre temperamento e o comportamento de machos e fêmeas respectivamente. .... 43
- Figura 5** Dispersão dos registros de Forrageio de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) em função de seu Temperamento (Índice de Cautela), com curvas separadas para fêmeas (marcadores rosas) e machos (marcadores azuis), em experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. Os valores em azul e rosa representam os resultados das correlações de Pearson entre temperamento e o comportamento de machos e fêmeas respectivamente. .... 43
- Figura 6** Dispersão dos registros de Locomoção de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) em função do Temperamento (Índice de Cautela), com curvas separadas para Linha de Base I (marcadores rosa), Enriquecimento (marcadores azuis) e Linha de Base II (marcadores verdes) em Experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. Os valores em rosa, azul e verde representam os resultados das correlações de Pearson entre temperamento e as etapas Linha de Base I, Enriquecimento e Linha de Base II respectivamente. .... 44
- Figura 7** Dispersão dos registros de Não Visível de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) em função do Temperamento (Índice de Cautela), com curvas separadas para Linha de Base I (marcadores rosa), Enriquecimento (marcadores azuis) e Linha de Base II (marcadores verdes) em Experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. Os valores em rosa, azul e verde representam os resultados das correlações de Pearson entre temperamento e as etapas Linha de Base I, Enriquecimento e Linha de Base II respectivamente. .... 45

<b>Figura 8</b> Frequência de registros do comportamento Locomoção de lobos-guarás ( <i>Chrysocyon brachyurus</i> ) em função da Etapa* e do sexo dos animais, em Experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. As barras em azul e rosa representam os resultados de machos e fêmeas, respectivamente. As caixas representam o primeiro e o terceiro quartil, as linhas horizontais grossas representam a mediana; os triângulos representam os dados extremos. “NS” não significativo, “*” significância menor que 0,05. ....	46
<b>Figura 9</b> Frequência de registros do comportamento Afiliativo de lobos-guarás ( <i>Chrysocyon brachyurus</i> ) em função da Etapa e do sexo dos animais, em Experimento de reação ao enriquecimento ambiental Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. As barras em azul e rosa representam os resultados de machos e fêmeas respectivamente As caixas representam o primeiro e o terceiro quartil, as linhas horizontais grossas representam a mediana; os triângulos representam os dados extremos. “NS” não significativo.....	47
<b>Figura 11</b> Frequência de registros do estado Não Vísível de lobos-guarás ( <i>Chrysocyon brachyurus</i> ) em função da Etapa e do sexo dos animais, em Experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. As barras em azul e rosa representam os resultados de machos e fêmeas respectivamente. As caixas representam o primeiro e o terceiro quartil, as linhas horizontais grossas representam a mediana; os triângulos representam os dados extremos. “****” significância menor que 0,001, “*” significância menor que 0,05... ..	48
<b>Figura 12</b> Frequência de registros do comportamento Pacing de lobos-guarás ( <i>Chrysocyon brachyurus</i> ) em função da Etapa e do sexo dos animais, em Experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. As barras em azul e rosa representam os resultados de machos e fêmeas respectivamente. As caixas representam o primeiro e o terceiro quartil, as linhas horizontais grossas representam a mediana; os triângulos representam os dados extremos. “NS” não significativo.....	48
<b>Figura 13</b> Frequência de registros do comportamento Parado de lobos-guarás ( <i>Chrysocyon brachyurus</i> ) em função da Etapa e do sexo dos animais, em Experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. As barras em azul e rosa representam os resultados de machos e fêmeas respectivamente. As caixas representam o primeiro e o terceiro quartil, as linhas horizontais grossas representam a mediana; os triângulos representam os dados extremos. “***” significância menor que 0,01, “NS” não significativo.....	49
<b>Figura 14</b> Dispersão das concentrações de metabólitos de glicocorticoides de lobos-guarás ( <i>Chrysocyon brachyurus</i> ) em função do Temperamento (Índice de Cautela), com curvas separadas por sexo: macho (marcadores azuis) e fêmeas (marcadores rosas) em experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. Os valores em azul e rosa representam os resultados das correlações de Pearson entre temperamento e os sexos (macho e fêmea respectivamente). ....	51

<b>Figura 15</b> Níveis de metabólitos de glicocorticoides fecais de lobos-guarás ( <i>Chrysocyon brachyurus</i> ) em função da Etapa e do sexo dos animais, em Experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. As barras em azul e rosa representam os resultados de machos e fêmeas respectivamente. As caixas representam o primeiro e o terceiro quartil, as linhas horizontais grossas representam a mediana; os triângulos representam os dados extremos. “NS” não significativo.....	52
<b>Figura 16</b> Dispersão dos registros de Forrageio de lobos-guarás ( <i>Chrysocyon brachyurus</i> ) em função das concentrações de metabólitos de glicocorticoides com curvas separadas para fêmeas (marcadores rosas) e machos (marcadores azuis), em experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. Os valores em azul e rosa representam os resultados das correlações de Pearson entre temperamento e o comportamento de machos e fêmeas respectivamente. ....	54
<b>Figura 17</b> Dispersão dos registros de Comportamento Afiliativo de lobos-guarás ( <i>Chrysocyon brachyurus</i> ) em função das concentrações de metabólitos de glicocorticoides com curvas separadas para fêmeas (marcadores rosas) e machos (marcadores azuis), em experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. Os valores em azul e rosa representam os resultados das correlações de Pearson entre temperamento e o comportamento de machos e fêmeas respectivamente. ....	54
<b>Figura 18</b> Dispersão dos registros de Não Visível de lobos-guarás ( <i>Chrysocyon brachyurus</i> ) em função das concentrações de metabólitos de glicocorticoides com curvas separadas para fêmeas (marcadores rosas) e machos (marcadores azuis), em experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. Os valores em azul e rosa representam os resultados das correlações de Pearson entre temperamento e o comportamento de machos e fêmeas respectivamente. ....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Indivíduos de lobo-guará que foram investigados neste estudo e instituições que os mantêm .....	31
<b>Tabela 2</b> Descrição das categorias comportamentais utilizadas para caracterização dos comportamentos dos lobos-guarás observados durante o Teste de Objeto Novo. ....	33
<b>Tabela 3</b> Descrição das categorias comportamentais utilizadas para caracterização dos comportamentos durante as etapas Linha de Base I, Enriquecimento e Linha de Base II .....	34
<b>Tabela 4</b> Resultado do Modelo Linear Generalizado (GLMM) investigando efeitos do Sexo (macho ou fêmea), Idade (em anos), Origem (se nascido na natureza ou nascido na instituição) e Criação (se criado pelos pais ou por humanos) sobre o Índice de Cautela dos lobos-guarás ( <i>Chrysocyon brachyurus</i> ), calculado através da apresentação de objetos novos aos animais. ....	39
<b>Tabela 5</b> Resultados do Modelo Linear Generalizado (GLMM) investigando a influência do Temperamento (IC), da Etapa (Linha de Base I, Enriquecimento, Linha de Base II), do Sexo (macho ou fêmea), da Idade (em anos), da Origem (se nascido na instituição ou capturado da natureza) e da Criação (se criado pelos pais ou por humanos) sobre o comportamento dos lobos-guarás ( <i>Chrysocyon brachyurus</i> ) estudados. ....	41
<b>Tabela 6</b> Resultados do Modelo Linear Generalizado (GLMM) avaliando a influência do Temperamento (IC), Etapa (Linha de Base I, Enriquecimento, Linha de Base II), Sexo (macho ou fêmea), Idade (em anos), Origem (se nascido na instituição ou em vida livre) e Criação (se criado pelos pais ou por humanos) nas concentrações de metabólitos fecais de glicocorticoides dos lobos-guarás ( <i>Chrysocyon brachyurus</i> ) estudados. ....	50
<b>Tabela 7</b> Resultados dos Modelos Lineares Generalizados (GLMM) avaliando a influência das concentrações de Metabólitos de Glicocorticoides e do Sexo (macho ou fêmea) nos comportamentos dos lobos-guarás ( <i>Chrysocyon brachyurus</i> ) estudados. ....	52

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>1.1. Espécie em estudo (<i>Chrysocyon brachyurus</i>, Illiger, 1815)</b> .....	17
<b>1.2. Metabólitos de glicocorticoides</b> .....	21
<b>1.3. Objetivos</b> .....	23
<b>1.3.1. Objetivo Geral</b> .....	23
<b>1.3.2. Objetivos Específicos</b> .....	23
<b>1.4. Hipóteses e Predições</b> .....	24
<b>1.5. Justificativa</b> .....	25
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
<b>2.1. Questões éticas</b> .....	27
<b>2.2. Instalações</b> .....	28
<b>2.2.1. Parque Vida Cerrado (PViC)</b> .....	28
<b>2.2.2. Fundação Jardim Zoológico de Brasília (FJZB)</b> .....	29
<b>2.4. Procedimentos</b> .....	32
<b>2.4.1. Teste de objeto novo (Avaliação de Temperamento)</b> .....	32
<b>2.4.2. Enriquecimento ambiental</b> .....	34
<b>2.4.3. Coleta, extração e quantificação hormonal</b> .....	37
<b>2.4.4. Análises estatísticas</b> .....	38
<b>3. RESULTADOS</b> .....	39
<b>3.1. Teste de Objeto Novo</b> .....	39
<b>3.2. Respostas Comportamentais</b> .....	41
<b>3.3. Efeitos Hormonais</b> .....	50
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	56
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	66
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	67

## 1. INTRODUÇÃO

A manutenção de animais silvestres sob cuidados humanos data de mais de cinco mil anos, época em que os egípcios capturavam pequenos gatos, babuínos e leões, para demonstrar força e poder, passando esse costume para os demais cidadãos (Sanders, Feijó, 2007). Por muito tempo, a manutenção de animais silvestres perdurou apenas com caráter de entretenimento, tendo essa realidade sido alterada somente em 1752, na cidade de Viena, no Zoológico Imperial de Schönbrunn e, posteriormente, em 1794, no Zoológico de Paris. Essas instituições passaram a desenvolver pesquisas, e a entrada só era permitida com a autorização de um pesquisador, sendo posteriormente ampliada para permitir que estudantes do Museu frequentassem as instituições (Tavares, 2011).

Com o desenvolvimento de pesquisas em instituições zoológicas e o avanço dos esforços de conservação, zoológicos e criadouros têm contribuído cada vez mais para a conservação de espécies ameaçadas, em ação chamada de “conservação *ex-situ*”. A conservação *ex-situ* surge como um complemento relevante para a conservação *in-situ*, principalmente, quando se trata de espécies raras ou com altos níveis de ameaça de extinção (Back et al., 2021). Modernamente, esforços de conservação têm sido empreendidos de forma integrada, unindo ações *in-situ* e *ex-situ*, uma abordagem conhecida como conservação *pan-situ* (Keulartz, 2015). Nessa abordagem, os zoológicos e criadouros têm uma importante responsabilidade em relação à conservação: a manutenção de animais em boas condições de bem-estar (Mellor e colaboradores, 2015), servindo como banco genético, ou aderindo a programas de soltura.

As restrições impostas pelo ambiente de cativeiro, entretanto, podem limitar a diversidade comportamental dos animais e, assim, comprometer seu bem-estar (Carlstead, 1996). Para mitigar este efeito, é aplicado o enriquecimento ambiental, um conjunto de

técnicas usadas para modificar o ambiente, tanto físico quanto social em que animais são mantidos sob cuidados humanos, a fim de melhorar sua qualidade de vida, tendo vários trabalhos comprovado sua eficácia (ex: Clegg et al., 2023, Radical et al., 2023, Vasconcellos, 2009). Alguns enriquecimentos encorajam comportamentos e habilidades que seriam exibidos em ambiente natural, gerando resultados desejáveis, como o desenvolvimento motor e cognitivo, como mostram os resultados de Clegg e colaboradores (2023) em seu estudo com golfinhos, como também em reduzir comportamentos indesejados, assim como aferido por Donald e colaboradores (2023) em estudo com leões-marinhos e elefantes-marinhos.

Em estudos anteriores de nossa equipe (Catapani, et al., 2018; Miglioli, Vasconcellos, 2021; Oliveira, Vasconcellos, 2022; Vasconcellos et al., 2011), foi testada e comprovada a eficácia de técnicas de enriquecimento ambiental para melhoria das condições de bem-estar de várias espécies silvestres mantidas sob cuidados humanos. Em lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) (Vasconcellos et al. 2009), registraram-se diferentes respostas comportamentais e hormonais a estímulos de imprevisibilidade – comumente usados para estimular comportamentos desejáveis em animais silvestres sob cuidados humanos. Algumas dessas respostas sugeriram um aumento de níveis de estresse diante da imprevisibilidade em alguns dos indivíduos estudados. Resultados como esse apontam para a importância de se compreenderem as respostas desses animais aos estímulos de seu ambiente, aspecto imprescindível para que indivíduos da espécie sejam mantidos sob cuidados humanos em boas condições de bem-estar.

A literatura já documentou a existência de diversos temperamentos entre os indivíduos de diferentes espécies animais. McDougall e colaboradores (2006) definem o temperamento como um conjunto relativamente consistente de disposições individuais que influenciam as manifestações comportamentais de um indivíduo. Essas disposições são resultantes da interação entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. As análises de

temperamento geralmente se baseiam em seis domínios, que abrangem uma variedade de comportamentos: Neofobia e exploração (Archer, 1973; Greenberg e Mettke-Hoffman, 2001; Walsh e Cummins, 1976), Ousadia (Boissy, 1995; Gosling, 2001), Mansidão (Grandin, 1998; Price, 2002), Atividade (Archer, 1973), Agressividade (De Boer et al., 2003; Earley et al., 2000) e Sociabilidade (Faure, Mills, 1998).

O temperamento dos animais pode exercer influência significativa em seus comportamentos, como exemplificado por Drent e colaboradores (2003), que observaram padrões de comportamento antipredação em *Parus major*. No contexto deste estudo, nos concentramos no domínio da Neofobia e exploração, conforme descrito por Archer (1973), Greenberg e Mettke-Hoffman (2001), e Walsh e Cummins (1976). Isso se justifica pelo fato de que o comportamento de forrageio, especialmente enfatizado nesta pesquisa, está intrinsecamente ligado à exploração do ambiente e, conseqüentemente, à sobrevivência dos animais. Essa relação entre comportamento de forrageio e sobrevivência é evidenciada em estudos como o de Romtveit e colaboradores (2021) sobre o comportamento de forrageio das renas (*Rangifer tarandus*), onde observaram que essa espécie aumenta sua taxa de forrageio para localizar áreas com menor cobertura de neve e maior disponibilidade de alimento.

Assim como o temperamento dos indivíduos pode influenciar nas suas respostas ao ambiente, o sexo também pode influenciar respostas aos estímulos ambientais. Em estudo envolvendo animais transgênicos, Stam e colaboradores (2008) notaram uma diferença entre as respostas de ratos machos e fêmeas ao estímulo do Enriquecimento Ambiental, onde as fêmeas se apresentaram mais estressadas que os machos durante e após a oferta do enriquecimento, esta diferença nas respostas entre machos e fêmeas também pode ser encontrada em outras espécies, como relatado por Harrison e colaboradores (2022). Ainda não há dados que suportem a ideia de que, nos lobos-guarás, também haja diferenças entre os sexos nas reações a estímulos ambientais, mas levando em consideração os achados de

Vasconcellos (2009), Stam e colaboradores (2008) e Harrison e colaboradores (2022), existe a possibilidade de ocorrer esta diferença.

Neste estudo, investigamos as reações comportamentais e fisiológicas de lobos-guarás a condições relativamente exigentes de forrageio. Avaliamos os possíveis efeitos do temperamento e do sexo dos animais nessas respostas, uma vez que Vasconcellos (2009) encontrou indícios de influência do temperamento e do sexo de lobos-guarás em suas respostas comportamentais e fisiológicas à oferta de enriquecimento ambiental.

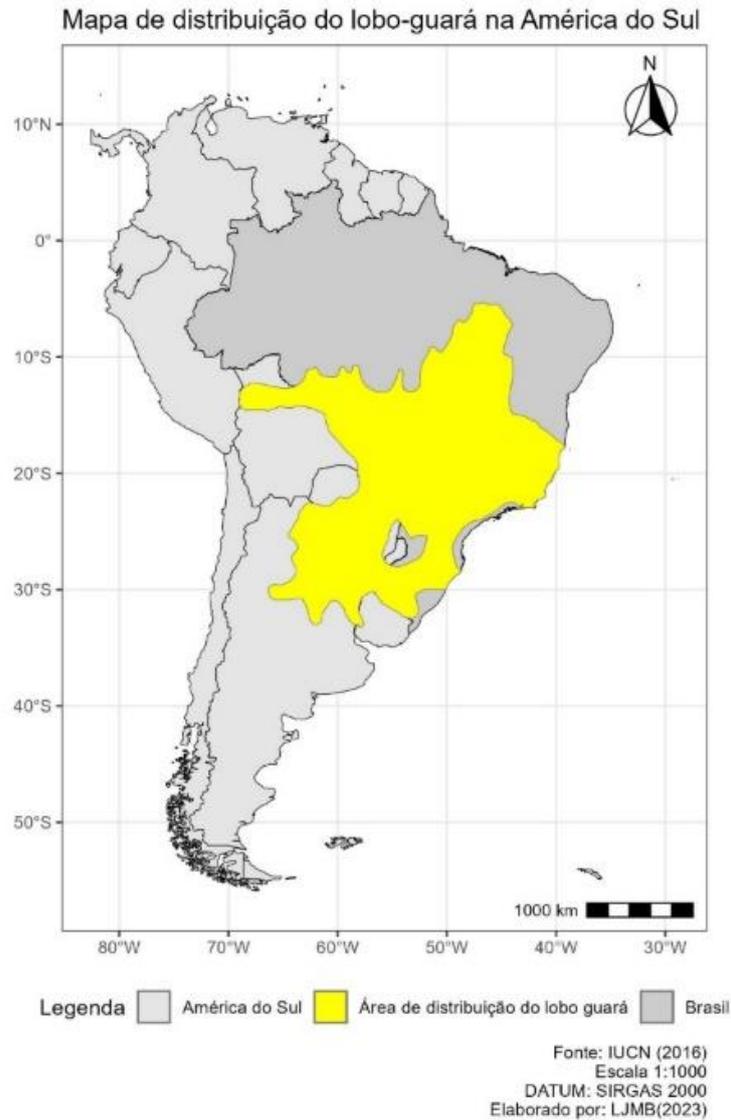
### **1.1. Espécie em estudo (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1815)**

O lobo-guará, o maior representante da família Canidae na América do Sul, tem uma altura média de cerca de 47 cm e um comprimento total de aproximadamente 147 cm. Seu peso varia entre 20 kg e 32 kg, de acordo com Azevedo (2008) e Redford e Eisenberg (1992). Essa espécie tem sua distribuição geográfica concentrada principalmente no Brasil central, Paraguai e nas planícies da Bolívia oriental, conforme ilustrado na Figura 1, de acordo com as informações de Dietz (1985), Rumiz e Sainz (2002) e Queirolo e colaboradores (2011).

O lobo-guará habita áreas de campos e cerrados na região central da América do Sul, conforme documentado por Dietz (1985) e Queirolo (2011). Além disso, é possível encontrar populações no estado do Rio Grande do Sul, no norte e nordeste da Argentina, e no Uruguai, onde seu limite sul de ocorrência era anteriormente delimitado entre os paralelos 37° e 39°, de acordo com Queirolo (2011). No entanto, Paula e DeMatteo (2016) sugerem que a espécie provavelmente esteja extinta no Uruguai atualmente.

No Brasil, o lobo-guará é mais comumente encontrado nos biomas cerrado e pampa, conforme relatado por De Paula e colaboradores (2013), ocupando ambientes de vegetação aberta, como campos, charcos e pântanos. Suas características anatômicas lhe conferem a habilidade de forragear em ambientes com vegetação alta, como mencionado por Dietz (1984).

A espécie é classificada como "Vulnerável" (VU) no estado de Minas Gerais e em todo o território brasileiro, de acordo com COPAM (2010), ICMBio (2013) e Machado e colaboradores (2008). Em termos internacionais, o lobo-guará é classificado como "Quase Ameaçado" (NT), conforme relato de Paula e DeMatteo (2016). Essas classificações se devem principalmente à ampla distribuição da espécie e às ameaças decorrentes das atividades humanas, como a fragmentação de seu habitat e atropelamentos, como destacado por Paula e DeMatteo (2016).



**Figura 1** Mapa de distribuição de *Chrysocyon brachyurus*. FONTE: International Union for Conservation of Nature (IUCN) (2016)

Há uma expansão na ocorrência da espécie nas porções leste e sudeste do Brasil, associada ao desmatamento da Mata Atlântica e à conversão de habitats em pastagens para a criação de gado (Queirolo, 2011), assim como na região Amazônica, como no sul do estado de Rondônia (Goebel et al., 2019) e na região dos chacos argentinos (Orozco et al., 2023). Em 2008, Paula e colaboradores estimaram que a população brasileira de *Chrysocyon brachyurus* tinha cerca de 21.746 indivíduos; esse cálculo foi feito a partir de várias

estimativas de densidade entre as populações do cerrado. Já em 2016, Paula e DeMatteo orçaram uma população de 17.000 indivíduos adultos. Foi diagnosticada uma tendência de redução dessa população por motivos antropogênicos, como a redução de sua área natural e atropelamentos (De Paula et al., 2008).

*Chrysocyon brachyurus* apresenta um comportamento crepuscular-noturno, sendo seu padrão de comportamento relacionado à umidade relativa do ar mais do que ao horário (Paula et al., 2013). Spanò e colaboradores (2021) encontraram diferenças individuais nos padrões de locomoção da espécie quando se trata de horários de pico de atividade; esta diferença pode estar relacionada com a idade dos indivíduos, como discorrem os próprios autores, relatando que indivíduos mais novos tendem a apresentar padrão de atividade noturno. O contato direto com humanos também alterou seu padrão de atividades; aqueles indivíduos que, durante seu tempo de vida, passaram mais tempo em contato com humanos desenvolveram comportamento antropofílico, alterando seu padrão de atividade noturno para diurno (Spanò et al. 2021).

A vocalização do lobo-guará é utilizada na marcação de território, mas também para comunicação entre casais e na interação com filhotes (Brady, 1981; Kleiman, 1972; Silveira, 1999), sendo possível o reconhecimento individual pela vocalização por outros lobos (Balieiro; Monticelli, 2019).

A dieta do lobo-guará é onívora generalista e oportunista, de variação sazonal. A espécie consome uma ampla diversidade de frutos e vertebrados de pequeno porte, como roedores, marsupiais, tatus e sauropsídeos, além de representantes de artrópodes (Carvalho, 1976). Podendo incluir em sua alimentação presas de maior porte, como veados-campeiros, raposas-do-campo, cachorros-do-mato e porcos-do-mato, conforme relatado por Rodrigues (2002). Este autor encontrou vestígios desses animais nas fezes de lobos-guarás, o que não

comprova predação, mas sugere que o lobo-guará se alimente dessas espécies quando encontra suas carcaças.

Em áreas de cerrado, é comum que o lobo-guará se alimente de diversos frutos, como o da lobeira (*Solanum lycocarpum*) (Queirolo e Motta-Junior, 2007); nos demais biomas em que o lobo-guará ocorre (Pantanal e Mata Atlântica), a espécie apresenta maior frequência de consumo de outras espécies de frutos (Amboni, 2007).

De acordo com Dietz (1984), o comportamento reprodutivo do lobo-guará é monogâmico facultativo; o macho e a fêmea que formam o casal apresentam áreas de vida sobrepostas, porém são caçadores solitários e evitam caçar com outros indivíduos. As fêmeas são monoéstricas, com um período de gestação de 60 a 65 dias e uma ninhada com uma média de dois filhotes (Fletchall et al., 1995). O acasalamento ocorre desde o final do outono até princípios do inverno e os nascimentos ocorrem no inverno (Carvalho, 1976; Kleiman, 1972; Roeben, 1975). Durante a época reprodutiva, o casal compartilha a mesma área, que pode variar de 25,23km<sup>2</sup> até 80,18km<sup>2</sup>. É possível determinar a formação de casais e início da época reprodutiva através da aceitabilidade da fêmea quanto à presença do macho em seu território (Azevedo, 2008; Brito et al., 2022; Dietz, 1984; Jácomo et al., 2009; Melo et al., 2006; Silveira, 1999; Vasconcellos, 1995).

## 1.2. Metabólitos de glicocorticoides

A mensuração de metabólitos de glicocorticoides (MGC) em amostras fecais é frequente desde meados de 1999 (Brown, 1999). Glicocorticoides são liberados pelo córtex da glândula adrenal, durante a estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, em resposta à liberação do hormônio adrenocorticotrófico pela hipófise anterior (Boonstra, 2004). O hormônio é metabolizado pelos rins e excretado na urina, mas também é metabolizado pelo fígado, onde é, junto à bile, armazenados na vesícula biliar e excretado nas fezes (Möstl, Palme, 2002).

Os glicocorticoides regulam uma série de processos metabólicos, permitindo que os animais ajustem suas funções em situações imprevisíveis; a secreção de glicocorticoides está associada à adaptação a mudanças (Martin, Crump, 2003). A liberação de glicocorticoides em altas quantidades está ligada à resposta ao estresse, também conhecida como resposta de fuga ou luta (Axerlrod, Reisine, 1984; Goymann, et al., 2002). Segundo Onbasilar e Aksoy (2005) níveis altos de glicocorticoides indicam que o indivíduo foi submetido a situações estressantes. Alterações no padrão de liberação de glicocorticoides também estão relacionadas com a sazonalidade, sendo necessária a adoção de medidas controle antes de afirmar a existência de situação de estresse danoso no animal (Equizábal et al., 2021).

Suàrez e colaboradores (2017) encontraram uma correlação entre os níveis de glicocorticoides de felinos silvestres mantidos em zoológicos com suas condições de bem-estar durante as visitas da comunidade, onde *Lynx lynx*, *Lynx rufus* e *Panthera leo persica*, aumentaram seus níveis cortisol, enquanto para *Panthera onca*, não houve relação. A

permanência de níveis altos de glicocorticoides no organismo já foi associada ao aparecimento de comportamentos como arrancamento de penas, automutilação, comportamentos agonísticos em excesso, estereotípias e a fobias (Queiroz et al. 2012), que indicam o surgimento de problemas multifatoriais na saúde nos animais (Stothart et al 2016).

Alejandro e colaboradores (2023) empregaram a mensuração de glicocorticoides em primatas não-humanos, juntamente com a avaliação comportamental. Isso foi feito para avaliar o estresse em indivíduos solitários e em grupos, revelando que os indivíduos alocados em grupos apresentavam menores níveis de glicocorticoides em comparação com aqueles que viviam de forma solitária. Além disso, observou-se que a taxa de comportamentos agressivos estava positivamente relacionada com os níveis de glicocorticoides nas amostras fecais, sugerindo uma associação entre agressividade e níveis de estresse.

A mensuração dos metabólitos de glicocorticoides em animais silvestres em cativeiro desempenha um papel crucial na avaliação do bem-estar (Suàrez et al. 2017) e tem potencial para contribuir para a eficácia dos programas de conservação e reprodução em ambientes controlados. Essa análise oferece informações vitais sobre o nível de estresse, saúde e adaptação desses animais ao cativeiro (Onbasilar; Aksoy, 2005), permitindo aos cuidadores e pesquisadores ajustar as condições de alojamento, nutrição e manejo de forma a minimizar o estresse e promover o bem-estar. Além disso, a monitorização dos níveis de glicocorticoides auxilia na avaliação do impacto do confinamento (Alejandro et al., 2023) e no desenvolvimento de estratégias de enriquecimento ambiental, contribuindo para a preservação de espécies ameaçadas e sua possível reintrodução na natureza. Portanto, a mensuração dos metabólitos de glicocorticoides em animais silvestres em cativeiro é essencial para assegurar que esses indivíduos mantenham a vitalidade necessária para a sobrevivência de suas espécies a longo prazo.

## **1.3.Objetivos**

### ***1.3.1. Objetivo Geral***

Este trabalho teve como objetivo avaliar se o temperamento e o sexo dos lobos-guarás influenciam suas respostas comportamentais e fisiológicas aos desafios impostos pelo enriquecimento ambiental alimentar.

### ***1.3.2. Objetivos Específicos***

- Registrar o comportamento dos lobos-guarás em condições usuais (sem intervenções – condições de Linha de Base) e quando o alimento dos animais é apresentado através de técnicas de enriquecimento ambiental (Condição Experimental);
- Avaliar as concentrações de metabólitos fecais de glicocorticoides em ambas as condições (Linha de Base e Experimental)
- Registrar as respostas comportamentais dos lobos-guarás a testes de objeto novo (teste de temperamento);
- Investigar a existência de correlações do temperamento e do sexo dos animais com suas respostas comportamentais e fisiológicas ao enriquecimento;

#### **1.4.Hipóteses e Predições**

A hipótese a ser testada neste estudo é de que o temperamento e o sexo dos lobos-guarás exercem influência sobre suas respostas ao estímulo do enriquecimento ambiental. Desta forma, baseados nos estudos de Vasconcellos (2009), desenvolvemos as seguintes predições: 1- animais de temperamento cauteloso hesitarão em interagir com o enriquecimento ambiental, enquanto que os animais mais exploradores interagirão intensamente; 2- indivíduos fêmeas demonstrarão mais cautela ao estímulo do enriquecimento que machos; 3- indivíduos machos cautelosos demonstrarão mais interesse pelo enriquecimento do que fêmeas exploradoras; 4- animais mais exploradores apresentarão um aumento dos metabólitos fecais de glicocorticoides frente aos itens de enriquecimento ambiental pois, embora tendam a ser mais neofílicos que indivíduos mais cautelosos, podem apresentar maior excitação frente a novidades (Koolhas et al. 1999); 6- animais mais cautelosos apresentarão redução dos metabólitos fecais de glicocorticoides frente aos itens de enriquecimento ambiental, pois tenderão a se expor menos (Koolhas et al. 1999).

## **1.5. Justificativa**

O bem-estar animal é um dos pilares mais importantes em instituições de manejo de animais silvestres (Bowkett, 2009). A aplicação de técnicas que aumentam a imprevisibilidade do ambiente de animais mantidos sob cuidados humanos é feita para promover esse bem-estar, estimulando a exibição de comportamentos e habilidades comuns em indivíduos de vida livre e gerando desenvolvimento motor e cognitivo dos animais cativos (Clegg et al.; 2023). Oliveira e Vasconcellos (2022) encontraram que altos índices de imprevisibilidade melhoram o bem-estar de animais cativos, mas se tratando do comportamento, estes mesmos autores encontraram que situações de alta imprevisibilidade aumentam comportamentos agonísticos e diminuem comportamentos exploratórios. Basset e Buchanan-Smith (2007) discutem sobre o lado negativo da imprevisibilidade, o aumento dos níveis de glicocorticoides, que em animais de vida livre, representa a adaptação à situação; em animais cativos, o aumento crônico, pode resultar em atraso da puberdade, supressão do crescimento, exaustão metabólica e aumento das chances de doenças neurais e apoptose. Segundo Vasconcellos (2009) e Vasconcellos e colaboradores (2009), pode haver diferença nas respostas de lobos-guarás com diferentes temperamentos e sexos ao enriquecimento ambiental. Partindo desses dados, descobrir, através de avaliações precisas, as melhores estratégias de enriquecimento ambiental a serem ofertadas para diferentes indivíduos auxiliará na manutenção de lobos-guarás sob cuidados humanos em boas condições de bem-estar.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Questões éticas**

Este projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (CEUA PUC Minas) e teve sua execução autorizada sob o número de protocolo 18/2022 conforme a Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, e o Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). A coleta e o transporte do material biológico das instituições zoológicas para a Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais foi autorizado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob o nº 86369-1 de acordo com o artigo 28 da Instrução Normativa do ICMBio nº 03/2014.

## 2.2.Instalações

O presente estudo foi desenvolvido em duas instituições: Parque Vida Cerrado (BA) e Fundação Jardim Zoológico de Brasília (DF), entre os meses de novembro de 2022 e março de 2023.

### 2.2.1. Parque Vida Cerrado (PViC)

Localizado no município de Barreiras, estado da Bahia, o Parque Vida Cerrado (PViC) foi criado em 2006 pelo Instituto Lina Galvani, possuindo três núcleos de atuação: fauna, flora e comunidade. No núcleo da fauna, o PViC atua como criadouro científico para fins de conservação, abrigando no plantel as espécies: *Alouatta caraya* (bugio-preto), *Anodorhynchus hyacinthinus* (arara-azul-grande), *Blastocerus dichotomus* (cervo-do-pantanal), *Chrysocyon brachyurus* (lobo-guará), *Geranoaetus albicaudatus* (gavião-do-rabo-branco), *Mazama gouazoubira* (veado-catingueiro), *Myrmecophaga tridactyla* (tamanduá-bandeira) e *Rhea americana* (ema).

Os recintos destinados à espécie *Chrysocyon brachyurus* nesta instituição seguem a Instrução Normativa do IBAMA 07 de 30 de abril de 2015 (Brasil, 2015), contendo um mínimo de 200m<sup>2</sup>, além de serem vegetados com espécies nativas do cerrado, dando ao animal a possibilidade de se esconder.

### **2.2.2. Fundação Jardim Zoológico de Brasília (FJZB)**

Este Zoológico, que foi previsto no Plano Piloto de Brasília e instituído como Fundação Zoobotânica em 6 de dezembro de 1957, desenvolve ações com foco na educação ambiental e na conservação da fauna brasileira e exótica. É um órgão da administração indireta, vinculado à Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Proteção Animal (SEMA).

Os recintos de lobos-guarás da instituição seguem parcialmente a Instrução Normativa do IBAMA 07, de 30 de abril de 2015 (Brasil, 2015), não há vegetação nativa e há poucas alternativas para o animal se esconder.

### **2.3.Sujeitos**

Foram estudados 13 lobos-guarás, sendo sete no PViC e seis na FJZB (Tabela 1).

**Tabela 1** Indivíduos de lobo-guará que foram investigados neste estudo e instituições que os mantêm

Indivíduo	Nome	Indivíduos no mesmo recinto	Sexo	Idade (em anos)	Instituição	Criado por humanos (H) ou pelos pais (P) [Criação]	Nascimento (N) ou captura (C)/Ano [Origem]	Local de origem			
M1	Thor	-	Macho	9	PviC	H	C 2013	Lorena - SP			
M2	Vitor	F1	Macho	10	PviC	P	N 2012	Luis Eduardo Magalhães - BA			
M3	Ipê	F2, F3, M4	Macho	1	PviC	H	C 2021	Luis Eduardo Magalhães - BA			
M4	Umbu	M3, F2, F3	Macho	1	PviC	H	C 2021	Luis Eduardo Magalhães - BA			
M5	Orelha	F6	Macho	~12	FJZB	P	C 2012	Brasília -DF			
M6	Zangado	M6	Macho	3	FJZB	H	C 2021	Mato Grosso			
F1	Elkie	M2	Fêmea	6	PviC	H	C 2016	Luis Eduardo Magalhães - BA			
F2	Seriguela	M3, M4, F3	Fêmea	2	PviC	H	C 2020	Brasília - DF			
F3	Jurema	M3, M4, F2	Fêmea	1	PviC	H	C 2021	Luis Eduardo Magalhães - BA			
F4	Gisele	F5	Fêmea	~13	FJZB	P	C 2010	Minas Gerais			
F5	Mônica	F4	Fêmea	8	FJZB	P	N 2015	Brasília - DF			
F6	Uli	M5	Fêmea	~15	FJZB	P	C 2009	Brasília - DF			
F7	Amanda	M6	Fêmea	~6	FJZB	P	C 2017	Brasília - DF			
PViC	=	Parque	Vida	Cerrado;	FJZB	=	Fundação	Jardim	Zoológico	de	Brasília.

## 2.4.Procedimentos

### 2.4.1. *Teste de objeto novo (Avaliação de Temperamento)*

Foram conduzidos, anteriormente ao início do experimento que envolvia o enriquecimento ambiental, testes de Objeto Novo (Walsh e Cummins, 1976) para averiguar características individuais dos lobos-guarás em relação à aproximação de objetos desconhecidos. O modelo de Bremner-Harrison e colaboradores (2004) foi aplicado, com modificações pertinentes para adaptação do teste à espécie em estudo. Este teste consiste em apresentar ao animal objetos que supostamente ele não conheça, oferecendo situações em que se torne possível a avaliação de seu perfil relacionado ao domínio de comportamentos exploratórios ou cautelosos. Antes do teste, os animais eram contidos no cambamento, momento este em que os objetos eram posicionados no recinto. Após isso, os animais eram liberados e filmados por 15 minutos. Sessões deste teste foram conduzidas antes e depois da do experimento do enriquecimento ambiental. Durante a aplicação deste teste, os animais foram observados pelo método focal, com registro contínuo.

Para avaliar a cautela dos indivíduos, foi mensurada a exibição de comportamentos cautelosos e exploratórios por ele.

Também aplicou-se o Índice de Cautela, seguindo a fórmula proposta por Vasconcellos (2009):

$$IC = \frac{PC}{PC - PE}$$

onde “IC” refere-se ao Índice de Cautela, “PC” é à proporção média de comportamentos cuidadosos, e “PE”, a proporção média de comportamentos exploratórios. Os

comportamentos considerados como “exploratórios” e “cautelosos” estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2** Descrição das categorias comportamentais utilizadas para caracterização dos comportamentos dos lobos-guarás observados durante o Teste de Objeto Novo.

<b>COMPORTAMENTOS EXPLORATÓRIOS</b>	
<b>Descansar relaxado, olhando para o objeto</b>	Permanecer deitado em uma postura relaxada, com as orelhas levantadas, olhando para o objeto.
<b>Investigar</b>	Caminhar ou ficar parado enquanto fareja ou observa o objeto.
<b>Aproximar-se do objeto</b>	Caminhar diretamente na direção do objeto, olhando para este, orelhas e corpo ereto.
<b>Tocar o objeto</b>	Tocar e/ou mover o objeto com as patas ou o focinho.
<b>Brincar com o objeto</b>	Morder, jogar para o ar, perseguir ou saltar com o objeto.
<b>Marcar o objeto</b>	Marcar o objeto com urina ou esfregar o corpo nele.
<b>COMPORTAMENTOS CAUTELOSOS</b>	
<b>Descansar alerta, olhando para o objeto</b>	Permanecer deitado ou em pé, com as orelhas abaixadas, olhando para o objeto.
<b>Aproximar-se de forma hesitante</b>	Caminhar lentamente em direção ao objeto, com frequentes avanços e recuos, orelhas e corpo abaixados ou com os pelos eriçados.
<b>Fugir</b>	Correr ou pular em direção ao cabeamento, ou em direção oposta ao objeto.
<b>Investigar de forma hesitante</b>	Andar ou ficar em pé enquanto fareja, observa ou toca o objeto, com frequentes avanços e recuos, orelhas e corpo abaixados.
<b>Esconder-se</b>	Após ser liberado no recinto, o animal retorna ao cabeamento e permanece lá.

### 2.4.2. *Enriquecimento ambiental*

Este experimento foi dividido em três fases (Linha de Base I, Enriquecimento, Linha de Base II), cada uma delas com a duração de 10 dias. Durante todas as fases, foram feitos registros do comportamento dos animais pelo método Animal Focal, com registro por intervalos. Cada sessão teve duração de 5 minutos, com registros dos comportamentos a cada 30 segundos. Foram oito sessões diárias de observações do comportamento de cada lobo-guará. Ao todo, cada indivíduo foi observado por 40 minutos por dia de coleta. Esses registros, assim como a coleta de fezes dos animais, foram feitos em dias alternados. As coletas de fezes foram feitas, também nas três etapas, nos dias subsequentes aos registros comportamentais, para que fosse possível correlacionar as concentrações de glicocorticoides com os comportamentos apresentados pelos animais no dia anterior (tempo necessário para metabolização dos hormônios; Vasconcellos et al., 2011).

Os comportamentos analisados durante as etapas de Linha de Base I, Enriquecimento e Linha de Base II, encontram-se descritos na Tabela 3.

**Tabela 3** Descrição das categorias comportamentais utilizadas para caracterização dos comportamentos durante as etapas Linha de Base I, Enriquecimento e Linha de Base II .

<b>Comportamento</b>	<b>Descrição</b>
Locomoção	Andar ou correr, quando não envolvido em outra atividade
Forrageio	Alimentar-se, manipular o alimento, caçar, esconder o alimento
Comportamento Agonístico	Intra ou inter-específico; abrir a boca (para outro indivíduo como forma de ameaça), rosnar, latir, perseguir, morder, eriçar os pelos da crina
Comportamento Afiliativo	Intra ou inter-específico; cheirar outro indivíduo, levantar o rabo sem rosnar, aproximação amigável
Exploração	Farejar chão, árvores, folhagens
Brincadeira	Morder, jogar para o ar, perseguir ou saltar

	com objeto, voltar-se para outro indivíduo abaixando a parte dianteira do corpo
<i>Pacing</i>	Ir e vir compulsivamente em pequeno espaço por mais de 3 vezes
Parado	Permanecer parado em pé
Não Visível	Registrado quando o animal não está a vista do observador
Descanso	Permanecer deitado com a cabeça levantada ou abaixada
Outros	Comportamentos não relacionados as categorias anteriores

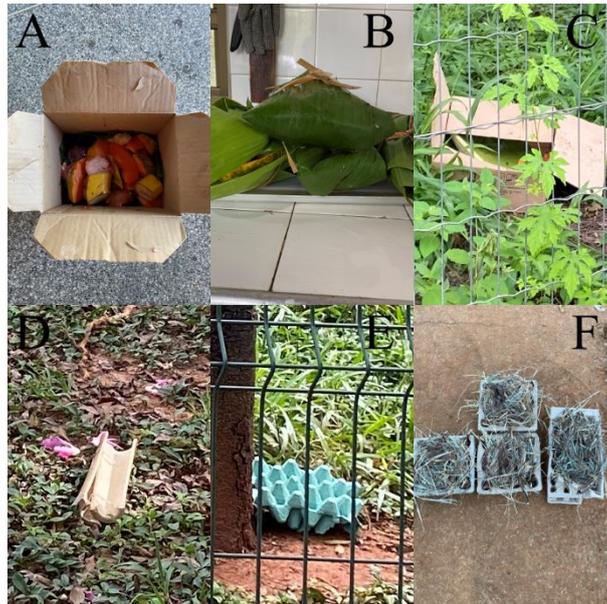
---

#### Fase I: Linha de Base I

Nesta fase, os animais foram mantidos e observados em sua condição usual (sem intervenções).

#### Fase II: Enriquecimento

Aplicaram-se técnicas de enriquecimento ambiental alimentar para todos os animais envolvidos no estudo. Essas técnicas constituíram-se de alimentos sendo ofertados em: caixas de papelão escondidas no recinto ou com acesso dificultado, preenchidas com vegetação ou feno, toras de bambu, caixas de ovos, ninhos artificiais, trouxas de folha de bananeira (Figura 2), sempre um para cada animal, ou com o alimento escondido na vegetação. Os enriquecimentos foram alterados por dia, sendo decididos junto a equipe técnica.



**Figura 2** Enriquecimentos Ambientais utilizados neste estudo nas instituições zoológicas, (A) Caixa de papelão, (B) Trougha de folha de bananeira, (C) Caixa de papelão escondida na vegetação (D) Tora de Bambu, (E) Caixa de ovo, (F) Ninhos Artificiais. Os objetos foram escolhidos pela equipe técnica de cada instituição. Todos os itens continham a alimentação usual do indivíduo.

### Fase III: Linha de Base II

Nesta fase, foram retomados os procedimentos da Fase I, para avaliar possível reversão das mudanças de comportamento registradas na fase II.

### **2.4.3. Coleta, extração e quantificação hormonal**

As amostras de fezes eram colhidas sempre pela manhã, era selecionado o bolo fecal mais fresco, e o material era armazenado em sacos de plástico com fechamento em zíper, identificados com nome do animal e data de coleta. Foram mantidas em ambiente a -20°C até serem enviadas para extração e dosagem hormonal. Para os animais que compartilhavam recinto, era identificado o local em que cada um defecava e coletada as fezes deste local.

A extração dos metabólitos de glicocorticoides foi realizada no Laboratório de Microbiologia e Genética da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte. Foram adicionados 5ml de álcool metílico 80% a uma alíquota de 0,5g de fezes. O material foi colocado em vórtex por 1 minuto e 30 segundos e centrifugado por 15 minutos a 3000 rotações por minuto (RPM).

A quantificação hormonal foi realizada com o uso de *kits* comerciais de duplo anticorpo (ENZO®), através do método ELISA. A diluição das amostras ocorreu em 100µL de solução padrão, em proporção de oito partes da solução padrão para uma parte da amostra, e os procedimentos de dosagem seguiram o protocolo do kit. As amostras foram lidas em um comprimento de onda de 508 nanômetros. A quantificação foi realizada no Multilab do Hospital Universitário da Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte.

Para adequar a dosagem para o peso e a diluição das amostras, foi empregada a seguinte fórmula (Vasconcellos, 2009):

$$\frac{\text{concentração do hormônio na amostra} \times \text{volume da extração} \times \text{fator de diluição}}{\text{peso das amostras fecais (g)} \times \text{volume da amostra} \times 1000}$$

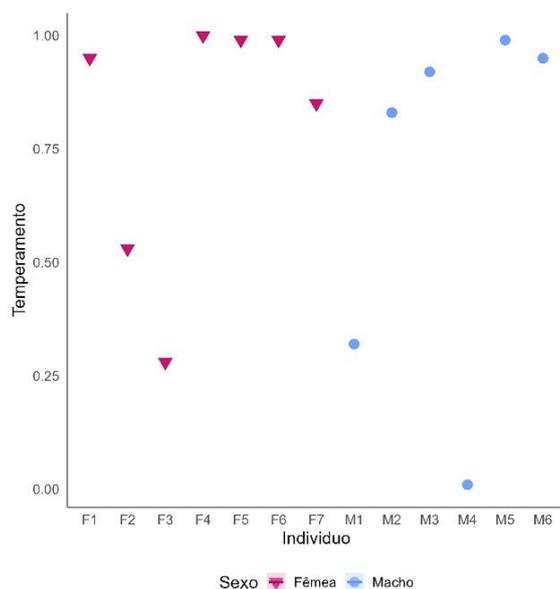
#### 2.4.4. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. O efeito do enriquecimento ambiental (Etapas Linha de Base I, Enriquecimento e Linha de Base II), do sexo (macho ou fêmea), do temperamento dos animais (índice de Cautela), sua idade (em anos), sua origem (nascido em vida livre ou em zoológico), sua criação (criado pelos pais ou por humanos) e das concentrações dos glicocorticoides, assim como das interações entre essas variáveis sobre o comportamento e fisiologia (concentrações hormonais), foi avaliado através de Modelos Lineares Generalizados (GLMM), utilizando os indivíduos como fator de aleatorização (ajustando o modelo para medidas repetidas). Os dados não apresentaram distribuição normal, então a família *Poisson* foi aplicada ao GLMM. Empregamos o modelo de análise iterativa ao GLMM, iniciando com o modelo completo e removendo gradativamente, em ordem decrescente de valor de “p”, as variáveis explicativas que não causaram efeito nas variáveis resposta. Nos casos em que foram detectadas interações entre as variáveis explicativas, foi realizado a correlação de Pearson separadamente para cada variável. Para comparar as concentrações basais de metabólitos de glicocorticoides dos machos e fêmeas, foi utilizado o Teste de Mann-Whitney. Todas análises estatísticas foram realizadas no *software R* (versão 3.4.2).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Teste de Objeto Novo

Os Índices de Cautela (IC) dos lobos variaram entre 0.001 e 1.00 (Figura 3); quanto maior o IC, mais cauteloso/menos explorador foi considerado o indivíduo.



**Figura 3** Distribuição dos Índices de Cautela calculados através da apresentação de objetos novos aos lobos-guarás estudados em instituições zoológicas brasileiras entre dezembro/2022 e março/2023. Marcadores rosas: Fêmeas, Marcadores azuis: Machos.

Não foi encontrado efeito do Sexo, Idade, Origem ou Criação do animal em seu temperamento (Tabela 4).

**Tabela 4** Resultado do Modelo Linear Generalizado (GLMM) investigando efeitos do Sexo (macho ou fêmea), Idade (em anos), Origem (se nascido na natureza ou nascido na instituição) e Criação (se criado pelos pais ou por humanos) sobre o Índice de Cautela dos lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*), calculado através da apresentação de objetos novos aos animais.

Variável Explicativa	Estimate	Erro padrão	Valor de z	Valor de p ( $\alpha \leq 0,05$ )
Intercept	-0.16592	1.68856	-0.098	0.922
Sexo <sup>1</sup>	0.08505	0.39905	0.213	0.831
Idade	0.02044	0.06358	0.321	0.748
Origem <sup>2</sup>	0.12128	0.52841	0.230	0.818

Criação <sup>3</sup>	-0.41869	0.65468	-0.640	0.522
----------------------	----------	---------	--------	-------

---

<sup>1</sup> Sexo (Macho ou Fêmea); a variável de referência foi “macho”. <sup>2</sup> Origem (se nascido na instituição ou nascido na natureza); a variável de referência foi “nascido na natureza”.

### 3.2.Respostas Comportamentais

A Tabela 5 apresenta os resultados estatísticos relacionados aos comportamentos registrados dos lobos-guarás, considerando variáveis como Temperamento (IC), Etapa (Linha de Base I, Enriquecimento, Linha de Base II), Sexo (Macho, Fêmea), Idade (em anos), Origem (nascido na instituição ou em vida livre) e Criação (criado por humanos ou pelos pais).

**Tabela 5** Resultados do Modelo Linear Generalizado (GLMM) investigando a influência do Temperamento (IC), da Etapa (Linha de Base I, Enriquecimento, Linha de Base II), do Sexo (macho ou fêmea), da Idade (em anos), da Origem (se nascido na instituição ou capturado da natureza) e da Criação (se criado pelos pais ou por humanos) sobre o comportamento dos lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) estudados.

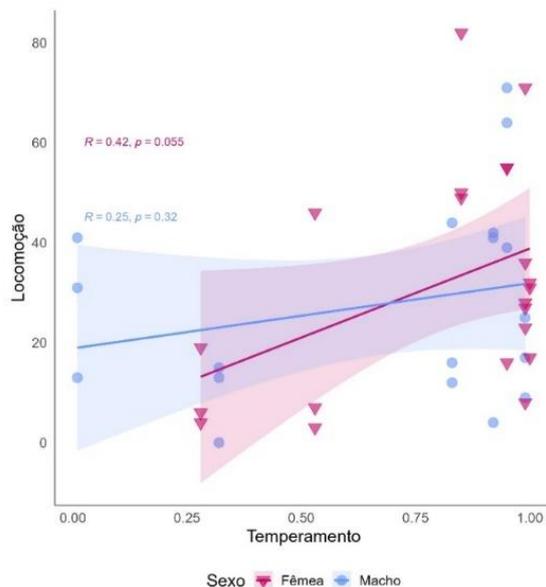
Variável Resposta	Variável Explicativa	Estimate	Desvio padrão	Valor de z	Valor de p* ( $\alpha \leq 0,05$ )
Locomoção	<i>Intercept</i>	5.69623	0.83598	6.814	<0.001
	Sexo <sup>1</sup>	-2.23356	0.43257	-5.163	<0.001
	Temperamento	0.10128	0.70761	0.143	0.88619
	Etapa <sup>2</sup>	0.35141	0.14912	2.357	0.01845
	Idade	-0.14325	0.02367	-6.053	<0.001
	Temperamento*Sexo	2.3709	0.48259	4.913	<0.001
	Temperamento*Etapa	-0.85122	0.13870	-6.137	<0.001
	Sexo*Etapa	0.20792	0.07589	2.740	0.00615
Forrageio	<i>Intercept</i>	5.68094	0.80819	7.029	<0.001
	Sexo	-0.61866	0.39993	-1.547	0.12189
	Temperamento	-0.62945	0.67406	-0.934	0.35039
	Idade	-0.16849	0.2518	-6.693	<0.001
	Origem <sup>3</sup>	-0.62883	0.21988	-2.860	0.00424
	Temperamento*Sexo	1.17206	0.47368	2.474	0.01335
Comportamento Afiliativo	<i>Intercept</i>	3.24745	2.23074	1.456	0.1455
	Sexo	0.93367	1.08485	0.861	0.3894
	Etapa	1.38711	0.62459	2.222	0.263
	Idade	-0.34097	0.08302	-4.107	<0.001
	Sexo*Etapa	-0.91400	0.39290	-2.326	0.0200

Descanso	<i>Intercept</i>	4.01141	2.52140	1.591	0.111622
	Sexo	0.33677	1.21424	0.277	0.781510
	Temperamento	1.18300	2.06421	0.573	0.566575
	Etapa	0.34449	0.06434	5.354	<0.001
	Temperamento*Etapa	-0.46298	0.07316	-6.328	<0.001
	Sexo*Etapa	-0.18648	0.04857	-3.839	<0.001
Não Visível	<i>Intercept</i>	6.36431	1.04062	6.116	<0.001
	Sexo	0.33717	0.50032	0.674	0.500
	Temperamento	-0.37211	0.85011	-0.438	0.662
	Etapa	0.01163	0.03562	0.327	0.744
	Temperamento*Etapa	0.36272	0.03034	11.957	<0.001
	Sexo*Etapa	-0.2142	0.01886	-11.385	<0.001
<i>Pacing</i>	<i>Intercept</i>	-20.33065	14.88317	-1.366	0.172
	Sexo	2.9589	23.8271	0.124	0.901
	Temperamento	-13.0416	51.1050	-0.255	0.799
	Etapa	0.69976	0.06492	10.779	<0.001
	Temperamento*Etapa	24.1566	4.3645	5.535	<0.001
	Sexo*Etapa	1.8699	0.4414	4.236	<0.001
Parado	<i>Intercept</i>	0.98778	1.89028	0.523	0.6013
	Sexo	-0.26364	0.89665	-0.294	0.7687
	Etapa	-0.29137	0.31503	-0.925	0.3550
	Sexo*Etapa	0.30154	0.12922	2.334	0.0196

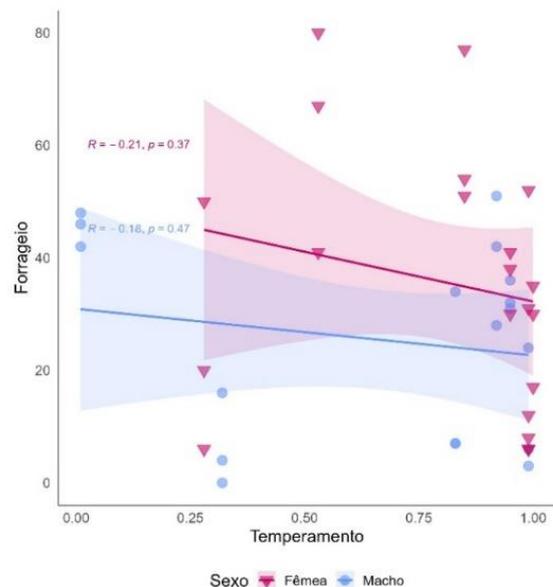
\*Efeitos não significativos não foram mostrados porque foram removidos do modelo pelo processo de seleção iterativa. <sup>1</sup> Sexo (Macho ou Fêmea); a variável de referência foi “macho”. <sup>2</sup> Etapa (Linha de Base I, Enriquecimento, Linha de Base II); a variável de referência foi “Linha de Base I”. <sup>3</sup> Origem (se nascido na instituição ou nascido na natureza); a variável de referência foi “nascido na natureza”.

Identificamos uma interação significativa entre os temperamentos e os sexos dos lobos-guarás, impactando a frequência de locomoção e forrageio. A análise revelou que fêmeas mais cautelosas demonstraram uma tendência a se locomover mais do que as fêmeas mais exploradoras, como evidenciado na Figura 4. Os dados da Figura 5 indicaram que as fêmeas geralmente apresentaram um maior comportamento de forrageio em comparação aos

machos. Ao realizar uma análise combinada dos sexos, conforme apresentado na Tabela 5, observamos uma possível interação entre os efeitos do sexo e temperamento. É interessante notar que essa interação não se manteve quando examinamos os efeitos separadamente, como demonstrado na Figura 5.



**Figura 4** Dispersão dos registros de Locomoção de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) em função de seu Temperamento (Índice de Cautela), com curvas separadas para fêmeas (marcadores rosas) e machos (marcadores azuis), em experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. Os valores em azul e rosa representam os resultados das correlações de Pearson entre temperamento e o comportamento de machos e fêmeas respectivamente.

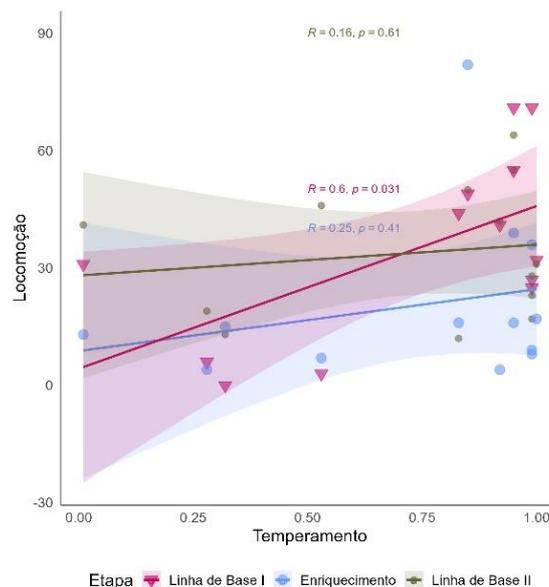


**Figura 5** Dispersão dos registros de Forrageio de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) em função de seu Temperamento (Índice de Cautela), com curvas separadas para fêmeas (marcadores rosas) e machos (marcadores azuis), em experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. Os valores em azul e rosa representam os resultados das correlações de Pearson entre temperamento e o comportamento de machos e fêmeas respectivamente.

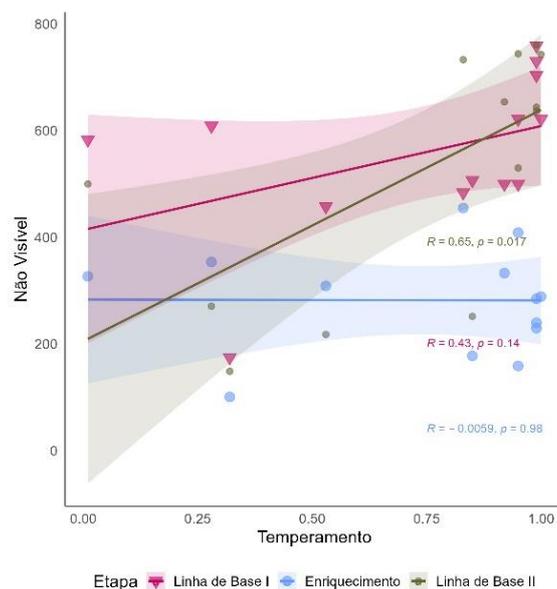
O Temperamento dos animais desempenhou um papel significativo nas suas respostas comportamentais ao longo das diferentes etapas do Enriquecimento. Durante o experimento, observamos que as seguintes categorias comportamentais foram influenciadas pelo temperamento dos animais: Locomoção (conforme demonstrado na Figura 6), Descanso e no estado Não Visível (Figura 7), além do comportamento de *Pacing*. Durante a fase da Linha de Base II, os animais com IC mais elevados, ou seja, aqueles mais cautelosos, mostraram uma maior tendência a se esconder, como ilustrado na Figura 7. Já na Linha de Base I,

notamos que os animais mais cautelosos tendiam a se locomover mais, enquanto os animais mais exploratórios exibiam taxas de locomoção mais baixas, conforme representado na Figura 6. Em relação ao comportamento de Descanso, os resultados (conforme apresentados na Tabela 5) indicaram maiores taxas durante a Linha de Base I, e os animais mais cautelosos tendiam a apresentar maiores taxas de comportamento Não Visível durante a Linha de Base II.

Embora a análise combinada das variáveis (como apresentado na Tabela 5) tenha sugerido uma interação entre os efeitos da Etapa e do Temperamento em relação aos comportamentos de Locomoção, Descanso, Não Visível e *Pacing*, ao examinar esses efeitos de forma isolada (conforme ilustrado nas Figuras 6 e 7), observamos que essa interação foi confirmada apenas no comportamento de Locomoção (Figura 6) e no estado Não Visível (Figura 7), mas não nos comportamentos de Descanso e *Pacing* (conforme apresentado na Tabela 5).



**Figura 6** Dispersão dos registros de Locomoção de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) em função do Temperamento (Índice de Cautela), com curvas separadas para Linha de Base I (marcadores rosa), Enriquecimento (marcadores azuis) e Linha de Base II (marcadores verdes) em Experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. Os valores em rosa, azul e verde representam os resultados das correlações de Pearson entre temperamento e as etapas Linha de Base I, Enriquecimento e Linha de Base II respectivamente.

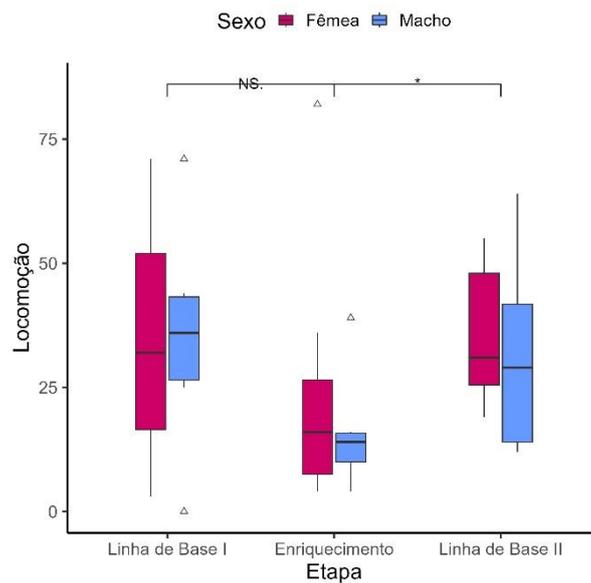


**Figura 7** Dispersão dos registros de Não Visível de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) em função do Temperamento (Índice de Cautela), com curvas separadas para Linha de Base I (marcadores rosa), Enriquecimento (marcadores azuis) e Linha de Base II (marcadores verdes) em Experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. Os valores em rosa, azul e verde representam os resultados das correlações de Pearson entre temperamento e as etapas Linha de Base I, Enriquecimento e Linha de Base II respectivamente.

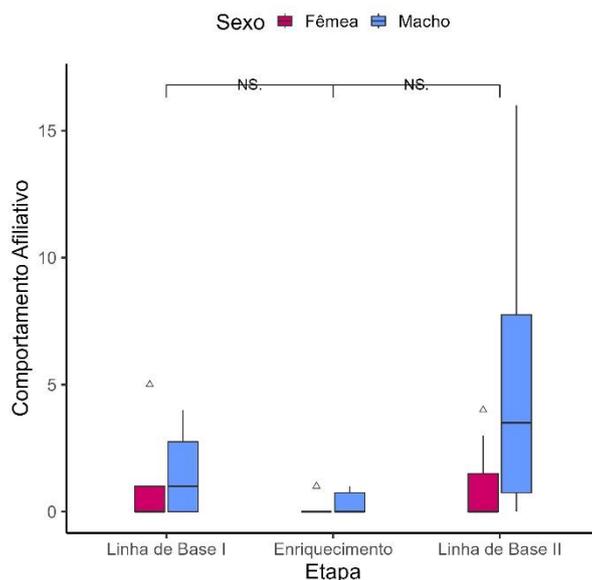
As respostas comportamentais dos animais ao estímulo proporcionado pelo Enriquecimento Ambiental demonstraram ser influenciadas pelo sexo, o que resultou em variações nos comportamentos de Locomoção (conforme evidenciado na Figura 8), Afiliativo (como representado na Figura 9), Descanso (conforme ilustrado na Figura 10), no estado Não Visível (como apresentado na Figura 11), *Pacing* (conforme observado na Figura 12) e Parado (como indicado na Figura 13). Estas variações foram menos frequentes durante a fase de Enriquecimento.

No que concerne aos comportamentos Afiliativo (Figura 9) e de Descanso (Figura 10), observou-se que os machos apresentaram taxas mais elevadas em todas as três fases. Quanto ao estado Não Visível (Figura 11), notou-se taxas superiores nos machos durante a Linha de Base II, nas fêmeas durante a Linha de Base I, e sem diferença entre os sexos durante o Enriquecimento. Em média, os machos apresentaram menores taxas do que as fêmeas. No que diz respeito ao comportamento de *Pacing* (Figura 12), as fêmeas exibiram taxas mais elevadas durante o Enriquecimento e a Linha de Base II, enquanto não houve

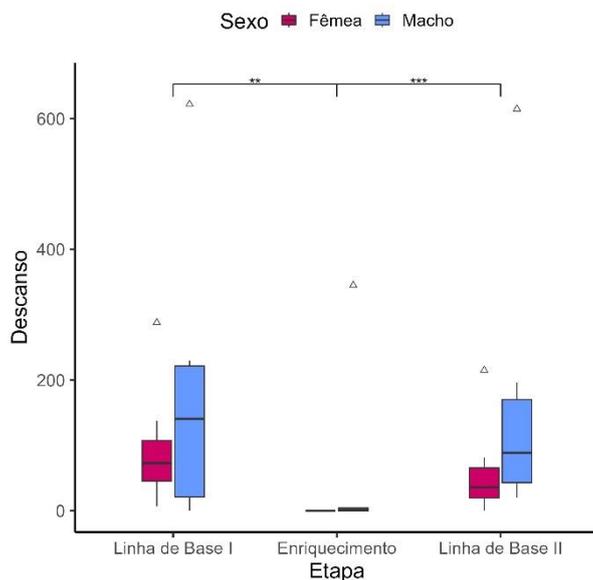
diferença entre os sexos na Linha de Base I. Quanto ao comportamento Parado (Figura 13), foram observadas taxas superiores nas fêmeas durante o Enriquecimento, taxas mais elevadas nos machos durante a Linha de Base II, e nenhuma diferença entre os sexos na Linha de Base I. Em relação ao estado Não Visível, constatou-se taxas mais elevadas nos machos durante a fase de Linha de Base II e taxas mais elevadas nas fêmeas durante a Linha de Base I, com ausência de diferenças entre os sexos durante o Enriquecimento.



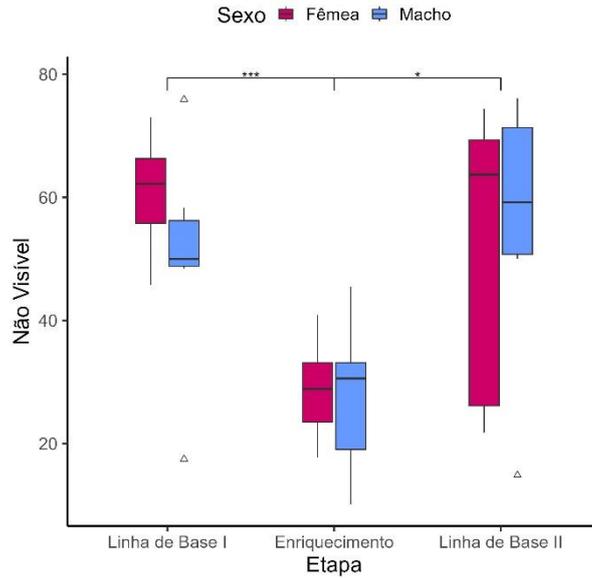
**Figura 8** Frequência de registros do comportamento Locomoção de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) em função da Etapa e do sexo dos animais, em Experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. As barras em azul e rosa representam os resultados de machos e fêmeas, respectivamente. As caixas representam o primeiro e o terceiro quartil, as linhas horizontais grossas representam a mediana; os triângulos representam os dados extremos. O asterisco indica um “p” menor que ou igual a 0,05. “NS” indica a falta de diferença estatística entre as etapas.



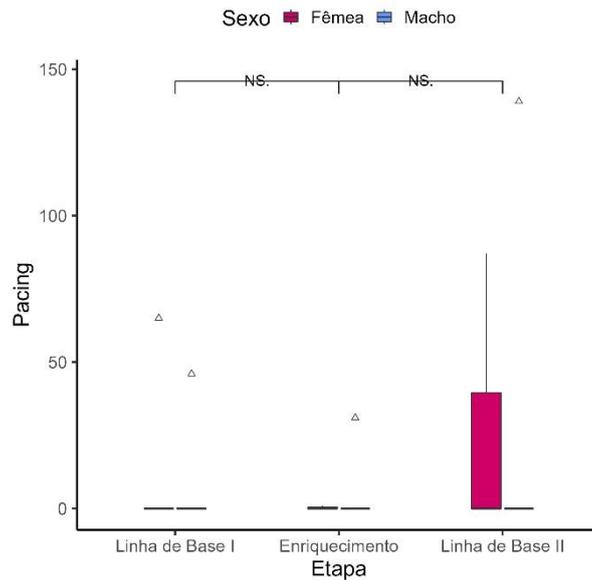
**Figura 9** Frequência de registros do comportamento Afiliativo de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) em função da Etapa e do sexo dos animais, em Experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. As barras em azul e rosa representam os resultados de machos e fêmeas respectivamente. As caixas representam o primeiro e o terceiro quartil, as linhas horizontais grossas representam a mediana; os triângulos representam os dados extremos. “NS” indica a falta de diferença estatística entre as etapas.



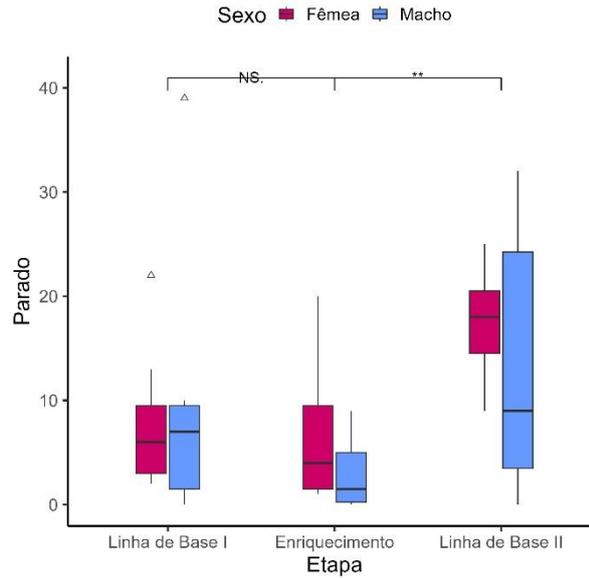
**Figura 10** Frequência de registros do comportamento Descanso de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) em função da Etapa e do sexo dos animais, em Experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. As barras em azul e rosa representam os resultados de machos e fêmeas respectivamente. As caixas representam o primeiro e o terceiro quartil, as linhas horizontais grossas representam a mediana; os triângulos representam os dados extremos. “\*\*” indicam um “p” menor que ou igual a 0,01, “\*\*\*” indicam “p” menor que 0,001 .



**Figura 11** Frequência de registros do estado Não Visível de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) em função da Etapa e do sexo dos animais, em Experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. As barras em azul e rosa representam os resultados de machos e fêmeas respectivamente. As caixas representam o primeiro e o terceiro quartil, as linhas horizontais grossas representam a mediana; os triângulos representam os dados extremos. O asterisco indica um “p” menor que ou igual a 0,05, “\*\*\*” indicam “p” menor que 0,001 .



**Figura 12** Frequência de registros do comportamento *Pacing* de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) em função da Etapa e do sexo dos animais, em Experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. As barras em azul e rosa representam os resultados de machos e fêmeas respectivamente. As caixas representam o primeiro e o terceiro quartil, as linhas horizontais grossas representam a mediana; os triângulos representam os dados extremos. “NS” indica a falta de diferença estatística entre as etapas.



**Figura 13** Frequência de registros do comportamento Parado de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) em função da Etapa e do sexo dos animais, em Experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. As barras em azul e rosa representam os resultados de machos e fêmeas respectivamente. As caixas representam o primeiro e o terceiro quartil, as linhas horizontais grossas representam a mediana; os triângulos representam os dados extremos. “\*\*” indicam um “p” menor que ou igual a 0,01, “NS” indica a falta de diferença estatística entre as etapas.

A idade teve impacto nos comportamentos de Locomoção, Forrageio e Afiliativo, com indivíduos mais jovens exibindo esses comportamentos com maior frequência, conforme indicado na Tabela 5.

No que diz respeito à origem dos animais (se eles nasceram na instituição ou foram capturados na natureza), observou-se que essa variável influenciou apenas o comportamento de Forrageio, sendo que os animais nascidos na natureza apresentaram frequências mais elevadas desse comportamento, como registrado na Tabela 5.

Por outro lado, a forma de criação dos animais (se foram criados por humanos ou pelos pais) não demonstrou influência em nenhum dos comportamentos observados.

### 3.3.Efeitos Hormonais

Os resultados estatísticos que destacam o impacto do Temperamento (IC), da Etapa (Linha de Base I, Enriquecimento, Linha de Base II), do Sexo (Macho, Fêmea), da Idade (em anos), da Origem (se nascidos na instituição ou em vida livre) e da Criação (se criados por humanos ou pelos pais) nas concentrações de metabólitos fecais de glicocorticoides dos lobos-guarás estão resumidos na Tabela 6.

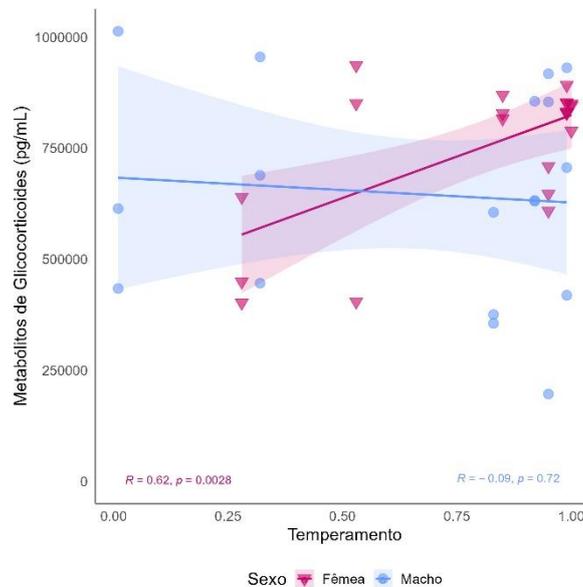
**Tabela 6** Resultados do Modelo Linear Generalizado (GLMM) avaliando a influência do Temperamento (IC), Etapa (Linha de Base I, Enriquecimento, Linha de Base II), Sexo (macho ou fêmea), Idade (em anos), Origem (se nascido na instituição ou em vida livre) e Criação (se criado pelos pais ou por humanos) nas concentrações de metabólitos fecais de glicocorticoides dos lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) estudados.

Variável Resposta	Variável Explicativa	Estimate	Desvio padrão	Valor de z	Valor de p* ( $\alpha \leq 0,05$ )
Metabólitos de Glicocorticoides	<i>Intercept</i>	13.4871203	0.4317028	31.242	<0.001
	Sexo <sup>1</sup>	-0.3369258	0.2066744	-1.630	0.1030
	Temperamento	-0.7737908	0.3509341	-2.205	0.0275
	Etapa <sup>2</sup>	0.1531382	0.0008661	176.810	<0.001
	Temperamento*Sexo	0.7645282	0.2585120	2.957	<0.001
	Temperamento*Etapa	-0.0437173	0.0007660	-57.076	<0.001
	Sexo*Etapa	-0.10769	0.02512	-4.287	<0.001

\*Efeitos não significativos não foram mostrados porque foram removidos do modelo pelo processo de seleção iterativa. <sup>1</sup> Sexo (Macho ou Fêmea). Variável de referência foi “macho”. <sup>2</sup> Etapa (Linha de Base I, Enriquecimento, Linha de Base II). Variável de referência foi “Linha de Base I”.

O Temperamento dos animais teve um impacto nas concentrações de metabólitos fecais de glicocorticoides (MGC), especialmente quando consideramos a interação com o sexo (conforme ilustrado na Figura 14) e a etapa do estudo. Foi observado que as concentrações de MGC nas fêmeas foram mais elevadas em indivíduos com temperamento mais cauteloso ( $IC > 0,5$ ), enquanto foram mais baixas em indivíduos mais exploradores. Por

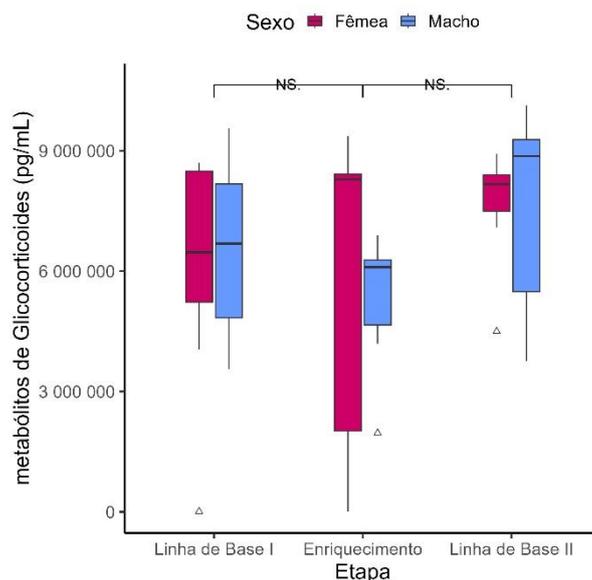
outro lado, no caso dos machos, não se constatou uma correlação significativa entre o temperamento e o sexo.



**Figura 14** Dispersão das concentrações de metabólitos de glicocorticoides de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) em função do Temperamento (Índice de Cautela), com curvas separadas por sexo: macho (marcadores azuis) e fêmeas (marcadores rosas) em experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. Os valores em azul e rosa representam os resultados das correlações de Pearson entre temperamento e os sexos (macho e fêmea respectivamente).

Embora os resultados apresentados na Tabela 5 sugiram uma influência da interação entre Temperamento e Etapa nas concentrações de metabólitos de glicocorticoides (MGC), ao analisar as etapas individualmente, essa influência nas concentrações de MGC não foi corroborada.

A Etapa que envolveu a oferta de Enriquecimento Ambiental teve um impacto notável sobre as concentrações de metabólitos de glicocorticoides (MGC) nos lobos-guarás machos. Durante a transição da Linha de Base I para o Enriquecimento, houve uma redução nas concentrações, seguida por um aumento na transição para a Linha de Base II. Por outro lado, as concentrações médias das fêmeas permaneceram relativamente estáveis ao longo das três etapas (conforme ilustrado na Figura 15). Vale ressaltar que a Linha de Base II foi a etapa que apresentou os níveis mais elevados de MGC para os machos.



**Figura 15** Níveis de metabólitos de glicocorticoides fecais de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) em função da Etapa e do sexo dos animais, em Experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. As barras em azul e rosa representam os resultados de machos e fêmeas respectivamente. As caixas representam o primeiro e o terceiro quartil, as linhas horizontais grossas representam a mediana; os triângulos representam os dados extremos. “NS” indica a falta de diferença estatística entre as etapas.

Não registramos diferença entre as concentrações basais de MGC (pg/mL) dos lobos-guarás machos e fêmeas ( $p=0.7308$ ).

Os resultados estatísticos que destacam o impacto das concentrações de metabólitos fecais de glicocorticoides e sua interação com o sexo sobre os comportamentos dos lobos-guarás estão resumidos na Tabela 7.

**Tabela 7** Resultados dos Modelos Lineares Generalizados (GLMM) avaliando a influência das concentrações de Metabólitos de Glicocorticoides, do Sexo (macho ou fêmea) e da interação entre essas variáveis sobre os comportamentos dos lobos-guarás estudados.

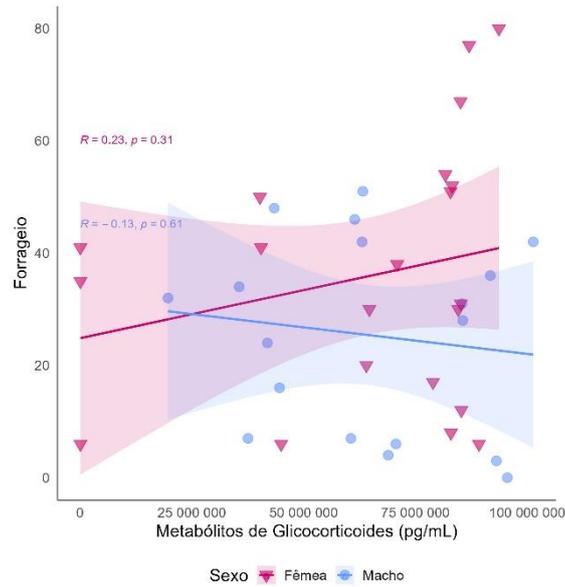
Variável Resposta	Variável Explicativa	Estimate	Erro padrão	Valor de z	Valor de p* ( $\alpha \leq 0,05$ )
Forrageio	Intercept	4.1002023	0.6418867	6.388	<0.001
	Metabólitos de Glicocorticoides	-0.0022215	0.0005198	-4.274	<0.001
	Sexo <sup>1</sup>	-0.6446427	0.4278630	-1.507	0.132
	Sexo*Metabólitos de Glicocorticoides	0.0015467	0.0003759	4.114	<0.001

Comportamento Afiliativo	<i>Intercept</i>	-5.864553	2.423854	-2.420	<0.001
	Metabólitos de Glicocorticoides	0.009866	0.002684	3.676	<0.001
	Sexo	2.221867	1.693885	1.312	0.189622
	Sexo*Metabólitos de Glicocorticoides	-0.004559	0.001995	-2.285	<0.001
Não Visível	<i>Intercept</i>	4.6701926	0.3740849	12.484	<0.001
	Metabólitos de Glicocorticoides	0.0018342	0.0001616	11.352	<0.001
	Sexo	0.7266957	0.2395528	3.034	0.00242
	Sexo*Metabólitos de Glicocorticoides	-0.0009232	0.0001290	-7.154	<0.001

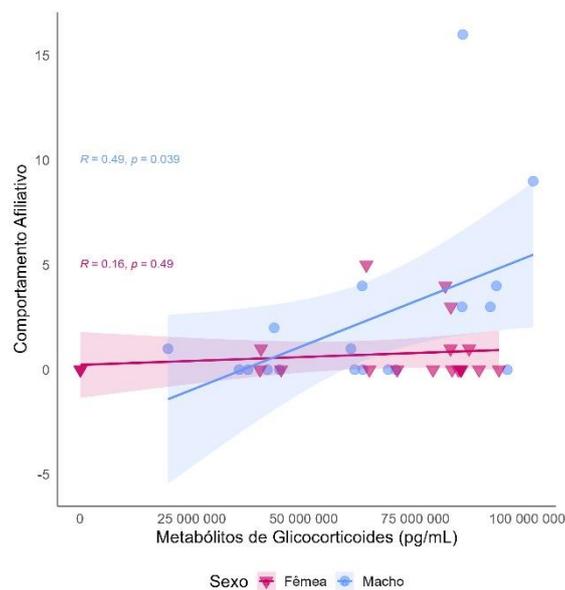
---

<sup>1</sup> Sexo (Macho ou Fêmea). Variável de referência foi “macho”.

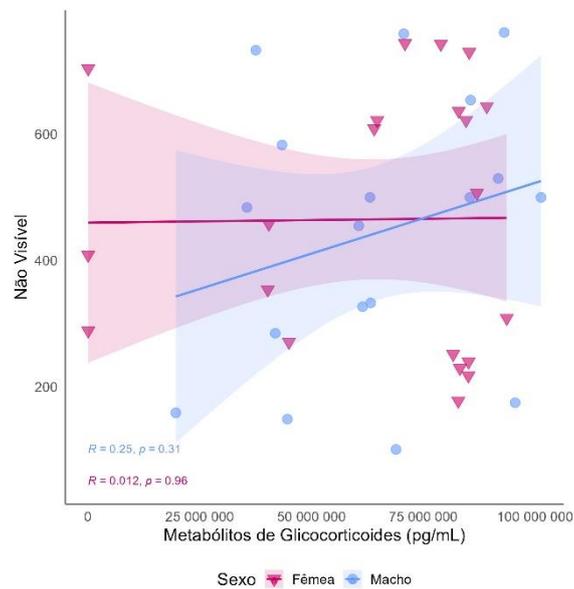
Identificamos uma interação entre as concentrações de metabólitos de glicocorticoides e os sexos dos lobos-guarás, impactando as frequências de Forrageio (Figura 16), Comportamento Afiliativo (Figura 17) e o estado "Não Visível" (Figura 18). Na análise do comportamento de Forrageio, a avaliação dos sexos isoladamente via *Pearson* não confirmou correlação entre os dados da interação entre MGC e o sexo com a taxa desse comportamento para nenhum dos sexos. Quanto ao Comportamento Afiliativo, as análises confirmaram influência do sexo e dos MGC apenas para os machos, que apresentaram maiores taxas deste comportamento do que as fêmeas. Sobre o estado "Não Visível", não foi confirmado efeito de interação entre o MGC e o sexo.



**Figura 16** Dispersão dos registros de Forrageio de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) em função das concentrações de metabólitos de glicocorticoides com curvas separadas para fêmeas (marcadores rosas) e machos (marcadores azuis), em experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. Os valores em azul e rosa representam os resultados das correlações de Pearson entre temperamento e o comportamento de machos e fêmeas respectivamente.



**Figura 17** Dispersão dos registros de Comportamento Afiliativo de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) em função das concentrações de metabólitos de glicocorticoides com curvas separadas para fêmeas (marcadores rosas) e machos (marcadores azuis), em experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. Os valores em azul e rosa representam os resultados das correlações de Pearson entre temperamento e o comportamento de machos e fêmeas respectivamente.



**Figura 18** Dispersão dos registros de Não Visível de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) em função das concentrações de metabólitos de glicocorticoides com curvas separadas para fêmeas (marcadores rosas) e machos (marcadores azuis), em experimento de reação ao enriquecimento ambiental. Os dados foram coletados em instituições zoológicas brasileiras, entre os meses de dezembro/2022 e março/2023. Os valores em azul e rosa representam os resultados das correlações de Pearson entre temperamento e o comportamento de machos e fêmeas respectivamente.

#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos os efeitos do temperamento e do sexo sobre as respostas comportamentais e fisiológicas de lobos-guarás ao enriquecimento ambiental (EA). Encontramos que o temperamento, o sexo e a interação entre essas variáveis influenciaram várias respostas dos animais, comportamentais e fisiológicas. A interação entre essas variáveis influenciou o comportamento de Locomoção. Animais mais cautelosos – em especial, fêmeas - tendiam a ter maiores taxas de Locomoção do que os mais exploradores. Os machos apresentaram maiores taxas de Comportamento Afiliativo e de Descanso que as fêmeas. Indivíduos mais jovens demonstraram maior frequência de Locomoção, Forrageio e Comportamento Afiliativo, enquanto a origem (se nascido em zoológico ou em vida livre) influenciou no Forrageio, com os animais nascidos em vida livre mostrando taxas mais elevadas. Fêmeas cautelosas exibiram concentrações mais elevadas de MGC em comparação com as exploradoras, mas não houve efeito do temperamento nos machos. No entanto, somente os machos apresentaram queda nas concentrações de MGC durante o Enriquecimento. Não houve diferenças nas concentrações basais de MGC entre os sexos. A disponibilidade do EA teve impacto nos comportamentos de Locomoção, resultando na diminuição das taxas em ambos os sexos durante o EA. No que diz respeito aos comportamentos Afiliativos e de Descanso, observaram-se taxas mais elevadas nos machos.

Os resultados de nossa pesquisa evidenciaram uma tendência que fêmeas com temperamento mais cauteloso têm de apresentar maior atividade locomotora em comparação com fêmeas mais exploradoras. Esse efeito do temperamento sobre o comportamento de um dos sexos ainda não havia sido relatado em lobos-guarás, mas diferenças entre sexos são conhecidas em várias espécies do clado dos sauropsídeos (para uma revisão, veja Harrison et al., 2022). Starling e colaboradores (2013) indicaram que cães machos (*Canis lupus familiaris*), em geral, tendem a ser mais ousados do que as fêmeas. Essa diferença na ousadia

entre machos e fêmeas foi atribuída pelos autores aos níveis de hormônios sexuais nas fêmeas, conforme demonstrado por Kim e colaboradores (2006). Os níveis de hormônios sexuais femininos influenciam o temperamento das fêmeas, como observado em cadelas, onde as fêmeas esterilizadas tendem a ser mais ativas em comparação com as não castradas. Por outro lado, Lees e colaboradores (2012), ao estudarem *Lagopus muta hyperborea*, identificaram que os machos exibem maiores taxas de locomoção devido à necessidade de proteger o território. Por outro lado, Tebelmann e Ganslober (2023) ao avaliarem as diferenças entre os sexos de lobos-cinzentos, não registraram diferenças comportamentais entre machos e fêmeas de qualquer temperamento. A falta de variação no temperamento entre os machos pode estar associada às conclusões de Harrison e colaboradores (2022). Eles conduziram uma meta-análise comparativa das diferenças de temperamento entre os sexos em várias espécies de sauropsídeos e mamíferos; no caso dos mamíferos, os autores não encontraram diferenças comportamentais em função do temperamento entre os machos. No caso dos lobos-guarás, uma espécie predominantemente solitária, na qual ambos os sexos desempenham papel na defesa territorial, é plausível que, uma vez que não houve diferenças entre os machos, somente fêmeas com temperamento mais cauteloso busquem estratégias como se afastar de zonas com vestígios de outros indivíduos, para evitar conflitos ao proteger seu território.

Durante a implementação da Linha de Base II, tivemos maior frequência do registro “Não Visível” em animais de temperamento mais cauteloso. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas outras duas fases. A maior ocorrência do estado “Não Visível” entre os animais mais cautelosos pode ser atribuída ao fato de que esses animais tendem a ser mais relutantes em se expor (para uma revisão, veja Griffin et al., 2000).

Ao analisar as respostas comportamentais dos animais frente ao Enriquecimento, foi possível notar uma redução das taxas de Locomoção durante a oferta do EA para ambos os sexos. Em contraste com nossos resultados, no estudo conduzido por Radical e colaboradores

(2023), foi observada uma diminuição na taxa de locomoção apenas nos servais fêmeas. Essa discrepância na resposta comportamental ao enriquecimento pode ser atribuída à forma como o EA foi implementado em nosso estudo. De acordo com Jacobs e colaboradores (2022), quando o EA é disponibilizado em vários locais simultaneamente, ele pode incentivar o animal a aumentar sua locomoção em busca de recursos adicionais. No entanto, em nossa pesquisa, o EA foi oferecido em apenas um local por vez, o que pode explicar a redução na locomoção dos animais, já que não havia a necessidade de buscar recursos em diferentes locais.

Observamos uma diminuição nas taxas de comportamento afiliativo durante a fase de Enriquecimento, seguida por um aumento na Linha de Base II. Em todas as três fases, os machos registraram níveis mais elevados do que as fêmeas. Guérineau e colaboradores (2022) e Winship e Eskelinen (2018), ao investigarem os golfinhos *Tursiops truncatus*, observaram uma aumento nas taxas de comportamentos afiliativos em determinados contextos de EA. Ambos os estudos chegaram à conclusão de que, em espécies sociais como o *T. truncatus*, a exposição a situações "novas" pode levar a uma busca por suporte social. No entanto, uma vez que o lobo-guará é uma espécie solitária, não é esperado que busquem suporte social. A redução no comportamento afiliativo parece estar relacionada ao maior tempo que os animais dedicaram para obter o alimento disponibilizado no Enriquecimento Ambiental. Quanto ao fato de os machos apresentarem taxas mais altas do que as fêmeas, essa diferença pode ser explicada pelo estudo de Starling e colaboradores (2013), que sugere que cães machos tendem a ser mais sociáveis, com outros indivíduos de mesma espécie do que as fêmeas, devido à sua maior ousadia.

Nossos resultados indicaram que a oferta de EA aumentou a taxa de atividade dos indivíduos, reduzindo os comportamentos de descanso. A redução das taxas de descanso está em consonância com Coelho e colaboradores (2012), que avaliaram a influência do EA em

lobos-guarás, e com Ibrahim e colaboradores (2020) em cães. Apesar do número de animais observados em nosso estudo e no de Coelho e colaboradores ser diferente (13 em comparação com três em Coelho et al., 2012), a semelhança entre os resultados sugere um padrão comportamental na espécie, que pode ser aplicado para promover o bem-estar de *Chrysocyon brachyurus* em instituições zoológicas, uma vez que, segundo Shepherdson e colaboradores (1993) e Mellen e colaboradores (1998), animais pertencentes a ordem Carnivora tendem a apresentar maior inatividade quando cativos, sendo assim, o EA ao estimular a atividade, provavelmente favorece melhores níveis de bem-estar.

Em nosso estudo, observamos uma manutenção dos comportamentos de "Pacing" e "Parado" durante a oferta de EA, e as taxas de *Pacing* aumentaram no período pós-estímulo. Figueira e colaboradores (2021) observaram 22 cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) e constataram uma diminuição dos comportamentos classificados por eles como "negativos", o que inclui o *Pacing*, e um aumento dos comportamentos "positivos" durante a exposição ao EA, seguido por um aumento dos comportamentos "negativos" no período pós-EA. Em um estudo com *Tursiops truncatus*, Lauderdale e Miller (2023) também encontraram redução em comportamentos estereotipados, mas não relataram aumento destes comportamentos no período pós-EA. Figueira e colaboradores (2021) sugerem que esse aumento pós-EA pode ser atribuído à frustração individual por não ter mais o EA disponível. Em nosso estudo, a taxa de "Pacing" aumentou especificamente no período pós-EA (Linha de Base II), o que corrobora os resultados desses autores e sugere que pode ter havido também nos lobos-guarás estudados frustração em relação à falta de EA na última etapa do estudo.

As concentrações de MGC mais altas registradas por nós em fêmeas cautelosas, em comparação com as exploradoras, podem ser interpretadas como uma menor capacidade destes indivíduos para resolver problemas rotineiros, o que está de acordo com o estudo de Webb e colaboradores (2015) com bezerros. Vasconcellos e colaboradores (2009) realizaram

um estudo semelhante ao nosso, com a mesma espécie, avaliando as mesmas métricas em 11 indivíduos. Eles relataram que não encontraram uma relação significativa entre a oferta de EA e as concentrações de MGC. A razão de não haver diferenças entre os sexos nos achados de Vasconcellos e colaboradores (2009) provavelmente está no fato deles terem realizado as análises dos sexos em conjunto. Uma vez que realizamos as análises isoladamente para machos e fêmeas, encontramos redução nos machos. Ao analisar cada sexo isoladamente, foi notada uma queda nas concentrações, durante a oferta do EA, apenas nos machos. A relação entre o sexo e as concentrações de MGC poderia estar relacionada a possíveis diferenças basais nos níveis de MGC entre os sexos, como descrito por Wielebnowski e colaboradores (2002) em seu estudo com *Neofelis nebulosa*. Essas diferenças poderiam estar relacionadas às atividades desempenhadas por cada sexo, como, por exemplo, o cuidado com a prole. De acordo com Dietz (1984), em lobos-guarás, ambos os progenitores cuidam dos filhotes, mas o macho só se aproxima dos filhotes com a autorização da fêmea. Isso sugere que, ao menos durante o período reprodutivo, na maior parte do tempo, a fêmea esteja sob constante influência de estresse, caracterizado por níveis mais elevados de MGC basal, como resposta fisiológica a essas situações. Porém, ao realizar a análise das concentrações de MGC entre os sexos nos nossos animais, não foi encontrada diferença estatística entre os valores basais, o que derruba a aplicação da hipótese descrita por Wielebnowski e colaboradores (2002) no caso dos lobos-guarás. Outra possível explicação para ausência na redução das concentrações de MGC nas fêmeas pode ser a influência que os níveis de estrogênios e o ciclo estral exercem sobre as concentrações de MGC, assim como relatado por Kim e colaboradores (2006) em cães.

Foi possível também notar uma influência das concentrações de MGC em alguns comportamentos de machos e fêmeas. ~~NJá~~ no Comportamento Afiliativo, os machos apresentaram taxas mais altas do que as fêmeas [quando as concentrações de MGC estavam](#)

[altas](#). Alguns estudos anteriores, como o de Marneweck e colaboradores (2013), já relataram a existência de diferentes respostas comportamentais e fisiológicas em machos e fêmeas. Romero-Díaz e colaboradores (2019), em um estudo com *Zootoca vivipara*, e Burin e colaboradores (2018) com *Otocyon megalotis*, relataram que fêmeas, quando apresentam concentrações altas de MGC, apresentam menos comportamentos afiliativos e mais agonísticos do que os machos. Outros estudos que também investigaram a influência das concentrações de MGC no comportamento afiliativo em animais silvestres sob cuidados humanos, como o de Wooddel e colaboradores (2017), identificaram uma relação entre as baixas concentrações desse hormônio e as altas taxas desse comportamento em macacos rhesus (*Macaca mulatta*). A diferença entre as taxas de machos e fêmeas pode ser atribuída às influências dos hormônios sexuais. Embora não tenhamos medido as concentrações específicas desses hormônios, é plausível supor que a interação deles com os glicocorticoides teve impacto nos comportamentos afiliativos dos lobos. Essa influência é sugerida por estudos anteriores, como o de Rivier e Rivest (1991), que analisaram os mecanismos da atividade hipotalâmica-pituitária-gonadal em resposta a situações de estresse.

De acordo com essas pesquisas, os altos níveis de hormônios corticoides inibem a atividade sexual. Esse fenômeno pode resultar na falta de demonstração de comportamentos de proteção de território por parte dos lobos machos. Esses comportamentos, por sua vez, estão relacionados às interações agonísticas e ao estabelecimento de relações territoriais. Portanto, a diferença nas taxas de comportamento entre machos e fêmeas pode ser explicada, em parte, pela complexa interação entre os hormônios sexuais e os glicocorticoides, afetando os padrões de comportamento afiliativo e territorial dos lobos. Entretanto, a compreensão completa da relação entre os machos de lobos-guarás e suas taxas de MGC permanece ambígua na literatura.

Em espécies sociais, como os *M. mulatta*, observa-se que baixas concentrações de MGC estão associadas a altas taxas de comportamentos afiliativos. Por outro lado, em lobos-guarás, uma espécie solitária, a presença de altas concentrações de MGC parece coincidir com momentos de elevadas taxas de comportamentos afiliativos, embora essa dinâmica ainda careça de uma explicação abrangente.

Observamos que os lobos mais jovens exibiam taxas mais elevadas de comportamentos afiliativos, mais locomoção e mais forrageio, em comparação com indivíduos mais velhos. Hecht (2021) destaca a importância de se considerar a idade dos indivíduos ao avaliar o bem-estar de animais silvestres cativos. Ele argumenta que o número de experiências positivas e negativas vividas por um indivíduo ao longo de sua vida contribui para determinar seu bem-estar em um determinado momento, e ignorar o estágio ontogenético pode levar a dados incertos sobre o bem-estar do animal. Em um estudo envolvendo 168 cães domésticos, Neder e Soares (2021) descobriram que cães mais velhos apresentavam taxas mais altas de comportamentos agressivos e eram menos ativos. Resultados semelhantes foram identificados por Starling e colaboradores (2013), também com cães. Eles observaram que os indivíduos mais jovens apresentavam mais comportamentos afiliativos em contraste com os indivíduos mais velhos. Além disso, os mesmos autores concluem que o tempo dedicado a atividades sociais era maior entre os cães mais jovens em comparação com os mais velhos. Aplicando essa mesma lógica aos lobos-guarás e considerando as evidências da literatura atual (Dietz, 1984; de Paula, 2016; Paula et al., 2016; Paula e DeMatteo, 2016), que os caracterizam como animais solitários, formando pares apenas durante o período reprodutivo e no cuidado com a prole, podemos concluir que as informações sobre os lobos-guarás se unindo para criar sua prole e, conseqüentemente, os filhotes sendo criados em conjunto, explicam a discrepância nas taxas de comportamentos afiliativos entre indivíduos mais jovens e mais velhos. O comportamento social semelhante entre cães e lobos pode ser explicado pela proximidade

filogenética entre essas duas espécies, conforme apontado por Perini e colaboradores (2010). Eles afirmam que apenas a tribo os distingue, separando o lobo-guará dos cães domésticos e lobos cinzentos. No entanto, é importante notar que, em termos de sociabilidade, essas espécies exibem padrões opostos.

Embora a literatura atual (ex.: Jones et al. 2018; Piccione et al., 2013; Spàno et al. 2021) discuta os efeitos da Criação e da Origem dos animais como um único fator, observamos que tanto a Criação quanto a Origem exerceram influências distintas sobre o comportamento dos animais estudados. Em nosso trabalho, a Origem (se o lobo nasceu na instituição ou em ambiente natural) influenciou no forrageio dos animais, sendo os animais nascidos na natureza aqueles que apresentaram as maiores frequências de forrageio. As maiores taxas de forrageio em animais nascidos em vida livre podem estar relacionadas à necessidade de animais em ambiente natural de encontrar alimento, enquanto animais nascidos em zoológicos, não apresentam a mesma necessidade, por terem diariamente a oferta do alimento pela equipe técnica. A Criação (se criado por humanos ou pelos pais) não influenciou nenhum comportamento dos animais deste estudo. No trabalho de Spanó e colaboradores (2021), no grupo dos lobos-guarás nascidos em vida livre, observou-se um pico de atividade mais noturno, enquanto nos animais nascidos em zoológicos, predominou um comportamento mais diurno. Os autores interpretaram essa mudança como uma consequência dos cuidados humanos. Entretanto, apesar das conclusões dos autores mencionados anteriormente sugerirem que a maneira de criação teria uma influência nos animais, que dependeria de sua origem, a partir de nossos dados, é prudente considerar tanto a Criação quanto a Origem como fatores independentes ao avaliar o comportamento dos animais, evitando tratá-las como equivalentes.

Algumas variáveis podem ter contribuído como fatores de confusão durante a análise dos dados deste estudo, como a sazonalidade reprodutiva. De acordo com Brito e colaboradores

(2022), o comportamento das fêmeas de *Chrysocyon brachyurus* varia de acordo com seu ciclo estral. Como, devido a fatores logísticos, tivemos que coletar nossos dados dentro do período reprodutivo dos lobos guarás (de fevereiro a março), uma possível alteração comportamental nas fêmeas em função do período reprodutivo pode ter influenciado em nossos resultados. Essa seria uma possível explicação para sua falta de resposta hormonal ao enriquecimento ambiental. Entretanto, Vasconcellos (2009), ao realizar estudo semelhante ao nosso, porém fora do período reprodutivo da espécie, também encontrou redução nas concentrações de MGC somente nos machos, o que torna improvável que a diferença entre as respostas hormonais de machos e fêmeas tenha se dado em função de uma influência do ciclo estral. Esse é um aspecto que merece aprofundamento em pesquisas futuras, que desvendem a influência do ciclo estral e, por consequência, das concentrações de hormônios sexuais no temperamento e no comportamento das fêmeas dessa espécie, uma vez que, em cães domésticos, os hormônios sexuais exercem influência sobre seu temperamento. Por exemplo, Farhody e Zink (2010), Serpell e Hsu (2005) e Svartberg e Forkman (2002) destacam que machos castrados tendem a exibir níveis mais elevados de ansiedade em comparação com machos e fêmeas não esterilizados, enquanto fêmeas castradas demonstram maior tranquilidade em relação às não castradas. Além disso, de acordo com as descobertas de Starling e colaboradores (2013), o ciclo estral e o estado reprodutivo têm influência sobre o temperamento de cães domésticos. Dentro das limitações de nosso estudo, é importante ressaltar que, em nossa pesquisa, empregamos somente um modelo de EA (alimentar), o que impossibilitou a identificação da estratégia de enriquecimento mais eficiente para a diminuição das concentrações de MGC nas fêmeas.

Os resultados obtidos neste estudo têm implicações significativas para o manejo *ex-situ* visando ao bem-estar de *Chrysocyon brachyurus* e de outros animais silvestres, especialmente os da ordem Carnivora. Isso ocorre uma vez que o estudo expõe as diferenças nas respostas,

tanto comportamentais quanto fisiológicas, de lobos-guarás de diferentes sexos e perfis de temperamento. Uma vez que a oferta de EA reduziu as concentrações de MGC apenas nos machos, é recomendável que este método seja aplicado frequentemente aos lobos-guarás machos. Quanto às fêmeas, é importante que se busque qual o melhor método para reduzir suas concentrações de MGC. Nosso estudo estabelece, também, uma base para investigações futuras sobre a seleção de indivíduos para soltura, com base em suas características de temperamento. Esse enfoque leva em consideração fatores cruciais, como a neofobia e a exploração, ao planejar programas de soltura de animais na natureza. Uma pesquisa conduzida por Le Balle e colaboradores (2021), ao examinar os efeitos do temperamento na conservação de *Chelonoidis denticulatus* e *Chelonoidis carbonarius*, ressaltou a importância da avaliação do temperamento dos animais, pois encontraram variações nos padrões individuais que influenciaram nos padrões populacionais das espécies. Essas variações podem ter impactos significativos nos ecossistemas naturais como, por exemplo, na escolha de diferentes presas para alimentação. Portanto, ao desenvolver planos de soltura, torna-se essencial considerar cuidadosamente os custos e benefícios associados a cada tipo de temperamento em uma determinada área. Um equilíbrio adequado entre os números de indivíduos de diferentes temperamentos na área de soltura é fundamental para o sucesso dos programas de conservação. O temperamento pode impactar na sobrevivência de animais soltos, e a aplicação de testes de temperamento e pode servir como ferramentas para os esforços de conservação das espécies silvestres.

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados deste estudo apontaram para uma conexão entre o temperamento, o comportamento, o sexo e os níveis de estresse em lobos-guarás mantidos em cativeiro. Registrou-se que as fêmeas cautelosas exibiram maior atividade locomotora, enquanto as concentrações de MGC permaneceram estáveis em fêmeas de modo geral durante a implementação de enriquecimento ambiental. De forma geral, a introdução do enriquecimento ambiental teve efeitos potencialmente benéficos, resultando na redução das concentrações de MGC nos machos, reduzindo também o tempo em descanso, também com redução dos momentos em que os animais não estavam visíveis – para ambos os sexos.

Apesar da escassez de trabalhos publicados na literatura atual sobre os impactos do sexo no bem-estar de animais silvestres, nossos achados indicam a relevância das instituições zoológicas considerarem as habilidades e necessidades específicas de cada sexo ao elaborar estratégias de enriquecimento ambiental. Isso visa a aprimorar o bem-estar dos indivíduos, ampliando a complexidade de seus ambientes e reduzindo manifestações de estresse, tais como comportamentos estereotipados e níveis elevados de MGC.

## 6. REFERÊNCIAS

- ALEJANDRO, J.; YAMANASHI, Y.; NEMOTO, K.; MOURI, K.; HUANG, C.; BERCOVITCH, F. B.; HUFFAMN, M. A. Reducing stress and stereotypic behaviors in captive female pygmy slow lorises (*Nycticebus pygmaeus*). **American Journal of Primatology**. v. 85. p.2e23496. 2023.
- AMBONI, M.P.M. Dieta, disponibilidade alimentar e padrão de movimentação do lobo-guará, *Chrysocyon brachyurus*, no Parque Nacional da Serra da Canastra, MG. Dissertação (Mestrado em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre). Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim. Behav.** v.21, p.205–235. 1973.
- AZEVEDO, F. C. **Área de vida e organização de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) na região do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil** (PDF) (Tese de Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais. 2008.
- BALIEIRO, F.; MONTICELLI, P. F. Evidence of individual discrimination in the maned wolf long-distance extended-bark. **Behavioural Process**. v.158. p.219-227. 2019.
- BOISSY, A. Fear and fearfulness in animals. **Q. Rev. Biol.** v.70 p.165–191. 1995.
- BOISSY, A.; BOUISSOU, M. Assessment of individual differences in behavioural reactions of heifers exposed to various fear-eliciting situations. **Applied Animal Behaviour Science**, v.46 n.1-2, p.17-31. 1995.
- BOONSTRA, R. Coping with changing northern environments: the role of the stress axis in birds and mammals. **Integrative and Comparative Biology**. v.44, p.95–108, 2004.
- BOWKETT, A. E. Recent captive-breeding proposals and the return of the ark concept to global species conservation. **Conservation Biology** v.23 n.3 p.773-776. 2009.
- BRADY, C. A. The vocal repertoires of the bush dog (*Speothos venaticus*), crab eating fox (*Cerdocyon thous*) and maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). **Animal Behaviour**. v.29 p.649-669. 1981.
- BRASIL, **DECRETO Nº 9.899 DE 15 DE JULHO DE 2009**, Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e sua secretaria-executiva, cria o cadastro das instituições de uso científico de animais - ciuca, mediante a regulamentação da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. Brasília, 2009.

BRASIL, **INSTRUÇÃO NORMATIVA IBAMA Nº 07, DE 30 DE ABRIL DE 2015.**

Institui e normatiza as categorias de uso e manejo da fauna silvestre sob cuidados humanos, e define, no âmbito do IBAMA, os procedimentos autorizativos para as categorias estabelecidas. Brasília, DF. 2015.

BRASIL, **LEI Nº 11.794 DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, Regulamenta o inciso VII do §1º do art. 255 da Constituição Federal, estabelecendo o procedimento para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638 de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Brasília, 2008.

BREMNER-HARRISON, S.; PRODOHL, P. A.; ELWOOD, R. W. Behavioral trait assessment as a release criterion: boldness predicts early death in a reintroduction programme of captive-bred swift fox (*Vulpes velox*). **Animal Conservation**, v.7, p.313-320. 2004.

BRITO, L. de J. M. de; GOMES, P. D.; ROSA, G. B. da; FREITAS, V. S. Behavior and reproductive biology of a female maned wolf (*Chrysocyon brachyurus* Illiger, 1815) under human care. **Brazilian Journal of Science**, [S. l.], v. 1, n. 5, p. 65–75, 2022. doi:10.14295/bjs.v1i5.82.

BRUIN, P. R.; GANSWINDT, A.; LAVER, P.; le ROUX A. Friendly foxes: the relationship between steroid hormones and social behaviour in a monogamous African canid. **Journal of Zoology**. v.306. p.110-118. 2018.

CARLSTEAD, K. Effects of captivity on the behavior of wild mammals. In Wild Mammals in Captivity principles and techniques. 1996. In D. G. Kleiman, M. E. Allen, K. V. Thompson, & S. Lumpkin. (Eds.) **Wild Mammals in Captivity principles and techniques** (pp. 317-333). The University of Chicago Press. 1996.

CARVALHO, C. T.; VASCONCELLOS, L. E. M. Disease, food and reproduction of the maned wolf - *Chrysocyon brachyurus* (Illiger) (Carnivora, Canidae) in southeast Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia** v.12 p.627-640. 1995.

CATAPANI M. L.; PIRES J. S. R.; VASCONCELLOS A. D. S. Single- or Pair-Housed: Which Is Better for Captive Southern Tamanduás? **J Appl Anim Welf Sci**. v.22 n.3 p.289-297. 2019. doi: 10.1080/10888705.2018.1508352.

CLEGG, I. L. K.; DOMINGUES, M.; STRÖM, E.; BERGGREN, L. Cognitive foraging enrichment (but not non-cognitive enrichment) improved several longer-term welfare indicators in bottlenose dolphins. **Animals**. v.13. n.238. 2023.

COELHO, C. M.; AZEVEDO, C. S.; YOUNG, R. J. Behavioural response of maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*, Canidae) to different categories of environmental enrichment stimuli and their implications for successful reintroduction. **Zoo Biology**. v.31. p.453-469. 2012.

CONSELHO ESTDUAL DE POLÍTICA AMBIENTAL – COPAM, **Deliberação Normativa COPAM nº 147, de 30 de abril de 2010**. Aprova a Lista de Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna do Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2010.

- DE BOER, S. F.; VAN DER VEGT, B. J.; KOOLHAAS, J. M. Individual variation in aggression in feral rodent strains: a standard for the genetics of aggression and violence? **Behav. Genet.** v.33 p.485–501. 2003.
- DE PAULA, R. C.; RODRIGUES, F. H. G.; QUEIROLO, D.; JORGE, R. S. P.; LEMOS, F.; RODRIGUES, L. Avaliação do risco de extinção do lobo-guará *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira.** v.3 n.1 p.146-159. 2013.
- DE PAULA, R.C.; MÉDICI, P.; MORATO, R.G. (org.). **Plano de ação para a conservação do Lobo-guará: análise de viabilidade populacional e de habitat.** Brasília: IBAMA. 158p. 2008.
- DIETZ, J. M. *Chrysocyon brachyurus*. **Mammalian Species**, v.234 p.1-4. 1985.
- DIETZ, J. M. **Ecology and social organization of the Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*)**, Smithsonian Contributions to Zoology v.392 p.1-51. 1984.
- DONALD, K.; BENEDETTI, A. GOULART, V. D. L. R.; DEMING, A.; NOLLENS, H.; STAFFORD, G.; BRANDO, S. Environmental enrichment devices are safe and effective at reducing undesirable behaviors in California sea lions and northern elephant seals during rehabilitation. **Animals**, v.13. n.1222. 2023.
- DRENT, P.; VAN OERS, K.; VAN NOORDWIJK, A.J. Realised heritability of personalities in the great tit (*Parus major*). **Proc. R. Soc. Lond.** v.270 p.45–51. 2003.
- EARLEY, R.L.; HSU, Y.; WOLF, L.L. The use of standard aggression testing methods to predict combat behavior and contest outcome in *Rivulus marmoratus* dyads (Teleostei: Cyprinodontidae). **Ethology** v.106 p.743–761. 2000.
- FAURE, J.-M.; MILLS, A. **Improving the adaptability of animals by selection. In Genetics and the behavior of domestic animals.** Grandin, T. (Ed.). San Diego, CA: Academic Press. 1998.
- FARHOODY, P.; ZINK, M. C.. **Behavioral and physical effects of spaying and neutering domestic dogs (*Canis familiaris*).** Dissertação de Mestrado, Hunter College, maio de 2012, pp. 1–4.
- FIGUEIRA, M. P.; SILVA, F. F. R.; RIBEIRO, A.; SILVA, A.; BOERE, V. The behavioral response of crab-eating fox to olfactory enrichment. **Applied Animal Behaviour Science.** v. 242. p.105430. 2021.
- FLETCHALL N. B. Natural history, p.6-9. In: Fletchall N.B., Rodden M. & Taylor S. (Eds), **Husbandry Manual for the Maned Wolf *Chrysocyon brachyurus*.** John Ball Zoo, Grand Rapids v.33 n.2. p.265-272. fev. 1995.
- GOEBEL, L. G. A.; SANTOS, K. R.; GONÇALVES, M. S. Ocorrência de Lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) no sul do estado de Rondônia, Norte do Brasil. **Revista Saber Científico** v. 8, n.1, p.156-161. 2019.

GOSLING, S.D. From mice to men: what can we learn about personality from animal research? **Psychol. Bull.** v.127 p.45–86. 2001.

GOYMANN, W.; MÖSTL, E. GWINNER, E. Corticosterone Metabolites Can be Measured Noninvasively in Excreta of European Stonechats (*Sxicola torquata*). **The Auk**, v.199, n.4, p. 1167-1173, 2002.

GRANDIN, T. **Genetics and the behavior of domestic animals**. San Diego, CA: Academic Press. 1998.

GREENBERG, R.; METTKE-HOFFMAN, C. Ecological aspects of neophobia and neophilia in birds. **Curr. Ornithol.** v.16 p.119–178. 2001.

GRIFFIN, A. S.; BLUMSTEIN, D. T.; EVANS, C. S. Training Captive-bred or translocated animals to avoid predators. **Conservation Biology** v.14 n.5 p.1317-1326. 2000.

GUÉRINEAU, C.; LÖÖKE, M.; GANASSIN, G.; BERTOTTO, D.; BORTOLETTI, L. C.; FURLATI, S.; MONGILLO, P.; MARINELLI, L. Enrichment with classical music enhances affiliative behaviours in bottlenose dolphin. **Applied Animal Behaviour Science**. v.254. p.105696. 2022.

GUSSET, M.; DICK, G. Building a future for wildlife? Evaluating the contribution of the world zoo and aquarium community to in situ conservation. **International Zoo Yearbook** v.44 p.183-191. 2010.

HARRISON, L. M.; NOBLE, D. W. A.; JENNIONS, M. D. A meta-analysis of sex differences in animal personality: no evidence for the greater male variability hypothesis. **Biological Reviews** v.97 n.2 p.679-707.

HECHT, L. The importance of considering age when quantifying wild animal's welfare. **Biological Reviews**. v.96. p.2602-2616. 2021.

IBRAHIM, S. A.; GOMA, A. A.; ALSENOSY, A. A. Springing bottles enrichment toy effect on behaviors and cortisol level of Keneded dogs (*Canis lupus familiaris*). **Alexandria Journal of Veterinary Sciences**. v.66 n.2 p.20-29. 2020.

JACOBS, L.; BLACTCHFORD, R. A.; JONG, I. C.; ERASMUS, M. A.; LEVENGOOD, M.; NEWBERRY, R. C.; REGMI, P.; RIBER, A. B.; WEIMER, S. L. Enhancing their quality of life: environmental enrichment for poultry. **Symposium Articles**. v.102. n.1. 2023.

JONES, M. K.; REITER, L. E.; GILMORE, M. P.; FREEMAN E. W.; SONGSASEN, N. Physiological impacts of housing maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) with female relatives unrelated males. **Gen Comp Endocrinol**. v.267 p.109-115.

KEULARTZ, J. Captivity for Conservation? Zoos at a Crossroads. **J Agric Environ Ethics**. v.28 p.335–351. 2015. <https://doi.org/10.1007/s10806-015-9537-z>

KIM, H.H.; YEON, S.C.; HOUP, K.A.; LEE, H.C.; CHANG, H.H.; LEE, H.J. Effects of ovariectomy on reactivity in German Shepherd dogs. **The Veterinary Journal** 172, 154–159. 2006.

LAUDERDALE L.K.; MILLER L.J. Efficacy of an interactive apparatus as environmental enrichment for common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Animal Welfare**. Cambridge University Press. v.29 n.4 p.379–86. 2020.

LE BALLE, R.; COTE, J.; FERNANDEZ, F. A. S. Evidence for animal personalities in two Brazilian tortoises (*Chelonoidis denticulatus* and *Chelonoidis carbonarius*) and insights for their conservation. **Applied Animal Behavior Science**. v.241 p.105400. 2021.

LEES, J. J.; NUDDS, R. L.; FOLKOW, L. P.; STOKKAN, K. A.; CODD, J. R. Understanding sex differences in the cost of terrestrial locomotion. **Proc. R. Soc. B**. 279826–832. 2012.

MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 1ª edição. Brasília, DF; MMA; Belo Horizonte, MG; Fundação Biodiversitas. 2008.

MARNEWECK, D. G.; GANSWINDT, A.; RHODES, S.; BELLEM, A.; BRYANT, J.; WIELEBNOWSKI, N.; DALERUM, F. Reproductive endocrinology of zoo-housed aardwolves. **Acta Theriol**. v.58. p.223-232. 2013.

MARTIN, P. A.; CRUMP, M. H. The Endocrine Pancreas. In: PINEDA, M. H.; DOOLEY, M. P. **McDonald's veterinary endocrinology and reproduction**, ed. 5. Ames, Iowa, 2003.

MCDOUGALL, P. T.; RÉALE, D.; SOL, D.; READER, S. M. Wildlife conservation and animal temperament: causes and consequences of evolutionary change for captive, reintroduced, and wild populations. **Animal Conservation**. v.9 p.39–48. 2006.

MELLEN, A.; HAYES, M.; SHEPHERDSON, D. Captive environments for small felids In: **Second Nature. Environmental Enrichment for captive Animals**. Eds. D. Shepherdson, J. D. Mellen, M. Hutchins. Washington, DC. 184-201. 1998.

MELLOR, D. J.; HUNT, S.; GUSSET, M. (eds). **Caring for Wildlife: The World Zoo and Aquarium Animal Welfare Strategy**. Gland. WAZA Executive Office. 87 pp.. 2015

MELO, L. F. B.; SÁBATO, M. A. L.; MAGNI, E. M. V.; YOUNG, R. J.; COELHO, C. M. First observations of nest attendance behavior by wild maned wolves, *Chrysocyon brachyurus*. **Zoo Biology**. v.28 n.1 p.69-74. 2009.

MIGLIOLI, A.; VASCONCELLOS, A. S. Can behavioral management improve behavior and reproduction in captive blue-and-yellow macaws (*Ara ararauna*)? **Applied Animal Behaviour Science**. v.241. 2021, 105386.

MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**. v.23, p.67–74, 2002.

OLIVEIRA, L. B. S.; VASCONCELLOS, A. S. May unpredictable events affect monkey welfare under human care? **Behavioral Process**. v.200 p.104655. 2022.

ONBAŞILAR, E.E.; AKSOY, F.T. Stress parameters and immune response of layers under different cage floor and density conditions. **Livest. Prod. Sci.**, v.95, p.255-263, 2005.

OROZCO, M. M.; CARUSO, N.; NATALINI, M. B.; IACONIS, K.; TITTARELLI, M.; JUAREZ, C. P.; ANDRÉS, P.; ROSACER, C.; CICCIA, P. G.; SOLER, L. Updating the distribution range of the maned wolf *Chrysocyon brachyurus* in Argentina. **Oryx**, v.57. n.2. p.248-251. 2023.

PAULA, R.C.; DEMATTEO, K. *Chrysocyon brachyurus* (errata version published in 2016). **The IUCN Red List of Threatened Species 2015**: e.T4819A88135664.2016.

Disponível em:

<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20154.RLTS.T4819A82316878.en>. Accessed on 07 July 2023.

PERINI, F. A.; M. RUSSO, C. A.; and C. G. SCHRAGO. The evolution of South American endemic canids: a history of rapid diversification and morphological parallelism. **Journal of Evolutionary Biology** v.23, n.2 p.311-322. 2010. Accessed July 10, 2023.

<https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2009.01901.x>.

PICCIONE, G.; ARFUSO, F.; GIANNETTO, C.; FRAGGIO C.; PANZERA, M. Effect of housing conditions and owner's schedule on daily total locomotor activity in dogs (*Canis familiaris*). **Biol Rhythm Res.** v.44 n.5 p.778-786.

PRICE, E.O. **Animal domestication and behavior**. London, UK: CAB International. 2002.

QUEIROLO, D. **Seletividade E Sazonalidade De Presas Consumidas Pelo Lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) No Parque Nacional Da Serra Da Canastra, Minas Gerais**. Dissertação De Mestrado, Universidade De São Paulo, São Paulo. 2011.

QUEIROLO, D.; MOTTA-JUNIOR, J.C. Prey availability and diet of maned wolf in Serra da Canastra National Park, southeastern Brazil. **Acta Theriologica**, 52, 391-402. 2007.

RADICAL, A.; NORMANDO, S.; PONZIO, P.; BONO, L.; MACCHI, E. The effects of the addition of two environmental enrichments on the behavior and fecal cortisol levels of three small felids species (*Caracal caracal*, *Leptailurus serval*, *Leopardus pardalis*) in captivity. **Journal of Veterinary Behavior**. v.60. p.56-64. 2023.

REDFORD, K. H.; J. F. EISENBERG. **Mammals Of The Neotropics, Volume 2. The Southern Cone: Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay**. The University of Chicago Press, Chicago. 2011.

RIVIER, C.; RIVEST, S. Effect of Stress on the Activity of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis: Peripheral and Central Mechanisms. **Biology of Reproduction**, v.45 n.4, p.523–532. 1991. doi:10.1095/biolreprod45.4.523

ROMERO-DIAZ, C.; GONZALEZ-JIMENA, V.; FITZE, P. S. Corticosterone mediated mate choice affects female mating reluctance and reproductive success. **Hormone and Behavior**. v.113. p.1-12. 2019.

- RODRIGUES, F.H.G. Biologia e conservação do lobo-guará na Estação Ecológica de Águas Emendadas, DF. Tese (Doutorado em Ecologia). Universidade Estadual de Campinas. 2002.
- ROEBEN, P. Studbooks for the Maned Wolf, Bush dog and Spectacled bear. **International Zoo Yearbook**. v.15 n.1 p.287-300, 1975.
- ROMTVEIT, L.; STRAND, O.; MOSSING, A.; KASTDALEN, L.; HJELTNES, A. W.; BJERKETVEDT, D. K.; ODLAND, A.; HEGGENES, J. Optimal foraging by a large ungulate in an extreme environment: Wild mountain reindeer select snow-free feeding habitats in winter. **Ecology and Evolution**. v.11, p.10409-104209. 2021.
- RUMIZ, D.; SAINZ, L. A. Estimación Del hábitat útil y La abundancia potencial Del lobo de crino o borochi (*Chrysocyon brachyurus*) em Huanchaca, Santa Cruz. **Ver. Boliv. Ecol. Conserv. Ambient.** v.11 p.3-16. 2002.
- SANDERS, S.; FEIJÓ, A. G. S. Uma reflexão sobre animais selvagens cativos em zoológicos na sociedade atual. In: **CONGRESSO INTERNACIONAL TRANSDISCIPLINAR AMBIENTE E DIREITO**, 3., 2007, Porto Alegre. Porto Alegre: PUCRS, 2007.
- SERPELL, J. A.; HSU, Y.. Effects of breed, sex, and neuter status on trainability in dogs. **Anthrozoos: A Multidisciplinary Journal of The Interactions of People and Animals**, v. 18, p. 196–207, 2005.
- SHEPHERDSON, D. J.; CARLSTEAD, K.; MELLEN, J. D.; DEIDENSTICKER, J. The influence of food presentation on the behavior of small cats in confined environments. **Zoo Biol.** v.12 p. 203-216. 1993.
- SILVEIRA, L. **Ecologia e conservação dos mamíferos carnívoros do Parque Nacional das Emas, Goiás**. Dissertação (Mestrado em Ecologia). Universidade Federal de Goiás. 125p. 1999.
- SPANÒ, N.; CERUTTI, D.; RIZZO, M.; ALBERGHINA, D.; SCAGLIONE, M. C.; BAILET, A. S.; GIANNETTO, C.; PICCIONE, G. Evaluation of the patterns of daily total locomotor activity in maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) maintained in captivity. **Biological Rhythm Research**. v.52, n.3, p.454-461. 2021.
- STAM, N.C., NITHIANANTHARAJAH, J., HOWARD, M.L., ATKIN, J.D., CHEEMA, S.S. AND HANNAN, A.J. Sex-specific behavioural effects of environmental enrichment in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **European Journal of Neuroscience**, v.28 p.717-723. 2008.
- STANTON, L. A.; SULLIVAN, M. S.; FAZIO, J. M. A standardized ethogram for the felidae: A tool for behavioral researchers. **Applied Animal Behaviour Science**, v.173 p.3-16. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.04.001>
- STARLING, M. J.; BRITTON, A. R. C.; SQUIRE, J. M.. Age, sex and reproductive status affect boldness in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 3, p. 868-872, 2013. DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.05.019.

STOTHART, M. R.; BOBBIE C.B.; SCHULTE-HOSTEDDE, A.I.; BOONSTRA R., PALME R.; MYKYTCZUK N.C.S.; NEWMAN A.E.M. Stress and the microbiome: linking glucocorticoids to bacterial community dynamics in wild red squirrels. **Biol. Lett.** v.12 n.1 p.20150875. 2016.

SVARTBERG, K.; FORKMAN, B.. Personality traits in domestic dog (*Canis familiaris*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 79, p. 133–155, 2002.

SUÀREZ, P.; RECIERDA, P.; ARIAS-DE-REYNA, L. Behaviour and welfare: the visitor effect in captive felids. **Animal Welfare**, v.26, n.1. p.25-34. 2017.

TAVARES, H. S. **Alimentação e nutrição de animais silvestres nativos e exóticos cativos – O papel do zootecnista**. 2011.

TEBELMANN, H.; GANSLOBER, U. Social reward behaviour in two groups of european grey wolves (*Canis lupus lupus*) – A case study. **Animals**. v.13 n.872. 2023.

VASCONCELLOS, A. S. **Estímulo ao forrageamento como fator de enriquecimento ambiental para lobos-guará: efeitos comportamentais e hormonais**. Tese (Doutorado – Programa de Pós-graduação em Psicologia. Área de Concentração: Psicologia Experimental. Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo. 2009.

VASCONCELLOS, A. S.; CHELINI, M. O. M.; PALME, R.; GUIMARÃES, M. A. B. V., OLIVEIRA, C. A.; ADES, C. Comparison of two methods for glucocorticoid evaluation in maned wolves. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31 p.79-83. 2011.

VASCONCELLOS, A. S.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; OLIVEIRA, C. A.; PIZZUTTO, C. S.; ADES, C. Environmental enrichment for maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*): Group and individual effects. **Animal Welfare**, v.18 n.3 p.289–300. 2009.

VELDINK, J. H.; BÄR, P. R.; JOOSTEN E. A. J.; OTTEN, M.; WOKKE, J. H. J.; VAN DEN BERG L. H. . Sexual differences in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS. **Neuromuscular Disorders** v.13, no. 9. p. 737-743. 2003.

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The open-field test: a critical review. **Psychol. Bull.** 83, 482–504. 1976.

WEBB, L. E.; REENEN C. G. van; JENSEN, M. B.; SCHMITT, O.; BOKKERS, E. A. M. Does temperament affect learning in calves? **Applied Animal Behaviour Science**. v.165. p.33-39. 2015.

WESTERGAARD, G. C.; FRAGASZY, D. M. Effects of manipulable objects on the activity of captive capuchin monkeys (*Cebus apella*). **Zoo Biology**, v.4 n.4 p.317–327. 1985. <https://doi.org/10.1002/zoo.1430040402>

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

WINSHIP, K.A.; ESKELINEN, H.C. Behavioral responses of two species of dolphins to novel video footage: an exploration of sex differences. **Zoo. Biol.** v.37, p.399–407. 2018. <https://doi.org/10.1002/zoo.21444>.

WOODDEL, L. J.; HAMEL, A. F.; MURPHY, A. M.; BYERS, K. L.; KABURU, S. S. K.; MEYER, J. S.; SUOMI, S. J.; DETTMER, A. M. Relationships between affiliative social behavior and hair cortisol concentrations in semi-free ranging rhesus monkeys. **Psychoneuroendocrinology.** v.84 p.109-115. 2017.