

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Camila Mendonça Netto Jobim

**Efeito do enriquecimento ambiental no comportamento e no cortisol fecal  
de *Callithrix penicillata* (É. Geoffroy, 1812) de cativeiro**

Juiz de Fora  
2011

Camila Mendonça Netto Jobim

**Efeito do enriquecimento ambiental no comportamento e no cortisol fecal de *Callithrix penicillata* (É. Geoffroy, 1812) de cativeiro**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Biologia e Comportamento Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Prezoto

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Bernardete Cordeiro de Sousa

Juiz de Fora  
2011

Netto Jobim, Camila Mendonça.

Efeito do enriquecimento ambiental no comportamento e no cortisol fecal de *Callithrix penicillata* (É. Geoffroy, 1812) de cativeiro / Camila Mendonça Netto Jobim. – 2011.

55 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biologia e Comportamento Animal)—  
Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

1. Comportamento animal. I. Título.

CDU 591.51

Camila Mendonça Netto Jobim

**Efeito do enriquecimento ambiental no comportamento e no cortisol fecal de *Callithrix penicillata* (É. Geoffroy, 1812) de cativeiro**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Biologia e Comportamento Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2011.

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Fábio Prezoto (Orientador)  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Bernardete Cordeiro de Sousa  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

---

Prof. Dr. Gelson Genaro  
Universidade Federal de Juiz de Fora

À minha mãe, meu pai e meu irmão pelo amor, dedicação, confiança e inspiração.

## Agradecimentos

Agradeço ao meu amigo e orientador Fábio Prezoto pela confiança depositada em mim desde 2003 quando o procurei querendo estudar comportamento animal. Sua confiança e amizade me encorajaram a chegar onde nós não imaginávamos que chegaríamos. À Prof<sup>ª</sup> Maria Bernardete Cordeiro de Sousa agradeço imensamente a atenção, interesse e paciência sem os quais esta jornada não teria sucesso. Seu conhecimento, conduta profissional e generosidade são inspiradores.

À Prof<sup>ª</sup> Vera Maria Peters por ter me aberto as portas do CBR e me permitido fazer parte da rotina do Centro. Aprendi muito com o convívio e agradeço aos amigos e funcionários pelos sinceros “Bom Dia” pelos corredores. Ao Srs. Luiz Carlos e João Carlos, responsáveis pelos primatas meu reconhecimento pela dedicação aos animais e meus sinceros agradecimentos pela colaboração, amizade e companhia. E a Profa. Martha Guerra pela colaboração na qualificação e no texto final da dissertação.

Aos meus queridos AZ 96, V 94, AZ 91, V 97, AZ 76, V 88 e queridas F 05A, F 05B, F 21, F 14, AM 99 (*in memorian*) e F DO, que significam mais que simples objetos de estudo, foram a minha inspiração e motivação para conduzir os experimentos.

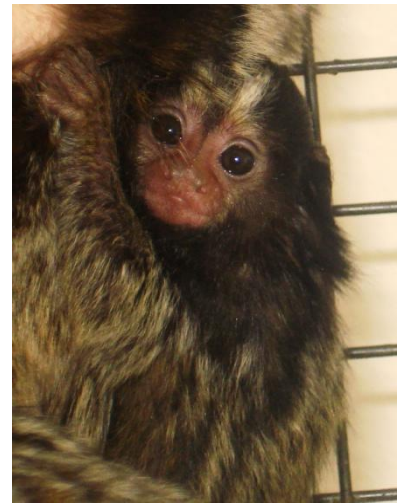
Ao Laboratório de Análises Hormonais da UFRN, seus funcionários e estagiários – Eliane, Cássio, Victor, Edilma e Profa. Hélderes, pela ajuda nas análises. E aos professores e funcionários do Programa de Pós Graduação de Comportamento e Biologia Animal, principalmente ao Prof. Gelson pelo esforço em participar da banca.

À FAPEMIG pela bolsa de estudo.

À minha família, mãe, pai, Bê, vó Neusa e todos os outros que sempre acreditaram em mim e de uma forma ou outra me ajudaram na realização deste trabalho. A compreensão e colaboração de todos foi o suporte que levantou e me manteve de cabeça erguida sempre.

À Rapha que sempre me apoiou, aconselhou e segurou a onda quando o desânimo batia e compartilhou dos momentos felizes e conquistas. Nestor, Benedito, Mariè e Feliciano (*in memorian*) pelos carinhos e companhia.

E aos meus amigos que sempre acreditaram que ia dar tudo certo.



"Não há diferenças fundamentais entre o homem e os animais nas suas faculdades mentais: os animais, como os homens, demonstram sentir prazer, dor, felicidade e sofrimento." (Charles Darwin)

## Resumo

Pela proximidade filogenética com os seres humanos os primatas não humanos são utilizados freqüentemente em estudos comparativos sobre o comportamento e como modelos experimentais na pesquisa biomédica. Contudo, o uso destes primatas implica numa série de questões éticas, incluindo as condições de seu cativeiro e os potenciais fatores da experimentação que podem acarretar dor, injúrias e estresse, interferindo diretamente no bem-estar do animal. O presente trabalho buscou avaliar as respostas comportamentais e endócrinas de sagüis-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) cativos, machos e fêmeas, frente à técnica de enriquecimento ambiental do tipo alimentar (tubo) e isolamento visual (barreira). As observações foram realizadas em uma amostra de seis fêmeas e seis machos adultos de *C. penicillata* mantidos no Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. As observações comportamentais foram realizadas antes, durante e depois da aplicação da técnica de enriquecimento, no período da manhã, iniciando entre 10 e 11 horas. A avaliação endócrina foi realizada através da mensuração dos níveis de cortisol presente nas amostras fecais dos animais. Tais análises foram realizadas no Laboratório de Dosagens Hormonais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Para o enriquecimento alimentar foram encontradas alterações significativas que indicam que este foi eficaz reduzindo comportamentos de alimentação durante a exposição ao enriquecimento e reduzindo a agitação. Para este tipo de enriquecimento os machos se mostraram comportamentalmente mais reativos que as fêmeas e não houve diferença significativa para os níveis de cortisol. Com a utilização do enriquecimento social, foi verificado o conflito gerado com a proximidade entre indivíduos do mesmo sexo, sendo a fase com a barreira a que menos apresentou comportamentos indicativos de estresse, e as fêmeas apresentaram os menores valores para o cortisol. No confronto dos dados de machos e fêmeas, estas se mostraram mais reativas à presença de outras fêmeas, possivelmente pelo fato que sua estratégia reprodutiva ser reflexo do status social. Para os machos o isolamento foi um fator de estresse, uma vez que tiveram maior concentração de cortisol.

*Palavras chave: Enriquecimento social, enriquecimento alimentar, comportamento animal, cortisol, bem-estar, Callithrix penicillata.*



## Abstract

Non-human primates are often used in behavioral studies and in biomedical research as a model mainly because their phylogenic proximity to human beings. However, the use of non-human primates in researches implies in many ethical issues, including the captivity conditions and the potential aspects of the procedures that may cause pain, injuries and stress which can interfere with their welfare. The present research intended to analyze the behavioral and endocrine responses of six males and six females of captive black-tufted marmosets (*Callithrix penicillata*) to a feeding (tube) and a visual isolation (barrier) environmental enrichment techniques. The animals belong to the colony maintained by Centro de Biologia da Reprodução of Universidade Federal de Juiz de Fora, in Juiz de Fora, Minas Gerais state, in Brazil. The behavior and hormonal data were collected before, during and after the exposure to environmental enrichment. The hormonal analysis of fecal cortisol was performed in the Laboratorio de Dosagens Hormonais of the Universidade Federal do Rio Grande do Norte. During the exposure to the feeding enrichment technique – FASE II, it was observed a decrease in movement and in ingestion of the regular diet by the animals. Besides, in this experiment, the male marmosets were more reactive than the females and no significant differences on cortisol levels were detected. Using the social enrichment (a visual barrier between the cages), it was verified the existence of conflicts between close same-sex animals, which decreased cortisol when the barrier was used. In this case, the marmoset females were more reactive to the enrichment probably because they compete to reproductive as a consequence of social dominance. For males the isolation seems to be a stressful situation since they increase cortisol on this situation.

*Keywords: feeding enrichment; social enrichment; animal behavior; animal welfare; Black-tufted marmosets; cortisol.*

## Lista de ilustrações

Figura 1: Mapa de distribuição da espécie <i>Callithrix penicillata</i> no Brasil. (Fonte: Modificado de IUCN) .....	16
Figura 2: Estrutura molecular do cortisol (Fonte: Guyton e Hall, 2006).....	21
Figura 3: Sala onde estavam alojados os 6 machos e 6 fêmeas estudados, pertencentes à colônia do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR/UFJF) .....	22
Figura 4: Fêmeas de <i>Callithrix penicillata</i> utilizadas durante o experimento A- F05A, B- F21, C- F05B, D- F14, E- AM99 E F- FDO, pertencentes à colônia do Centro de Biologia da Reprodução - UFJF .....	23
Figura 5: Machos de <i>Callithrix penicillata</i> utilizados durante o experimento A- AZ91, B- AZ76, C- AZ96, D- V94, E- V88 E F- V97, pertencentes a colônia do Centro de Biologia da Reprodução – UFJF .....	24
Figura 6: Detalhamento da sequência de atividades do experimento.....	25
Figura 7: A- Interação de um indivíduo com o com o enriquecimento - TUBO, B- Vista frontal do TUBO preso a gaiola com marcas da interação dos animais e C- Vista lateral do TUBO com marcas de unhas e dentes.....	26
Figura 8: A- Vista frontal de uma gaiola com o isolamento visual BARREIRA e B- Vista lateral parcial das gaiolas com a BARREIRA mostrando o isolamento dos animais com seus vizinhos laterais.....	27
Figura 9: Sequência das FASES do experimento.....	27
Figura 10: Sequência dos dias e suas atividades de cada FASE do experimento.....	28
Figura 11: Box-Plot de mediana da frequência comportamental de ALER para machos nas três fases do enriquecimento TUBO. A FASE III* apresentou maior frequência quando comparada as outras fases.....	32
Figura 12: Box-Plot de mediana da frequência comportamental de MOV para machos nas três fases do enriquecimento TUBO. * Na FASE I este comportamento foi significativamente maior do que na FASE III. ....	33

Figura 13: Box-Plot de mediana da freqüência comportamental de CAT para machos nas três fases do enriquecimento TUBO. Na FASE II*, CAT foi significativamente menor do que nas FASES I e III.....	33
Figura 14: Box-Plot de mediana da freqüência comportamental de ALER para fêmeas nas três fases do enriquecimento TUBO, tendo sido menor na FASE II* em relação às outras duas fases. ....	34
Figura 15: Box-Plot de mediana da freqüência comportamental de ALIM para fêmeas nas três fases do enriquecimento TUBO. FASE I* com maior freqüência que na FASE II e FASE III. ....	34
Figura 16: Box-Plot de mediana com a comparação da freqüência comportamental de ALER para machos e fêmeas por fase do experimento. Os machos apresentaram freqüências maiores do que as fêmeas nas FASES II* e III*.....	35
Figura 17: Box-Plot de mediana com a comparação da freqüência comportamental de CAT para machos e fêmeas por fase do experimento TUBO. As fêmeas apresentaram maiores freqüências que os machos na FASE I* e na FASE III*. ....	35
Figura 18: Box-Plot de mediana com a comparação da freqüência comportamental de MARC para machos e fêmeas por fase do experimento TUBO, com as fêmeas apresentando maiores freqüências que os machos na FASE I. ....	36
Figura 19: Box-Plot de mediana da freqüência comportamental de ALER para machos nas três fases do enriquecimento BARREIRA. A FASE I* apresentou maior freqüência que as na FASE II e FASE III; e FASE III** com maior freqüência quando comparada a FASE II. ....	37
Figura 20: Box-Plot de mediana da freqüência comportamental de CAT para machos nas três fases do enriquecimento BARREIRA. FASE II* com maior freqüência que na FASE I; e FASE III** com maior freqüência quando comparada a FASE I e FASE II.....	38
Figura 21: Box-Plot de mediana da freqüência comportamental de CAIXA para machos nas três fases do enriquecimento BARREIRA. FASE II* com maior freqüência que as FASES I e FASE III; e FASE III** com maior freqüência quando comparada a FASE I. ....	38
Figura 22: Box-Plot de mediana da freqüência comportamental de ALER para fêmeas nas três fases do enriquecimento BARREIRA. A FASE III* apresentou menos ALER do que as FASES I e II. ....	39

Figura 23: Box-Plot de mediana da freqüência comportamental de CAT para fêmeas nas três fases do enriquecimento BARREIRA. Este comportamento foi mais exibido na FASE III* do que nas FASES I e FASE II.....	39
Figura 24: Box-Plot de mediana da freqüência comportamental de CAIXA para fêmeas nas três fases do enriquecimento BARREIRA. A FASE I* apresentou menor freqüência de CAIXA que as FASES II e FASE III; e a FASE III** apresentou maior freqüência quando comparada a FASE II.....	40
Figura 25: Box-Plot de mediana com a comparação da freqüência comportamental de ALER para machos e fêmeas por fase do experimento BARREIRA. Machos apresentando maiores freqüências que as fêmeas nas FASES I* e III*.....	40
Figura 26: Box-Plot de mediana com a comparação da freqüência comportamental de CAT para machos e fêmeas por fase do experimento BARREIRA. AS fêmeas apresentaram maiores freqüências que os machos nas FASES I* e III*.....	41
Figura 27: Box-Plot de mediana com a comparação da freqüência comportamental de MARC para machos e fêmeas por fase do experimento BARREIRA. Fêmeas apresentando maiores freqüências que os machos na FASE II*.....	41
Figura 28: Box-Plot de mediana com os valores de cortisol para fêmeas nas três fases do enriquecimento BARREIRA. A FASE II* apresentou-se menor que nas FASES I e FASE III.....	42
Figura 29: Box-Plot de mediana com a comparação dos valores de cortisol entre machos e fêmeas no enriquecimento BARREIRA. Machos apresentando maior valor do cortisol que as fêmeas na FASE II.....	42

## Lista de Quadros

Quadro 1: Siglas utilizadas para nomear as categorias comportamentais utilizadas durante o estudo e sua descrição. ....	28
Quadro 2: Resultados estatisticamente significativos obtidos no experimento TUBO. Os resultados estatisticamente significativos representando as maiores frequências estão apresentados em fonte maior e sublinhados.....	36
Quadro 3: Resultados estatisticamente significativos obtidos no experimento BARREIRA. Os resultados estatisticamente significativos representando as maiores frequências estão apresentados em fonte maior e sublinhados seguidos pelos resultados que estão em negrito. ....	43

## Sumário

1.	Introdução .....	14
2.	Revisão de literatura .....	16
2.1.	A espécie .....	16
2.2.	Cativeiro e Enriquecimento Ambiental .....	18
2.3.	Estresse e Cortisol .....	20
3.	Material e Métodos .....	22
3.1.	Animais .....	22
3.2.	Enriquecimento Ambiental .....	25
a.	Enriquecimento Alimentar - TUBO .....	25
b.	Isolamento Visual – BARREIRA .....	26
3.3.	Observações Comportamentais .....	27
3.4.	Coleta de fezes e dosagem hormonal .....	29
3.5.	Análise Estatística .....	31
4.	Resultados .....	32
4.1.	Enriquecimento alimentar - TUBO .....	32
4.2.	Isolamento Visual - BARREIRA .....	37
5.	Discussão .....	44
5.1.	Enriquecimento alimentar .....	44
5.2.	Enriquecimento social .....	46
6.	Considerações finais .....	49
7.	Referências .....	50

## 1. Introdução

Primatas não humanos são usados freqüentemente em certas áreas da pesquisa biomédica, pois são filogeneticamente muito próximos aos humanos (Carlsson *et al.*, 2004 e Ferrari, 2003). Os primatas do gênero *Callithrix*, pequenos primatas neotropicais popularmente conhecidos como “micos” ou “sagüis”, vêm assumindo grande importância biomédica e em estudos de comportamento animal (Bjonet *et al.*, 2006; Barbosa e da Silva Mota, 2009). Em virtude de seu status taxonômico, senciência e seu relativo longo período de reprodução em cativeiro, os primatas não humanos apresentam desafios éticos e práticos para serem usados como modelos em experimentação (Carlsson *et al.*, 2004). Estes desafios incluem as condições de seu cativeiro e os potenciais fatores da experimentação que podem acarretar dor, injúria e estresse (Vitale e Manciooco, 2004).

Quando um animal é forçado a viver em cativeiro há o risco de que não venha a expressar parte de seus comportamentos naturais devido às limitações de movimento e à restrição do espaço (Estevez e Christman, 2006) e devido à perda do seu sistema de organização social (Yamamoto, 1991). Neste aspecto de mudanças sociais e ambientais, machos e fêmeas se apresentam responsivamente diferentes (Yamamoto, 2004 e Sousa, 2009).

Para se adaptar às condições de cativeiro, o animal apresenta um conjunto de respostas comportamentais e fisiológicas em resposta aos desafios que o rodeiam, envolvendo mecanismos adaptativos regulados pelos sistemas nervoso e endócrino às agressões exteriores (Queyras e Carosi, 2004; Broom, 2006; Morgan e Tromborg, 2007). Tais respostas apresentam variações entre machos e fêmeas e de acordo com o ambiente.

A fim de minimizar os danos provocados à homeostase do indivíduo e aumentar o seu bem-estar, Carlstead e Shepherdson (1994) propõem o uso de técnicas de enriquecimento ambiental. Estas minimizam consideravelmente o tédio e a depressão causados pelo cativeiro ao criar um ambiente complexo que permite ao animal apresentar um comportamento natural.

Trabalhos recentes demonstram que o bem-estar de animais mantidos em cativeiro correlaciona-se com os níveis do hormônio cortisol, presentes em amostras de sangue, saliva e fezes (Boinski *et al.* 1999; Abbott *et al.* 2003a). Segundo (Bahr *et al.* 2000), a avaliação da

fisiologia do estresse de um animal é essencial para entender e melhorar o bem-estar e a reprodução de primatas em cativeiro. Desta forma, pesquisas que avaliem o bem-estar animal através do estudo do comportamento associado com medições do nível de cortisol e técnicas de enriquecimento ambiental podem oferecer um bom diagnóstico sobre a situação dos animais cativos. O que se buscou fazer neste trabalho foi avaliar a influência de técnicas de enriquecimento ambiental no bem-estar de sagüis de tufo preto (*Callithrix penicillata*) através do estudo comportamental e da análise dos níveis fecais de cortisol.



## 2. Revisão de literatura

### 2.1. A espécie

O Gênero *Callithrix* faz parte da família Callitrichidae, ordem Primata, classe Mammalia, Filo Chordata. A espécie *Callithrix penicillata* é nativa dos estados da Bahia e Espírito Santo e introduzida em Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Tocantins, habitante de matas de galeria e fragmentos de mata no cerrado brasileiro (Figura 1) (Rylands e Mendes 2008). Assim como outros calitriquídeos, *C. penicillata* mostra preferência por vegetação secundária e matas com influências antrópicas (da Fonseca e Lacher Jr. 1984; Rylands e Faria 1993).



Figura 1: Mapa de distribuição da espécie *Callithrix penicillata* no Brasil. (Fonte: Modificado de IUCN)

A espécie está entre os menores primatas do Novo Mundo. Seus indivíduos possuem garras modificadas em unhas nos dedos, apresentam dois em vez de três molares na dentição e geralmente nascem gêmeos a cada parto. A alimentação é a base exudatos vegetais (goma de árvore), frutas, insetos, e ovos de pequenos vertebrados e possuem adaptações morfológicas – mandíbulas em forma de V com longos dentes incisivos e caninos curtos (Bennet *et al.*, 1995)- e comportamentais para rasparem troncos e galhos de árvores e obterem seus exudatos. (Rylands 1984; Rylands e Faria 1993).

O sistema de organização social de calitriquídeos não é inteiramente compreendido. Na natureza vivem em grandes grupos familiares com cerca de 15 indivíduos, nos quais geralmente há apenas uma fêmea reprodutora. Nos grupos sociais há um sistema cooperativo de cuidado dos filhotes caracterizado pela permanência da prole junto ao grupo familiar, a qual auxilia no cuidado dos filhotes mais jovens. No entanto, ele tem sido postulado como monogâmico (monogamia tipo II, (Kleiman, 1977)) em cativeiro, pois: 1- apresentam pequeno dimorfismo sexual, comportamental e fisiológico; 2- existe apenas uma fêmea reprodutora em cada grupo; 3- formam pares exclusivos; 4- apresentam hostilidade a adultos do mesmo sexo quando colocados em um mesmo grupo; 5- exibem cuidado parental por parte do pai; 6- ocorre permanência dos filhotes junto aos pais mesmo após a maturidade sexual ajudando no cuidado de outros filhotes (Yamamoto e Araújo, 1991).

O comportamento social de calitriquídeos apresenta um incomum balanço entre comportamentos altamente cooperativos e comportamentos de intensa competição (Porter e Garber, 2009). As fêmeas se mostram muito competitivas em relação ao posto reprodutivo do grupo enquanto os machos se mostram mais cooperativos, como por exemplo, auxiliam no cuidado parental. Sousa *et al.* (2009) demonstram que machos de sagüis permanecem por mais tempo nos grupos e são mais cooperativos entre eles do que as fêmeas. Como consequência, estes dados indicam que fêmeas emigram mais freqüentemente que machos e lidam melhor com o estresse do isolamento social que ocorre durante este período.

Os calitriquídeos possuem rico repertório de comportamentos de comunicação que auxilia na transmissão de informações dos indivíduos com seu grupo e outros grupos. A comunicação química através da marcação de cheiro é um dos importantes aspectos comportamentais sociais e sexuais. Este comportamento aumenta quando os animais estão expostos a animais não aparentados. Os indivíduos possuem glândulas especializadas

encontradas na região anogenital e, às vezes, na região facial, as quais produzem uma secreção oleosa que é misturada à urina durante a marcação. Esta secreção contém informações da espécie, do indivíduo, assim como status reprodutivo, rank social, idade e também servem para auxiliar na supressão reprodutiva das fêmeas subordinadas (French e Fite, 2005).

Em adição a essa importante característica social os sagüis também possuem um rico repertório vocal que é usado em uma ampla variedade de situações incluindo a coesão dentro do grupo e a manutenção do território. Essas vocalizações também são conhecidas como assinaturas individuais com características peculiares que podem ser utilizadas para identificar cada indivíduo de um grupo (Rukstalis e French, 2005).

## **2.2. Cativeiro e Enriquecimento Ambiental**

O cativeiro ideal para a manutenção de calitriquídeos deve promover a boa saúde física, permitir o sucesso na reprodução e o cuidado da prole, e facilitar o desenvolvimento de habilidades que o animal necessitaria para sobreviver na natureza. Contudo não existem especificações claras sobre o tamanho ótimo e o quão deve ser enriquecido para promover comportamentos naturais. Para Rennie e Buchanan-Smith (2006) o principal item de um recinto para a espécie são poleiros de galhos de árvores que os animais poderão escalar, correr, pular, marcar e roer, e prateleiras altas para que os animais possam olhar os cuidadores do alto.

O grupo familiar de *Callithrix* dorme junto, portanto é importante ter uma caixa que sirva de ninho, preferencialmente colocada na parte superior da gaiola (Stevenson, 1975). O piso da gaiola deve ser forrado com serragem ou papel picado fazendo com que o piso fique acolchoado e estimule o forrageio dos animais quando há comida caída no chão. A comida e a água devem estar disponíveis em uma parte mais alta da gaiola numa plataforma para alimentação ou em vasilhas que previnam a contaminação com fezes e urina (Sodaro, 1999).

Como os calitriquídeos são bastante territoriais em várias circunstâncias, o contato visual e auditivo deve ser limitado entre os grupos. Quando vários grupos são alojados próximos uns aos outros ou quando há superlotação nas gaiolas há um aumento de comportamentos agonísticos. Portanto a exposição permanente a indivíduos não

aparentados pode causar abortos e morte dos filhotes. É recomendado então o uso de barreiras visuais e em alguns casos barreiras sonoras para prevenir exibições comportamentais agonísticas entre os grupos (Kleiman *et al.*, 1982).

À luz da importância da marcação de cheiro no comportamento social e sexual das espécies do gênero *Callithrix*, sugere-se ainda que as práticas de higienização mantenham intactos os substratos utilizados na marcação (Young e Carroll 1993). Sendo assim o animal terá certo controle sobre seu ambiente e não haverá a necessidade de deixar a sua marca cada vez que seu recinto for higienizado.

O enriquecimento ambiental é um processo que cria um ambiente interativo e complexo permitindo ao animal, mantido em cativeiro, apresentar um comportamento natural para a espécie (Carlstead e Shepherdson, 1994). Desta forma, busca melhorar a qualidade do cuidado a animais cativos pelo uso de estímulos ambientais necessários para o bem-estar psicológico e fisiológico, adequar o manejo a padrões éticos aceitáveis e incrementar a taxa reprodutiva (Boere, 2001).

De acordo com o conceito de melhoria do ambiente proposto por Buchanan-Smith *et al.* (2005), a melhoria das condições de vida de um animal em cativeiro deve significar não apenas a diminuição de dor, estresse e outros eventos aversivos, mas também a constante procura em maximizar o bem-estar.

Itens de enriquecimento ambiental devem ser oferecidos regularmente para os animais fazendo parte da rotina de manejo. Uma das formas mais comuns de enriquecimento ambiental é o aumento do tempo de alimentação através da indução de comportamentos de forrageio (Young, 2003). Esta indução pode ser através da diversificação dos itens oferecidos na dieta (Roberts *et al.* 1999), modificação na disposição da vasilha de comida (Buchanan-Smith *et al.*, 2002) e também através da alternância do modo como os recursos alimentares são oferecidos (Bjonet *et al.* 2006).

Experimentos usando desafios na obtenção de comida têm mostrado em várias espécies de diferentes gêneros de primatas – incluindo *C. penicillata*, que fêmeas adultas são mais bem sucedidas que os outros membros do grupo na obtenção de comida (Yamamoto *et al.*, 2004), indicando uma possível diferença entre sexos na interação com o enriquecimento.

Para Boere (2001) modificações estruturais, mudanças nas rotinas diárias e a socialização entre os animais e os cuidadores são suficientes para melhorar o estado psicológico dos animais e promover o bem-estar de uma colônia de primatas.

A quantidade de espaço disponível é menos importante que a quantidade de espaço utilizável. Apenas ter o espaço pode ser menos valioso porque o animal pode não estar apto para utilizá-lo ou haver algum impedimento para isso (Kitchen e Martin, 1996). Pines (2007) verificou em seu estudo que primatas gastam mais tempo em espaços abertos (outdoor) do que em espaços fechados (indoor) quando os dois tipos de locação estão disponíveis. Porém um ambiente com várias opções de interação com diversos substratos pode compensar a ausência do estímulo do ambiente externo.

### **2.3. Estresse e Cortisol**

O estresse é parte da vida de todos os animais e não necessariamente é prejudicial; qualquer estímulo externo que ameace a homeostase pode ser considerado estressante (Moberg, 2000). O estresse passa a se tornar prejudicial a partir do momento que o animal fica impossibilitado de retomar a sua homeostase. Isto acontece de acordo com a intensidade e a duração fator estressante. Estes estímulos podem causar o estresse físico, como a dor, e o estresse psicológico, como o medo, desencadeando respostas endócrinas e neurais (Abbott, 2003b).

Estudos em primatas de vida livre ou cativos têm mostrado que o estresse pode suprimir a libido, a secreção de testosterona e a espermatogênese em machos e, nas fêmeas, pode alterar a função ovariana, o desenvolvimento embrionário e a sobrevivência dos filhotes (Bahr, 2000). Fora os efeitos na reprodução o estresse pode causar distúrbios fisiológicos como a hipertensão, imunodeficiência e o aumento na susceptibilidade a doenças.

Por causa das conseqüências patológicas do estresse prolongado, dá-se atenção às respostas individuais nos padrões de secreção hormonal. Para Honess e Marin (2006) machos e fêmeas da mesma espécie possuem mecanismos diferentes para lidar com o estresse de forma que tal diferença auxilia no aumento do sucesso reprodutivo.

O principal hormônio secretado em resposta ao estresse é o glicocorticóide cortisol (Figura 2). O efeito metabólico mais bem conhecido do cortisol e de outros glicocorticóides sobre o metabolismo é estimular a gliconeogênese pelo fígado, aumentando quase sempre a velocidade da formação de carboidratos por até 6 a 10 vezes. Um dos principais efeitos

quando este hormônio está em excesso no organismo consiste em reduzir as reservas protéicas de praticamente todas as células corporais, à exceção das células hepáticas, para conversão em carboidratos. Por isso, na presença de níveis elevados de cortisol, os músculos podem ficar tão fracos a ponto de o indivíduo ser incapaz de se levantar da posição agachada (Guyton e Hall, 2006).

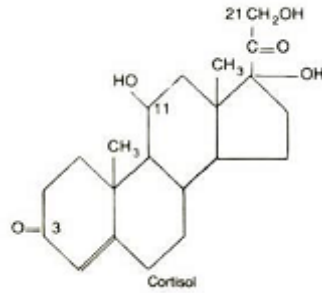


Figura 2: Estrutura molecular do cortisol (Fonte: Guyton e Hall, 2006)

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Animais

Para a realização do presente trabalho foram utilizados doze indivíduos adultos, sendo seis machos e seis fêmeas de *C. penicillata* pertencentes à colônia mantida pelo Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

Todos os animais estavam em gaiolas de mesmo tamanho (48 cm altura x 76 cm largura x 63 cm profundidade), com caixa ninho (18 cm altura x 27cm largura x 18cm profundidade), água à vontade e com a alimentação oferecida rotineiramente pelos funcionários do Centro. As gaiolas estavam 25 cm distantes lateralmente e 150 cm de frente, de modo que esta distância permitia que os animais enxergassem os indivíduos do sexo oposto que estavam a sua frente. Em cada lado da sala tinham seis gaiolas, sendo todos os machos de um lado e do outro as fêmeas (Figura 3). A alimentação diária era oferecida aos animais da seguinte forma: 9:00 às 13:30 h – 2 bananas por indivíduo e /ou leite batido com farinha láctea, ovos e legumes; 14:00 às 8:00 h do dia seguinte – ração e bananas (2 ou 3 por indivíduo). A Figura 4 (de A a F) apresenta as fêmeas utilizadas neste trabalho e a Figura 5 (de A a F), os machos.



Figura 3: Sala onde estavam alojados os 6 machos e 6 fêmeas estudados, pertencentes à colônia do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR/UFJF)





Figura 4: Fêmeas de *Callithrix penicillata* utilizadas durante o experimento A- F05A, B- F21, C- F05B, D- F14, E- AM99 E F- FDO, pertencentes à colônia do Centro de Biologia da Reprodução - UFJF



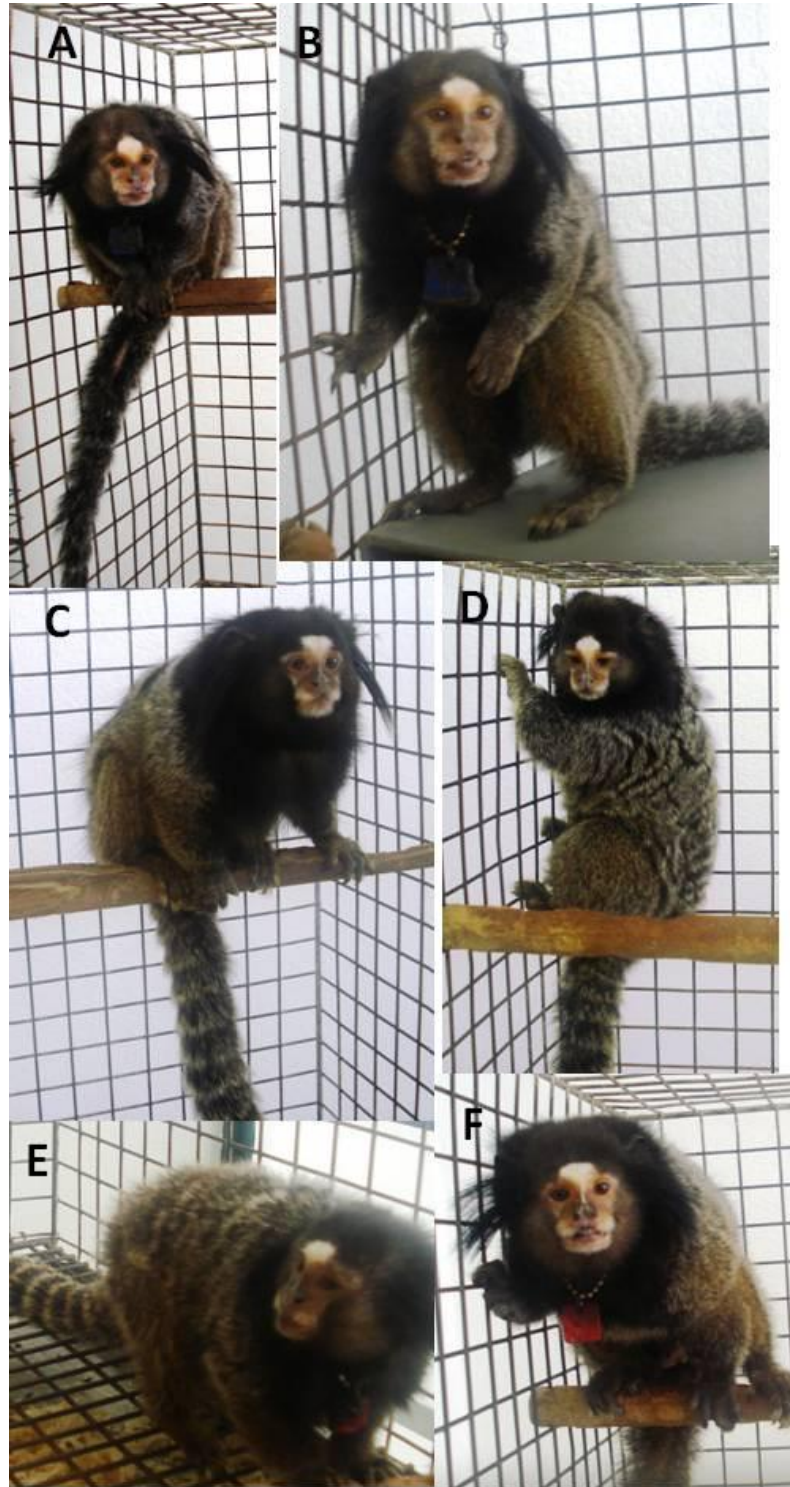


Figura 5: Machos de *Callithrix penicillata* utilizados durante o experimento A- AZ91, B- AZ76, C- AZ96, D- V94, E- V88 E F- V97, pertencentes a colônia do Centro de Biologia da Reprodução – UFJF

### 3.2. Enriquecimento Ambiental

Neste trabalho foram aplicadas duas técnicas diferentes no grupo amostral, uma de enriquecimento ambiental do tipo alimentar e outra de isolamento visual. Cada técnica foi aplicada três vezes, aleatoriamente, intercalando com a outra. As técnicas possuíam 3 fases e dada uma destas fases era realizada em 5 dias consecutivos. O experimento então ficou montado de acordo com a Figura 6. As técnicas utilizadas estão descritas a seguir.

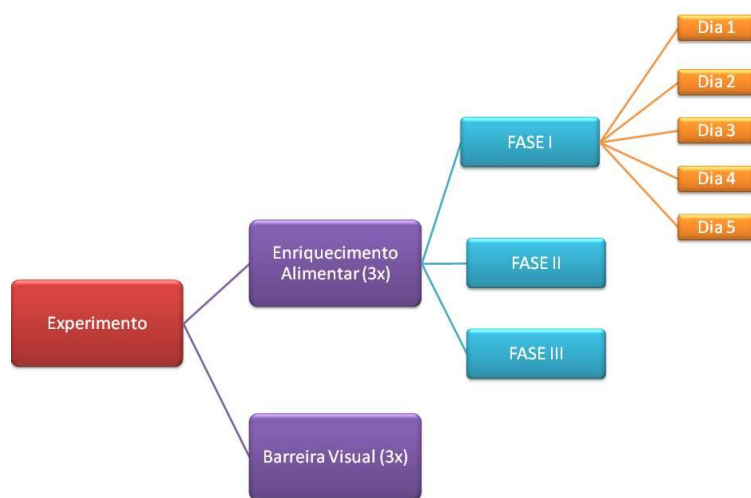


Figura 6: Detalhamento da sequência de atividades do experimento.

#### a. Enriquecimento Alimentar - TUBO

O enriquecimento alimentar utilizado neste trabalho foi composto por um tubo de papelão (rolo de papel higiênico) contendo em seu interior fubá cozido em água e balas de goma (Figura 7).

O tubo foi preso à parede lateral da gaiola por um palito de madeira transpassado entre o tubo e a gaiola. Em cada um dos quatro dias de observação da Fase II foi disponibilizado aos animais um tubo por indivíduo. O tubo permaneceu na gaiola por 24 horas, sendo trocado durante todos os dias da semana.



Figura 7: A- Interação de um indivíduo com o com o enriquecimento - TUBO, B- Vista frontal do TUBO preso a gaiola com marcas da interação dos animais e C- Vista lateral do TUBO com marcas de unhas e dentes.

#### b. Isolamento Visual – BARREIRA

Com a finalidade de impedir a visibilidade entres os animais do mesmo sexo, alojados lado a lado, foi colocada uma placa de papelão do lado de fora de uma das laterais da gaiola (Figura 8). A placa de papelão possuía a mesma medida que a lateral da gaiola e foi fixado com barbante nas extremidades para que permanecesse assim durante toda a FASE II do experimento. Para a análise dos resultados, a FASE II foi considerada como separação dos grupos e a retirada da placa (FASE III) foi considerada como reunião dos mesmos.

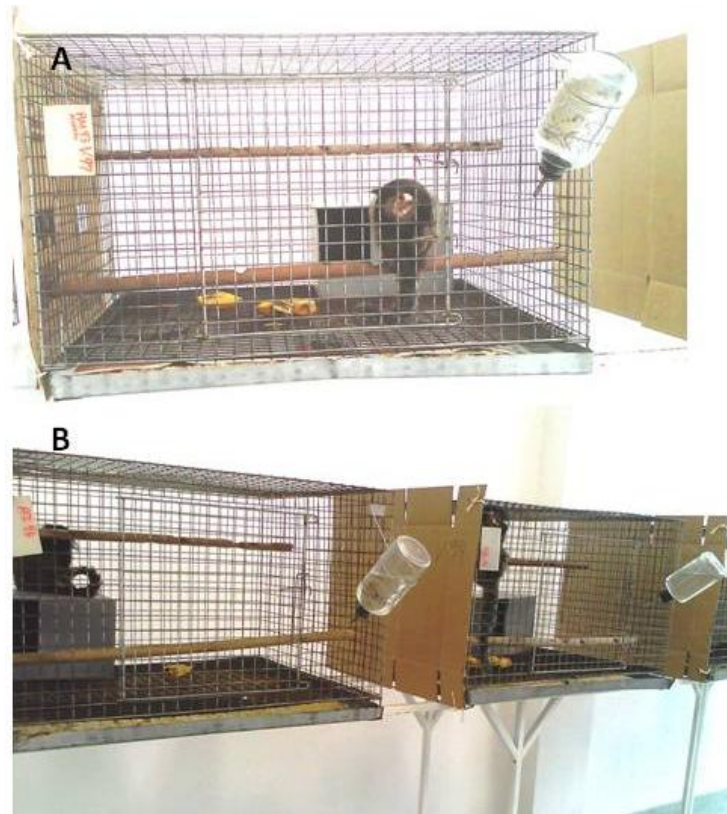


Figura 8: A- Vista frontal de uma gaiola com o isolamento visual BARREIRA e B- Vista lateral parcial das gaiolas com a BARREIRA mostrando o isolamento dos animais com seus vizinhos laterais

### 3.3. Observações Comportamentais

As observações comportamentais durante o procedimento experimental foram realizadas em três fases: Antes (FASE I), Durante (FASE II) e Depois (FASE III) da aplicação do enriquecimento (Figura 9). Cada uma destas fases durou 1 semana, tendo sido feitas observações em quatro dias consecutivos (de segunda a quinta-feira) como mostra a Figura 10. As observações foram realizadas durante o período da manhã, com início entre 10:00 e 11:00 horas.

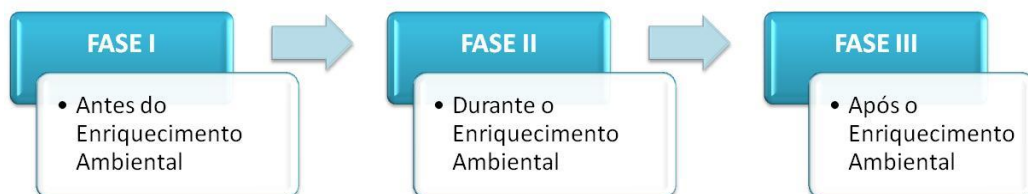
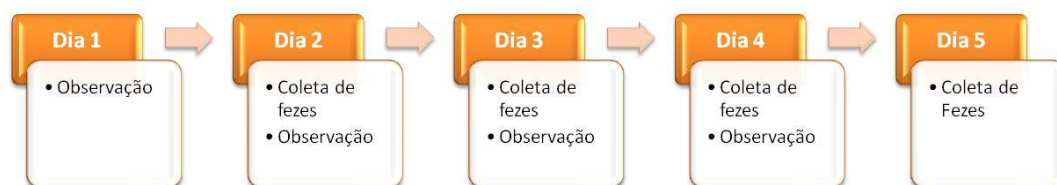


Figura 9: Sequência das FASES do experimento.



**Figura 10: Sequência dos dias e suas atividades de cada FASE do experimento.**

O método de observação utilizado foi o de scan (Altmann 1974), com registros instantâneos a cada intervalo de um minuto, durante uma hora em cada fase, totalizando 61 registros para cada indivíduo por dia, 244 por semana e 732 ao longo do experimento.

As categorias comportamentais observadas durante o estudo foram: o estado de alerta, a alimentação dos itens de dieta oferecida regularmente na rotina de manejo, quando o animal estava dentro da caixa-ninho, autocatção, a interação com o enriquecimento, comportamento relacionado à gomivoria e marcação de cheiro, e a movimentação. As siglas utilizadas para nomear cada uma dessas categorias estão apresentadas no Quadro 1.

**Quadro 1: Siglas utilizadas para nomear as categorias comportamentais utilizadas durante o estudo e sua descrição.**

<b>Comportamento</b>	<b>Descrição</b>
<b>ALER</b>	Animal parado em alerta
<b>ALIM</b>	Alimentando-se da dieta regularmente oferecida
<b>CAIXA</b>	Animal dentro da caixa ninho
<b>CAT</b>	Autocatção
<b>ENR</b>	Interagindo com o enriquecimento
<b>MARC</b>	Comportamento relacionado à gomivoria e marcação de cheiro
<b>MOV</b>	Movimentação

### 3.4. Coleta de fezes e dosagem hormonal

As amostras fecais foram coletadas de acordo com as fases de observação do comportamento, respeitando o intervalo necessário para que a resposta hormonal pudesse ser detectada nas fezes (Figura 10). Este intervalo de tempo corresponde a aproximadamente 12 horas após a intervenção realizada. Todas as coletas ocorreram no período entre 7:00 e 10:00 horas, pois segundo (Sousa *et al.* 2004), 100% dos indivíduos defecam neste horário.

Cada animal teve três amostras fecais coletadas em cada fase do estudo, totalizando desta forma 9 amostras por tipo de enriquecimento utilizado. Após a coleta, as amostras foram colocadas em saco plástico identificado e levadas ao freezer até o momento da análise laboratorial.

As análises hormonais foram feitas no Laboratório de Medidas Hormonais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Para tal foram descongelados os *pellets* fecais, homogeneizados e posteriormente uma amostra de 0,2 g +/- 0,005 foi pesada em tubos cônicos do tipo Falcon. Em seguida foi adicionado 2,0 ml de metanol à 80% aos tubos e estes ficaram por 30 minutos no vortex. Posteriormente a solução foi centrifugada à 3600 rpm à 25°C em centrífuga por 10 minutos. O sobrenadante foi passado para tubos tipo Eppendorf para a análise hormonal.

Após a extração dos esteróides fecais é utilizada a técnica imunoenzimática (ELISA) para determinação da concentração dos hormônios. A metodologia empregada seguiu o protocolo experimental desenvolvido por Munro & Stabenfeldt (1984) para dosagens de esteróides no sangue e posteriormente adaptada por Ziegler *et al.*, (1996) para determinações de esteróides nas fezes. Os dados da padronização analítica demonstram a existência de paralelismo ( $p < 0,05$ ) para o cortisol. O “pool” utilizado no teste de validação foi obtido a partir de amostras de fezes de fêmeas e de machos em diferentes condições reprodutivas. A curva padrão do hormônio analisado foi preparada a partir de cristais de hormônios obtidos da Sigma Chemical Co. Para a preparação da curva padrão foram utilizadas diferentes concentrações dos padrões, que incluíram aquelas provavelmente existentes nas amostras. As concentrações para obtenção da curva para o cortisol foi de (3,6 – 10,0 – 31,6 – 100,0 – 316,2 – 1000,0 pg / poço).



As placas para microtitulação de fundo plano (Nunc) para realização do ELISA foram previamente sensibilizadas com o anticorpo específico (AntiCortisol-3CMO-BSA, R4866), para o hormônio, segundo a metodologia descrita por Munro & Stabenfeldt (1984).

Após a retirada das amostras do refrigerador e agitação no vórtex por 10 segundos, transfere-se 100  $\mu$ L - cortisol para um tubo de ensaio e procede-se a análise conforme os seguintes passos:

- I. Os tubos de ensaio contendo as alíquotas da amostra são transferidos para um banho-maria com fluxo de ar, a 40°C, para secagem total do volume inicial.
- II. A seguir são adicionados aos resíduos 300  $\mu$ L de uma solução previamente preparada com enzima-conjugada ao hormônio (Horseradish Peroxidase-conjugada ou HRP-conjugada) e diluídas com tampão fosfato (pH = 7,0) na concentração de 1:16.000.
- III. Os tubos são agitados e seus conteúdos transportados para tubos de plásticos menores (1,6 mL).
- IV. Utilizando-se uma pipeta multi-canal (T-12; Eppendorf) são pipetados 100  $\mu$ L desse material para as placas (Nunc) que contém o anticorpo específico para o hormônio. São preenchidas todas as cavidades das placas com exceção das denominadas A1 a D1, C2 e C11 e de C3 a C10 para os quais são pipetadas respectivamente, apenas solução tampão (NSB), o tampão contendo a enzima-conjugada (B0) e as soluções padrão segundo as diluições já referidas.
- V. A seguir as placas são cobertas com filme adesivo e incubadas durante 2 horas em câmara de umidade (27 °C).
- VI. Após este tempo, as placas são retiradas da câmara e lavadas com uma solução de NaCl a 1,5M e Tween 20 a 0,5%.
- VII. Após este procedimento, é adicionado a cada cavidade da placa 100 $\mu$ L do substrato, constituído de uma solução preparada a partir de 25mL de tampão citrato (pH = 4,0) a 10% (ácido cítrico anidro C<sub>6</sub>H<sub>8</sub> O<sub>7</sub> – SIGMA), 250  $\mu$ L de ABTS (2,2-azino-bis 3 ethylbenthiazone-6-sulfonic acid / SIGMA) e 80  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio a 15% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
- VIII. As placas são incubadas por mais 30 minutos em câmara úmida e em seguida foram adicionados 100  $\mu$ L de uma solução ácida para interromper a reação. Esta solução é preparada a partir de 5,048 mL de ácido fluorídrico e 1,2 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 5N qsp 500mL de água destilada.
- IX. A leitura da densidade óptica (Absorbância) é feita utilizando-se uma Leitora de Placas Asys modelo Expert Plus com filtro de 405 nm.

A validação dos ensaios é realizada através do controle de três conjuntos de amostras fecais de fêmeas e de machos denominada de “pool” que passa pelo mesmo processo de extração como as demais amostras fecais. Assim temos: pool de macho, pool de fêmea e o terceiro pool de macho/fêmea. Essas amostras de controle são utilizadas no ensaio, usando um pool de concentração baixa e um pool de alta (de 4 a 5 vezes o volume do pool de baixa usado) e os resultados obtidos são analisados pelo coeficiente de variação (CV) que verifica a variabilidade dos valores médios encontrados em relação ao desvio padrão em torno da média.

A precisão e a confiabilidade dos ensaios foram assegurados pela determinação do CV do inter-ensaio (variação do pool em outras placas) e do intra-ensaio (variação do pool na mesma placa) pelo método de Rodbard (Leite, 2002). Neste trabalho o CV inter-ensaio foi de  $11,7 \pm 3,51$  e o intra-ensaio foi de  $3,22 \pm 0,22$ .

### **3.5. Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa XLSTAT-Pro 7.5 (versão de avaliação) e Bioestat 5.0. A diferença na exibição de cada categoria comportamental entre as FASES I, II e III pelos animais estudados foi comparada pelo teste de Friedman. Quando encontrada diferença significativa, aplicou-se o teste de Wilcoxon para identificar onde reside a diferença.

Para verificar a diferença comportamental e hormonal entre os gêneros foi utilizado o teste de Kruskal Wallis, *post-hoc* de Mann-Whitney.

Para todos os testes foi considerado o nível de significância de  $p \leq 0,05$ .



## 4. Resultados

### 4.1. Enriquecimento alimentar - TUBO

Entre as três fases da aplicação deste enriquecimento, os machos apresentaram diferenças significativas nos comportamentos ALER, MOV e CAT ( $Q=18.730$   $P<0.001$ ,  $Q=7.292$   $P=0.26$  e  $Q=10.015$   $P=0.026$ , respectivamente). Já as Fêmeas apresentaram diferença apenas em ALER e ALIM ( $Q=14.263$   $P=0.001$  e  $Q=15.918$   $P<0.001$ , respectivamente).

Nos machos, ALER apresentou maior frequência na FASE III quando comparada as duas outras fases do experimento ( $Z=-3.046$   $P=0.001$  FASE I e  $Z=-4.244$   $P<0.001$  FASE II). Além disso, a FASE I apresentou uma tendência a ser maior que a FASE II ( $Z=1.600$   $P=0.055$ ) (Figura 11).

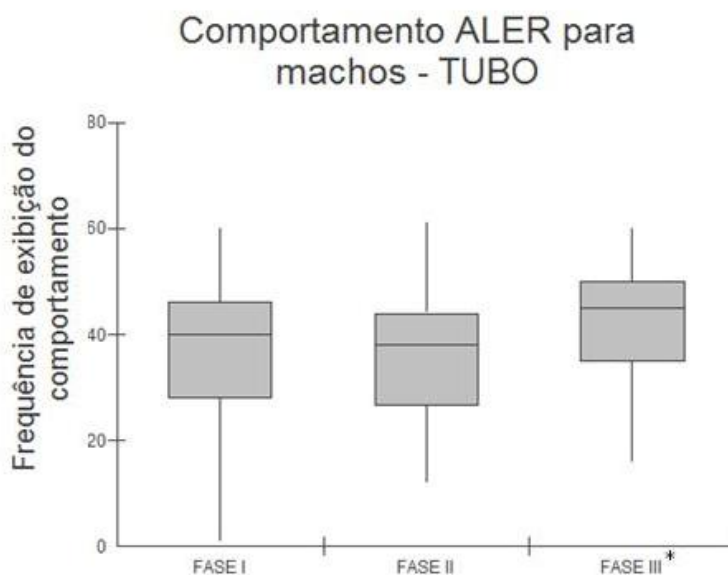
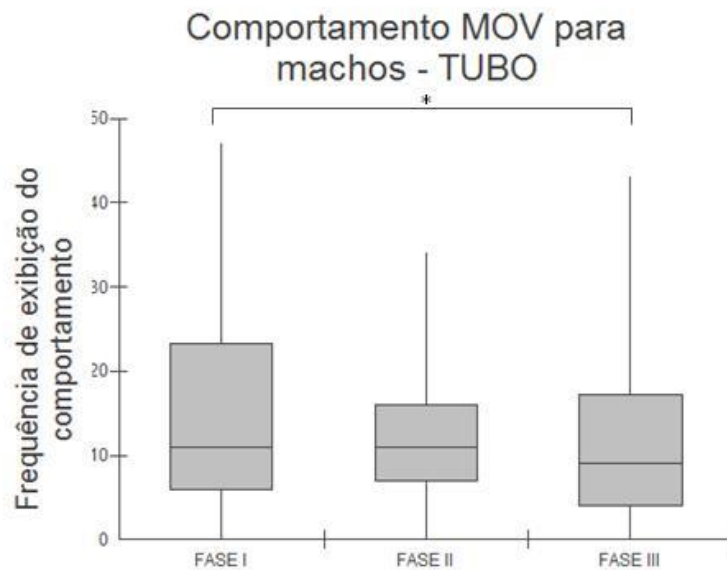


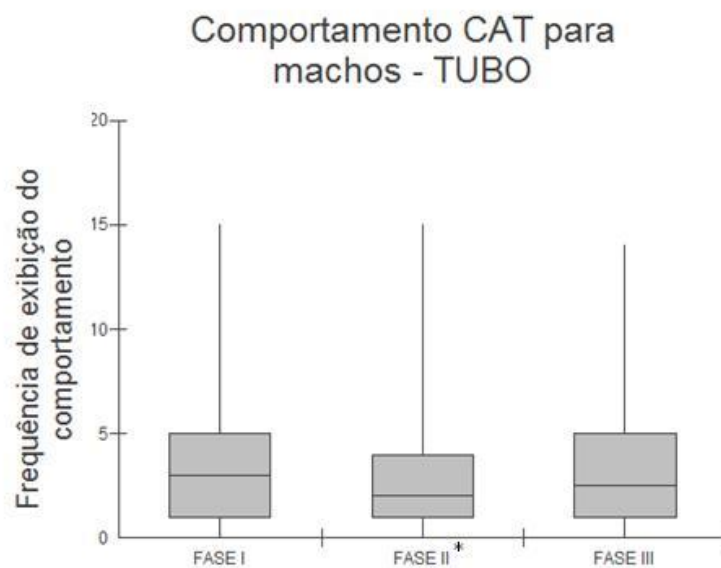
Figura 11: Box-Plot de mediana da frequência comportamental de ALER para machos nas três fases do enriquecimento TUBO. A FASE III\* apresentou maior frequência quando comparada as outras fases.

Quanto à movimentação dos machos (MOV), a diferença observada foi que na FASE I este comportamento foi maior do que na FASE III ( $Z=2.904$   $P=0.002$ ) (Figura 12).



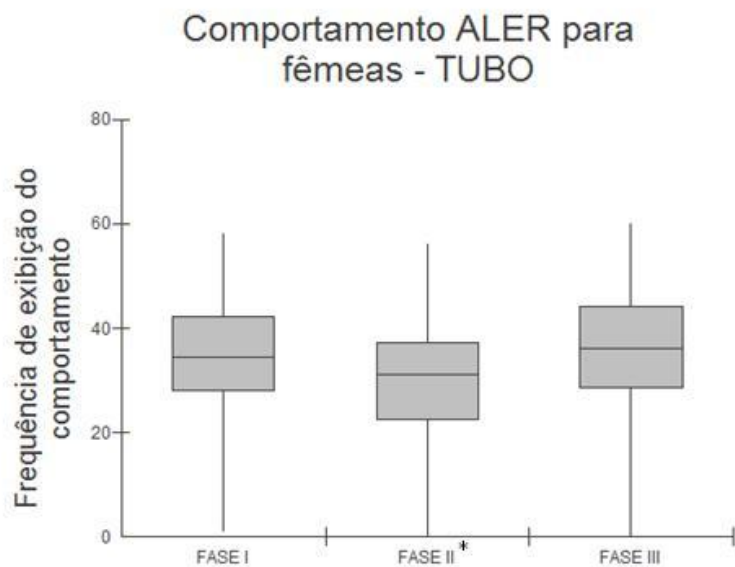
**Figura 12:** Box-Plot de mediana da frequência comportamental de MOV para machos nas três fases do enriquecimento TUBO. \* Na FASE I este comportamento foi significativamente maior do que na FASE III.

Para CAT, a frequência na FASE II foi menor quando comparada à FASE I e à FASE III ( $Z=2.803$   $P=0.003$  e  $Z=-2.065$   $P=0.019$ , respectivamente) (Figura 13).



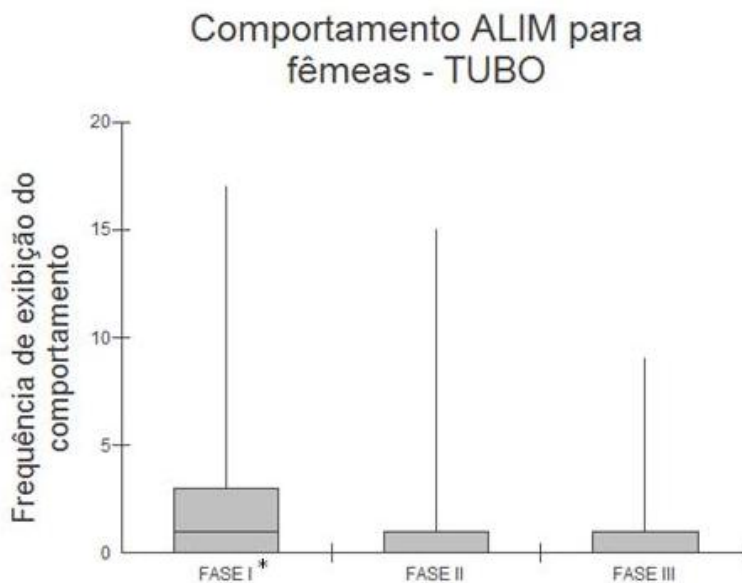
**Figura 13:** Box-Plot de mediana da frequência comportamental de CAT para machos nas três fases do enriquecimento TUBO. Na FASE II\*, CAT foi significativamente menor do que nas FASES I e III.

Com a exposição ao enriquecimento (FASE II), as fêmeas apresentaram menor frequência de ALER em relação à FASE I e à FASE III ( $Z=2.978$   $P=0.001$  e  $Z=-3.362$   $P<0.001$ , respectivamente) (Figura 14).



**Figura 14:** Box-Plot de mediana da frequência comportamental de ALER para fêmeas nas três fases do enriquecimento TUBO, tendo sido menor na FASE II\* em relação às outras duas fases.

Na FASE I elas se alimentaram mais da dieta oferecida regularmente (ALIM) do que na FASE II e na FASE III ( $Z=3.994$   $P<0.001$  e  $Z=3.204$   $P=0.001$ ) (Figura 15).



**Figura 15:** Box-Plot de mediana da frequência comportamental de ALIM para fêmeas nas três fases do enriquecimento TUBO. FASE I\* com maior frequência que na FASE II e FASE III.

No confronto de machos com fêmeas por etapa do experimento, observam-se diferenças em ALER, CAT, e MARC ( $H=31.306$   $P<0.001$ ,  $H=13.928$   $P=0.016$  e  $H=13.072$   $P=0.023$ , respectivamente).

Os machos apresentaram-se mais em estado de alerta (ALER) do que as fêmeas tanto durante a aplicação do enriquecimento (FASE II;  $Z=2.021$  e  $P=0.022$ ) quanto após sua retirada (FASE III;  $Z=3.131$   $P=0.001$ ) (Figura 16).

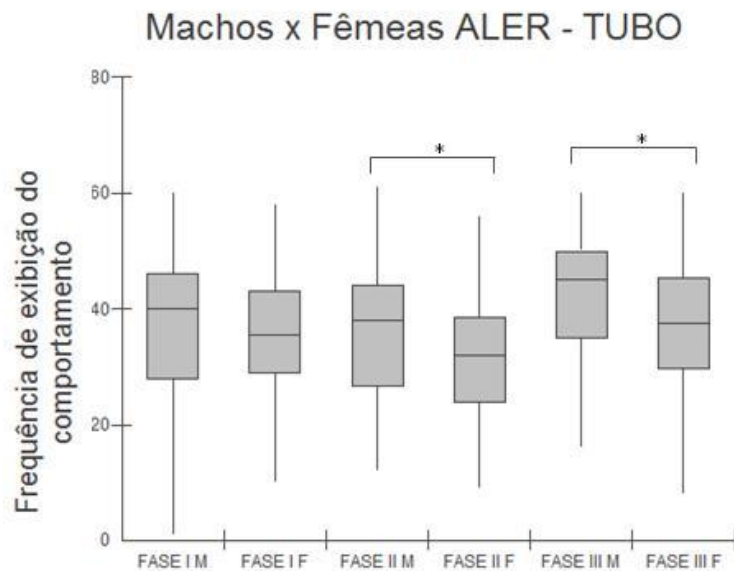


Figura 16: Box-Plot de mediana com a comparação da frequência comportamental de ALER para machos e fêmeas por fase do experimento. Os machos apresentaram frequências maiores do que as fêmeas nas FASES II\* e III\*.

Já as fêmeas apresentaram mais autocatção (CAT) que os machos antes (FASE I;  $Z=-1.667$   $P=0.048$ ) e depois (FASE III;  $Z=-1.943$   $P=0.026$ ) da aplicação do enriquecimento (Figura 17). O comportamento de gomivoria e marcação de cheiro (MARC) também foi maior nas fêmeas do que nos machos durante a FASE I ( $Z=-3.010$   $P=0.001$ ) (Figura 18).

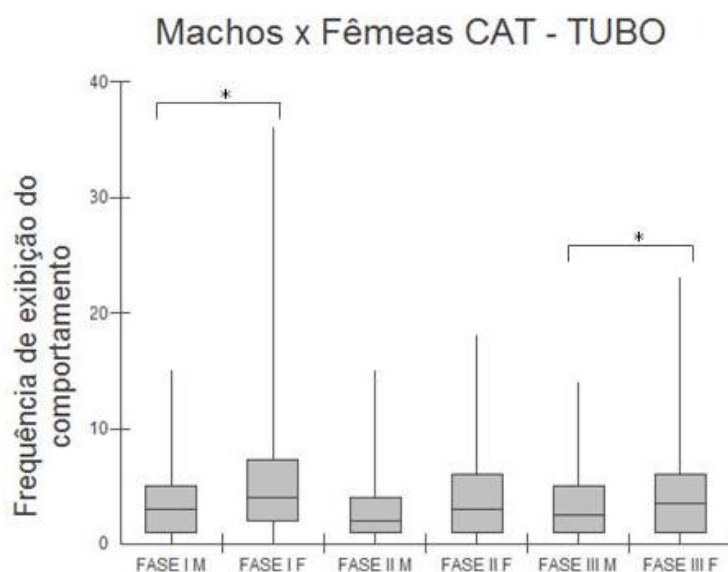
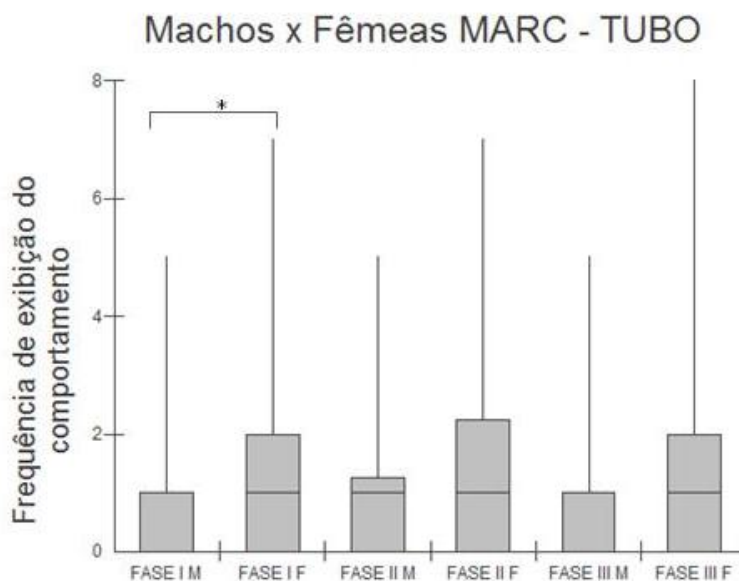


Figura 17: Box-Plot de mediana com a comparação da frequência comportamental de CAT para machos e fêmeas por fase do experimento TUBO. As fêmeas apresentaram maiores frequências que os machos na FASE I\* e na FASE III\*.



**Figura 18:** Box-Plot de mediana com a comparação da frequência comportamental de MARC para machos e fêmeas por fase do experimento TUBO, com as fêmeas apresentando maiores frequências que os machos na FASE I.

A comparação dos níveis de cortisol de machos e fêmeas entre as fases deste enriquecimento não sinalizou nenhum resultado estatisticamente significativo. O mesmo ocorreu para as comparações entre os sexos e para a correlação do cortisol com os comportamentos que apresentaram diferença significativa entre as fases do experimento.

Um resumo dos resultados encontrados nesta etapa do experimento utilizando o TUBO pode ser visualizado no Quadro 2.

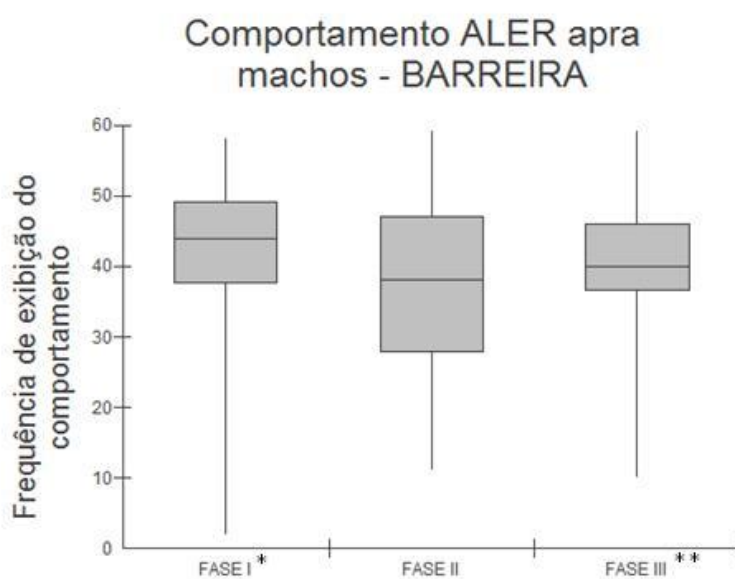
**Quadro 2:** Resultados estatisticamente significativos obtidos no experimento TUBO. Os resultados estatisticamente significativos representando as maiores frequências estão apresentados em fonte maior e sublinhados.

Comportamento	Machos	Fêmeas	Machos x Fêmeas
<b>ALER</b>	FASE I FASE II <u>FASE III</u>	<u>FASE I</u> FASE II <u>FASE III</u>	<u>FASE II</u> X FASE II <u>FASE III</u> X FASE III
<b>MOV</b>	<u>FASE I</u> FASE III		
<b>CAT</b>	<u>FASE I</u> FASE II <u>FASE III</u>		FASE I X <u>FASE I</u> FASE III X <u>FASE III</u>
<b>ALIM</b>		<u>FASE I</u> FASE II FASE III	
<b>MARC</b>			FASE I X <u>FASE I</u>

## 4.2. Isolamento Visual - BARREIRA

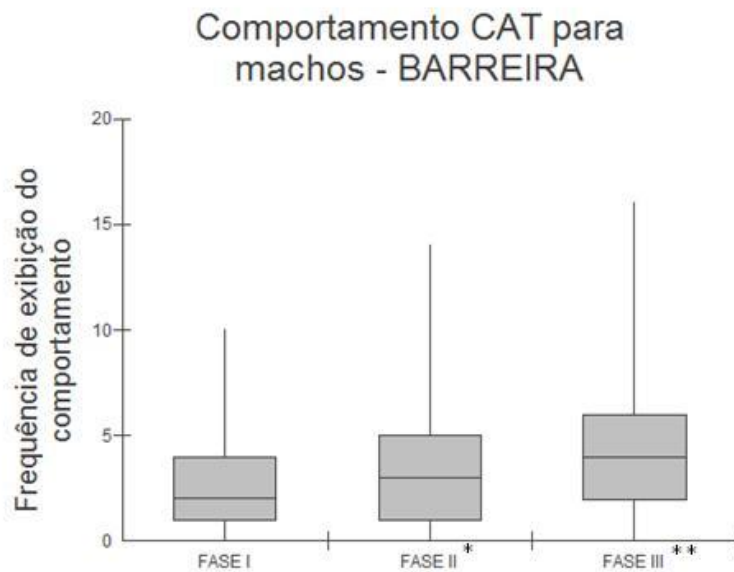
A resposta comportamental dos machos à barreira visual colocada entre suas gaiolas apresentou diferença nas categorias comportamentais ALER, CAT e CAIXA ( $Q=7.923$   $P=0.019$ ;  $Q=15.320$   $P<0.001$ ;  $Q=8.963$   $P=0.011$ , respectivamente).

A categoria ALER apresenta maior frequência na FASE I quando comparada com as FASES II e III ( $Z=2.478$   $P=0.007$  e  $Z=2.170$   $P=0.015$ ) e na FASE III quando comparado com a FASE II ( $Z=-1.651$   $P=0.049$ ) (Figura 19)



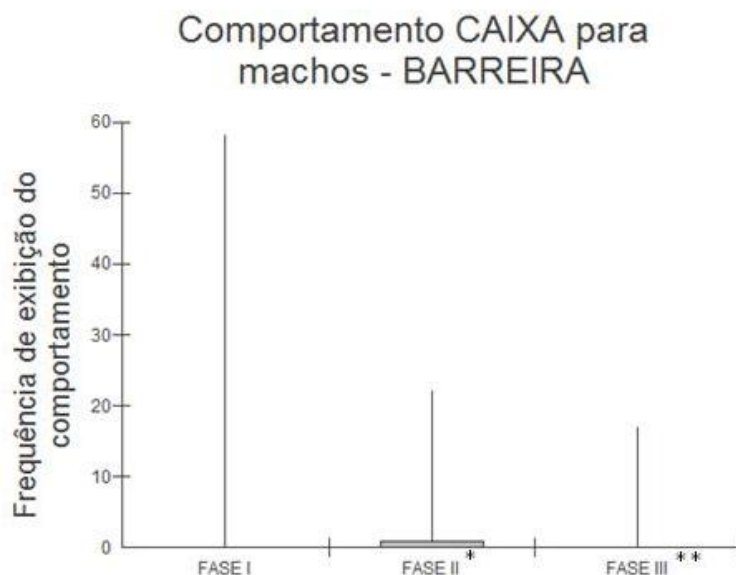
**Figura 19: Box-Plot de mediana da frequência comportamental de ALER para machos nas três fases do enriquecimento BARREIRA. A FASE I\* apresentou maior frequência que as na FASE II e FASE III; e FASE III\*\* com maior frequência quando comparada a FASE II.**

A autocatção, CAT, é maior na FASE II do que na FASE I ( $Z=-2.703$   $P=0.003$ ) e maior na FASE III do que nas FASES I e II ( $Z=-3.811$   $P<0.001$  e  $Z=-2.043$   $P=0.021$ ) (Figura 20).



**Figura 20:** Box-Plot de mediana da frequência comportamental de CAT para machos nas três fases do enriquecimento BARREIRA. FASE II\* com maior frequência que na FASE I; e FASE III\*\* com maior frequência quando comparada a FASE I e FASE II.

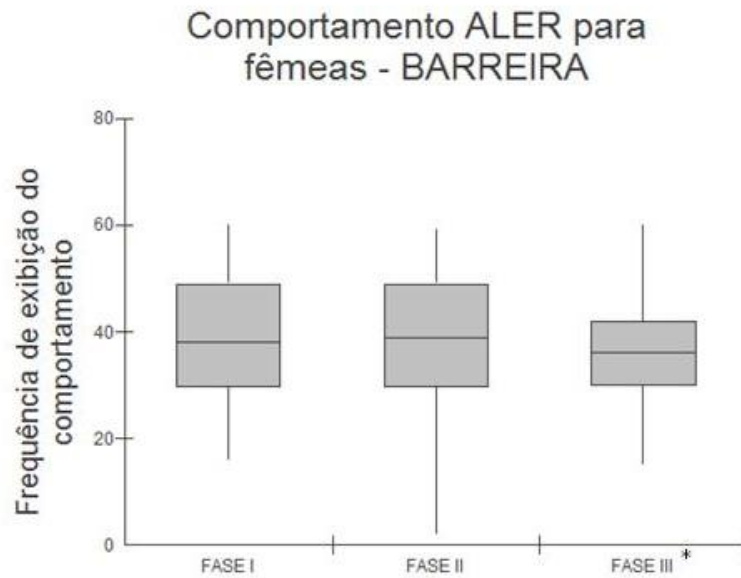
A frequência de exibição do comportamento CAIXA foi maior na FASE II quando comparada às FASES I e III ( $Z=-3.085$   $P=0.001$  e  $Z=1.713$   $P=0.043$ ) e maior na FASE III quando comparada a FASE I ( $Z=-1.921$   $P=0.027$ ) (Figura 21).



**Figura 21:** Box-Plot de mediana da frequência comportamental de CAIXA para machos nas três fases do enriquecimento BARREIRA. FASE II\* com maior frequência que as FASES I e FASE III; e FASE III\*\* com maior frequência quando comparada a FASE I.

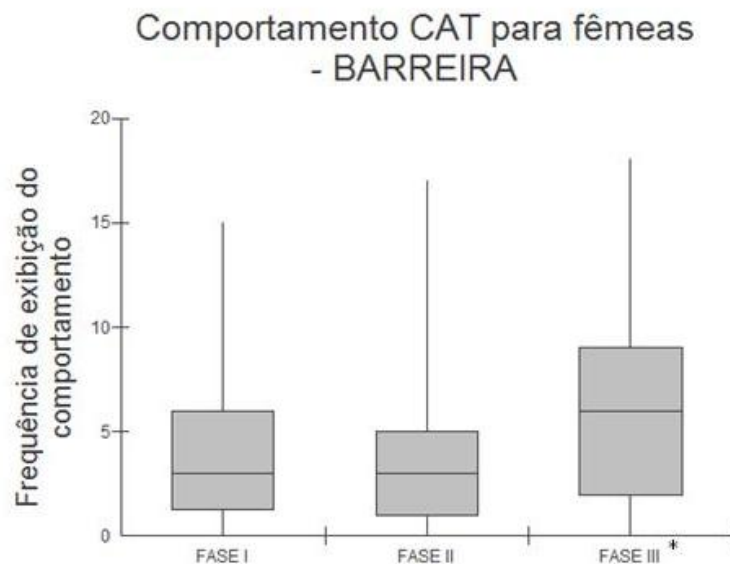
Assim como para os machos, as fêmeas apresentaram diferenças nas categorias ALER, CAT e CAIXA ( $Q=10.106$   $P=0.006$ ;  $Q=22.368$   $P<0.001$ ;  $Q=8.397$   $P=0.015$ ).

As fêmeas apresentaram-se menos paradas, em alerta (ALER), após a retirada do enriquecimento (FASE III) quando comparada às fases anteriores (FASE I;  $Z=1.869$   $P=0.029$ ; e FASE II;  $Z=2.109$   $P=0.017$ ) (Figura 22).



**Figura 22:** Box-Plot de mediana da frequência comportamental de ALER para fêmeas nas três fases do enriquecimento BARREIRA. A FASE III\* apresentou menos ALER do que as FASES I e II.

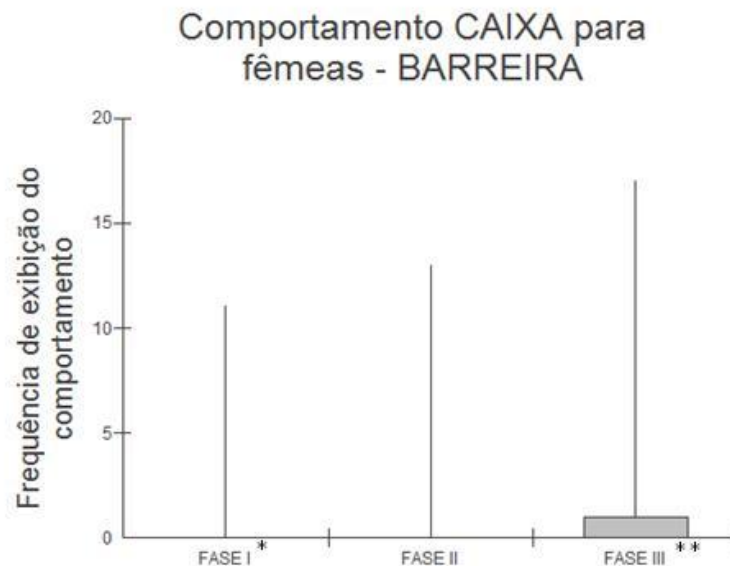
Já para CAT, as fêmeas apresentaram esse comportamento com maior frequência na FASE III do que nas FASES I e II ( $Z=-4.422$   $P<0.001$  e  $Z=-4.385$   $p<0.001$ ) (Figura 23).



**Figura 23:** Box-Plot de mediana da frequência comportamental de CAT para fêmeas nas três fases do enriquecimento BARREIRA. Este comportamento foi mais exibido na FASE III\* do que nas FASES I e FASE II.

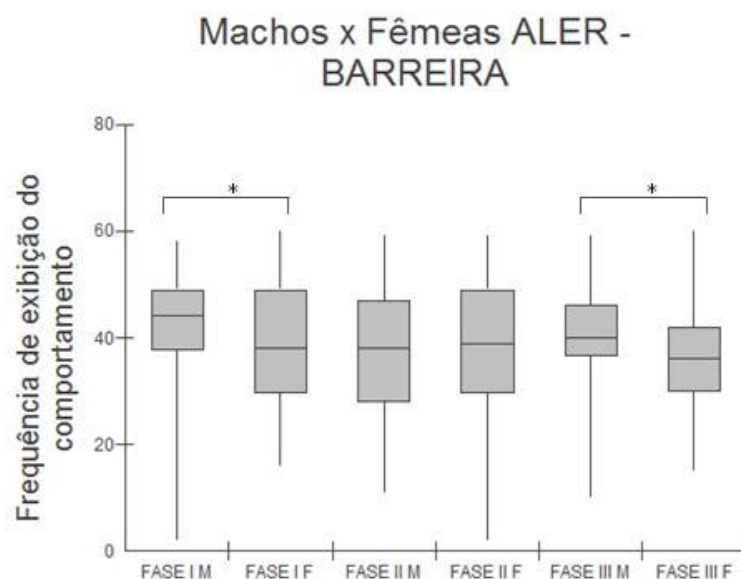


Para CAIXA, a freqüência de exibição pelas fêmeas foi menor na FASE I do que nas FASES II e III ( $Z=-1.708$   $P=0.044$  e  $Z=-2.673$   $P=0.004$ ) e maior na FASE III quando comparada a FASE II ( $Z=-1.807$   $P=0.035$ ) (Figura 24).



**Figura 24:** Box-Plot de mediana da freqüência comportamental de CAIXA para fêmeas nas três fases do enriquecimento BARREIRA. A FASE I\* apresentou menor freqüência de CAIXA que as FASES II e FASE III; e a FASE III\*\* apresentou maior freqüência quando comparada a FASE II.

Ao comparar machos e fêmeas por etapa do experimento pode ser visto que machos apresentam maior freqüência de ALER que fêmeas nas FASES I e III ( $Z=2.201$   $P=0.014$  e  $Z=2.566$   $P=0.005$ ) (Figura 25).



**Figura 25:** Box-Plot de mediana com a comparação da freqüência comportamental de ALER para machos e fêmeas por fase do experimento BARREIRA. Machos apresentando maiores freqüências que as fêmeas nas FASES I\* e III\*.

Já para CAT são as fêmeas que apresentam a maior frequência também nas FASES I e III ( $Z=-2.338$   $P=0.010$  e  $Z=-2.278$   $P=0.011$ ) (Figura 26).

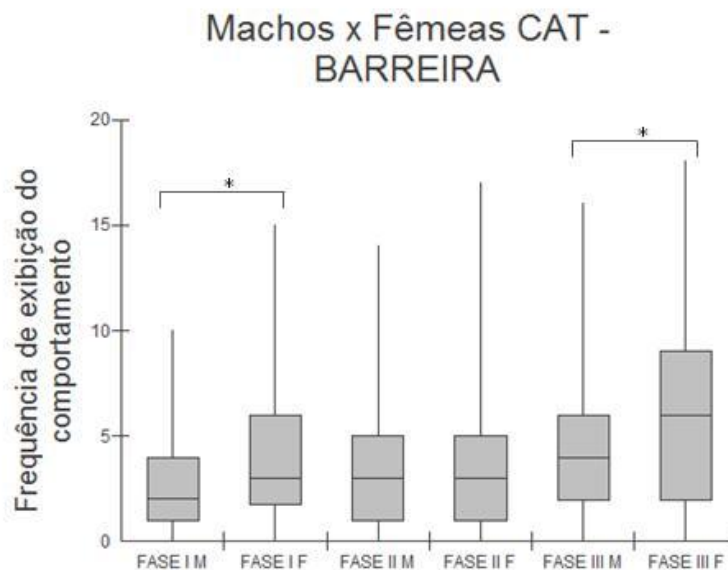


Figura 26: Box-Plot de mediana com a comparação da frequência comportamental de CAT para machos e fêmeas por fase do experimento BARREIRA. AS fêmeas apresentaram maiores frequências que os machos nas FASES I\* e III\*.

As fêmeas mostraram ainda maior frequência de exibição de MARC na FASE II ( $Z=-1.944$   $P=0.026$ ) do que os machos (Figura 27).

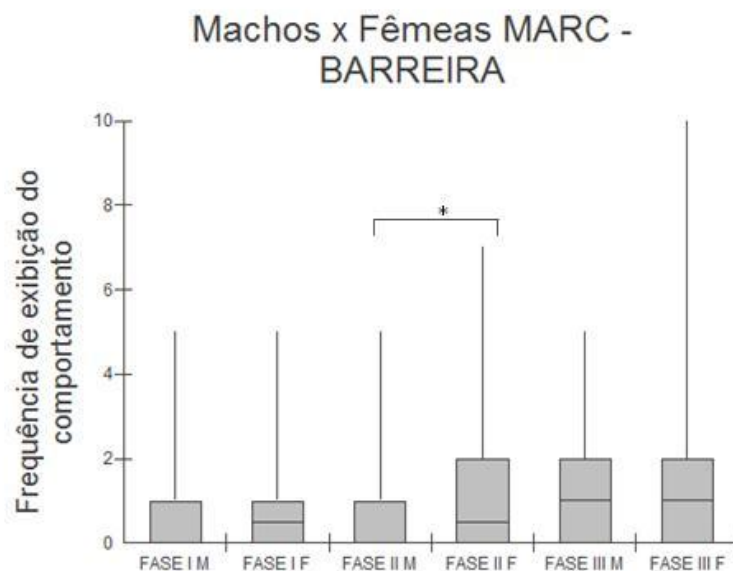


Figura 27: Box-Plot de mediana com a comparação da frequência comportamental de MARC para machos e fêmeas por fase do experimento BARREIRA. Fêmeas apresentando maiores frequências que os machos na FASE II\*.

Para os dados de cortisol, foi encontrada diferença significativa quando comparada as três fases do experimento para as fêmeas ( $Q = 11.320$  e  $P=0.003$ ). A FASE II apresentou-se

menor que as outras duas fases, FASE I e FASE III ( $Z= 1.916$   $P=0.028$  e  $Z=-2.293$  e  $P=0.011$ , respectivamente) (Figura 28).

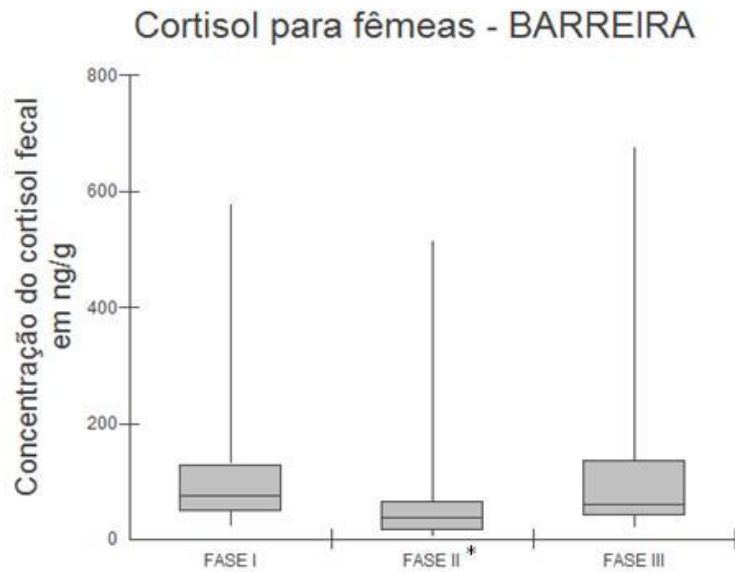


Figura 28: Box-Plot de mediana com os valores de cortisol para fêmeas nas três fases do enriquecimento BARREIRA. A FASE II\* apresentou-se menor que nas FASES I e FASE III.

Ao comparar os valores do cortisol fecal de machos e fêmeas nas três etapas do enriquecimento BARREIRA (Figura 29) encontrou-se diferença significativa na FASE II, onde os valores dos machos apresentaram-se maiores que o das fêmeas ( $Z= -2.882$  e  $P=0.002$ ).

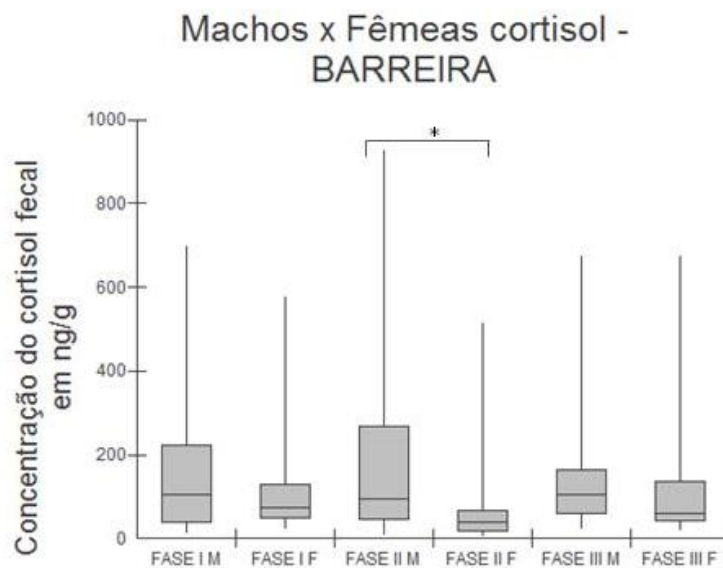


Figura 29: Box-Plot de mediana com a comparação dos valores de cortisol entre machos e fêmeas no enriquecimento BARREIRA. Machos apresentando maior valor do cortisol que as fêmeas na FASE II.

O Quadro 3 traz o resumo das diferenças estatisticamente significativas encontradas ao logo do experimento utilizando a BARREIRA.

**Quadro 3: Resultados estatisticamente significativos obtidos no experimento BARREIRA. Os resultados estatisticamente significativos representando as maiores freqüências estão apresentados em fonte maior e sublinhados seguidos pelos resultados que estão em negrito.**

Comportamento	Machos	Fêmeas	Machos x Fêmeas
<b>ALER</b>	<u>FASE I</u> FASE II <b>FASE III</b>	<u>FASE I</u> <u>FASE II</u> FASE III	<u>FASE I</u> x FASE I <u>FASE III</u> x FASE III
<b>CAT</b>	<b>FASE I</b> FASE II <u>FASE III</u>	FASE I FASE II <u>FASE III</u>	FASE I x <u>FASE I</u> FASE III x <u>FASE III</u>
<b>CAIXA</b>	FASE I <u>FASE II</u> <b>FASE III</b>	FASE I <b>FASE II</b> <u>FASE III</u>	
<b>MARC</b>			FASE II x <u>FASE II</u>
<b>CORTISOL</b>		<u>FASE I</u> FASE II <u>FASE III</u>	<u>FASE II</u> x FASE II

## 5. Discussão

### 5.1. Enriquecimento alimentar

O estado de alerta dos animais estudados foi menor na FASE II quando comparado as outras duas etapas (FASE I e FASE III), provavelmente porque nestas fases os animais não possuíam a distração do enriquecimento. Isso sugere que tempo interagindo com o enriquecimento tenha deixado os animais menos predispostos a vigiar o ambiente. A frequência deste comportamento é maior depois do que antes do enriquecimento, evento este que demandou maior atenção, indicando que após sua retirada, os animais continuaram monitorando o ambiente e os outros indivíduos presentes na sala (Figura 11 e Figura 14). Para Box (1975), os indivíduos prestam atenção em animais mais distantes do que nos mais próximos, desta forma sugere-se que o estado de alerta parece ser apenas um monitoramento do ambiente.

De acordo com Smith *et al.* (1998), a relação entre os níveis de locomoção e agitação pode fornecer indicativos não invasivos de estresse em sagüis. Desta forma, considerando os resultados deste trabalho para locomoção (Figura 12), podemos inferir que o enriquecimento foi eficaz, pois houve diminuição na agitação/movimentação dos animais após a aplicação do enriquecimento.

Segundo Bayne (2003), atividades que aumentem o tempo que primatas não-humanos gastam com comportamentos de forrageio são eficazes na promoção do bem-estar destes em cativeiro. Conforme observado nos resultados deste trabalho, a categoria comportamental relacionada à ingestão da dieta regularmente oferecida aos animais (ALIM) foi menos freqüente durante a disponibilização do enriquecimento alimentar (Figura 15). Isto evidencia que os animais preferiram a interação com o enriquecimento, a qual proporcionava maior tempo de forrageio. Kerridge (2005) também verificou que lêmures da espécie *Varecia variegata* (black-and-white ruffed lemur), nascidos em cativeiro, quando expostos a um enriquecimento alimentar que modificava a localização de alguns itens alimentares da dieta usual, passaram mais tempo forrageando. Ou seja, mesmo que o item alimentar não fosse novidade, os animais preferem procurar pela comida (forragear; interagir com o enriquecimento ambiental). Tais fatos sugerem ainda que os efeitos do

enriquecimento ambiental do tipo alimentar podem ser quantificados a partir da mensuração de variáveis associadas à ingestão alimentar dos indivíduos, o que foi observado também no levantamento feito por Lutz e Novak (2005), Reinhardt e Roberts (1997) e no trabalho de Bjonet *et al.* (2006). Neste último, a forma e a dispersão dos comedouros aumentaram o tempo de forrageio de indivíduos da espécie *C. jacchus*.

A autocatção em calitriquídeos como estratégia de relaxamento e de redução da tensão relacionada a contextos estressantes, conforme sugerido por Barbosa e da Silva Mota (2009), parece se aplicar em nosso estudo. CAT é uma categoria que apresentou maior exibição antes do enriquecimento, sugerindo que os animais a tivessem expressando na intenção do alívio ao estresse, e, após a retirada do enriquecimento, ela ainda se apresentou menor do que antes (Figura 13).

Quando verificadas as diferenças entre os sexos no decorrer das etapas estudadas, observamos o maior efeito do enriquecimento na freqüência comportamental dos machos. O comportamento CAT, além de ser maior antes, passa a ser maior depois do que durante, ou seja, o enriquecimento foi eficaz para promover o relaxamento dos animais durante sua aplicação, mas seu efeito teve duração apenas enquanto o enriquecimento estava presente (Figura 17). Isto pode estar relacionado ao fato de que os machos são mais reativos do que as fêmeas quando postos em condições de mudança no ambiente (Sousa *et al.*, 2002).

Se os novos itens alimentares forem considerados como os recursos, nosso trabalho confirma a hipótese de Michels (1998) de que fêmeas procuram e obtêm mais comida que machos. Isto porque apenas as fêmeas apresentaram diferença significativa em ALIM entre as etapas do enriquecimento (Figura 15).

No confronto das freqüências comportamentais de machos e fêmeas, ALER foi maior nos machos do que nas fêmeas durante e depois do enriquecimento. Novamente, isto, nos mostra a maior reatividade destes a uma mudança no ambiente (neste caso, representado pela adição de novo dispositivo para forrageamento) (Figura 16).

Na categoria MARC está inserido o comportamento de marcação de cheiro, comumente usado nos sagüis para a defesa de recursos alimentares (Nogueira *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2001). Em nosso trabalho, as fêmeas apresentaram maior freqüência de MARC do que os machos (Figura 18), possivelmente por serem mais agressivas na defesa de recursos (Michels, 1998), uma vez que quando gestantes estes recursos são importantes para a manutenção da gravidez.

A partir desse estudo podemos inferir que a técnica de enriquecimento alimentar utilizada, quando bem monitorada por meio de registros comportamentais parece promover o bem-estar de animais de cativeiro. Além disso, é importante na prevenção de comportamentos anormais que podem se tornar patológicos caso não haja uma intervenção (Mason e Rushen, 2006).

Através da medição dos níveis de cortisol fecal nos animais, esperava-se observar respostas fisiológicas dos indivíduos ao enriquecimento, entretanto isso não ocorreu. A não observação de resultados estatisticamente significativos para o cortisol pode ser devido ao fato de existirem respostas diferentes para o evento do enriquecimento para cada indivíduo. Para Galvão-Coelho (2008) as diferenças fisiológicas e comportamentais desencadeadas por estressores podem ser influenciadas por características individuais como a idade, sexo, status social, espécie e genótipo. Outra variável que modula a resposta ao estresse é o temperamento. Koolhaas *et al.* (1999) descreve dois grupos com diferentes reações a estressores, um que é tido como reativo que apresenta maior frequência de atividade e agressão com baixa reatividade hormonal e o grupo passivo com caracterizado pela baixa agitação e agressividade e alta reatividade hormonal.

Segundo Abbott *et al.* (2003b), primatas subordinados exibem maiores níveis de cortisol quando são expostos a fortes estressores e também quando há uma diminuição nas oportunidades de contato social. Como este enriquecimento foi alternado com o enriquecimento BARREIRA, isto pode ter causado confusão em relação ao status social dos animais e, desta forma, interferir nos níveis de cortisol dosados para este enriquecimento.

## **5.2. Enriquecimento social**

Considerando que durante o enriquecimento os animais estavam privados do contato visual com seus vizinhos laterais, podemos observar reações semelhantes à separação (FASE II) e união (FASE III) de pares do mesmo sexo, já que a distância lateral entre as gaiolas é menor que 30 cm. Estas relações são importantes para a organização social do grupo, uma vez que o efeito inibitório exercido pelos animais dominantes sobre o comportamento de co-específicos do mesmo sexo repercute nos diferentes aspectos das suas relações sociais (Cirne e Bezerra, 1997). Neste trabalho, isto foi observado através da

maior exibição do comportamento ALER (parado em alerta) antes do enriquecimento – FASE I- do que durante sua aplicação – FASE II (Figura 19 e Figura 22).

A marcação de cheiro (MARC) foi observada por Sousa *et al.* (2002) em um estudo usando a separação de pares macho-macho e fêmea-fêmea como tendo uma importante função na comunicação do status reprodutivo de fêmeas, podendo refletir seu maior envolvimento em competições. A maior observação de MARC em todos os animais após a retirada da BARREIRA pode indicar que os indivíduos passaram a apresentar displays agonísticos nesta fase. Já a observação de MARC maior nas fêmeas do que nos machos durante a utilização da barreira (Figura 27), pode sugerir que elas estavam deixando pistas olfatórias de seu estado reprodutivo, aproveitando seu isolamento e evitando conflito com outras fêmeas. Desta forma os animais, principalmente as fêmeas, durante a separação, estiveram em situação semelhante a que ocorre na natureza quando há emigração para formação de novos pares reprodutores (Sousa *et al.*, 2009). Harrison e Tardif (1989) observaram também um aumento na marcação de cheiro em *Saguinus oedipus* e *C. jacchus* machos e fêmeas na presença de intrusos em seu ambiente, ratificando a frequência deste comportamento encontrada em nosso trabalho.

Como a situação de separação e união de indivíduos do mesmo sexo acarreta em conflitos, é importante que haja a maior exibição de um comportamento cuja função é uma estratégia de relaxamento e de redução da tensão relacionada a contextos estressantes, como a autocatção (Barbosa e da Silva Mota, 2009). No nosso trabalho, isso foi confirmado através da maior exibição de CAT na reunião dos pares (FASE III), a qual representa a etapa onde acontecem os maiores conflitos pelo confronto ente os animais e por estes não possuírem o controle do ambiente gerando frustração (Figura 20 e Figura 23). Este comportamento também é exibido em maior frequência por fêmeas que por machos (Figura 26), pois para as fêmeas a competição pelo status de dominante parece ser mais intensa em função do sistema de acasalamento que implica em competição para a reprodução (Yamamoto *et al.*, 2010) como ocorre com a fêmea de *Callithrix jacchus* (Araújo e Yamamoto, 1993).

O uso das caixas ninho (CAIXA) é menor na FASE I quando comparado com a FASE II e FASE III (Figura 21 e Figura 24) favorecendo a inferência de que o anteparo colocado entre os animais mudou a dinâmica social, pois como Kitchen e Martin (1996) sugerem, a utilização de caixas ninho aumenta de acordo com a agressividade entre os animais. No nosso caso a



agressividade não é direta, mas apresenta-se pela exibição de comportamentos agonísticos direcionados aos vizinhos. Estes mesmos autores sugerem também que a utilização destas caixas ninho diminui de acordo com o aumento da complexidade da gaiola. O anteparo não aumentou de fato a complexidade da gaiola, mas trouxe situações variadas de exposição aos coespecíficos que pode desencadear a exarcebação de disputa entre os animais aumentando a complexidade das relações sociais dos indivíduos que buscam a dominância.

Tendo em vista o conflito social gerado pelo enriquecimento, onde a presença da BARREIRA separou os animais de mesmo sexo e a retirada os reuniu, as fêmeas se mostraram em melhor estado fisiológico quando separadas. Isso se deve ao fato de terem apresentado os menores valores de cortisol na FASE II do experimento quando comparada as outras duas etapas, FASE I e FASE III (Figura 28). Pode-se dizer que o resultado da análise hormonal corrobora com os achados comportamentais, mostrando que a separação para as fêmeas foi benéfica. Desta forma as fêmeas não se envolveram com comportamentos relacionados à disputa de dominância.

Os resultados dos experimentos mostraram que os machos se mostraram mais reativos que as fêmeas ao enriquecimento social apresentando um aumento nos níveis de cortisol durante a presença da BARREIRA (Figura 29). Isso nos mostra que os machos são mais reativos que as fêmeas como descrito por Sousa *et al.* (2002) onde machos apresentam maiores níveis de cortisol quando postos em condições de mudança no ambiente. Sabendo-se que o estresse induz o aumento da secreção de cortisol (Broom e Johnson, 1993), podemos inferir que a separação dos pares acarretou um evento de estresse agudo para os machos durante o experimento. Na natureza as fêmeas, na maioria dos casos, quando atingem a idade adulta deixam seu grupo familiar em busca do sucesso reprodutivo (Sousa *et al.* 2009) e para tanto apresentam-se pouco reativas com o isolamento social.

Broom (2006) ressalta que é importante desenvolver melhores métodos quantitativos para mensurar o bem-estar dos animais. Com a franca expansão da pesquisa farmacêutica e a necessidade de modelos animais como os primatas, faz-se necessária a aplicação destas técnicas que priorizem a organização e o comportamento social promovendo o bem-estar e garantindo a fidelidade dos resultados, já que animais mantidos sob condições de cativeiro apresentam alterações comportamentais que podem comprometer o resultado destas pesquisas.

## 6. Considerações finais

As variáveis fisiológicas e comportamentais de *Callithrix penicillata* devem ser levadas em conta quando estes animais são mantidos em cativeiro. O simples fato de serem alojados de forma a incitar a disputa por dominância pode trazer variações nas frequências comportamentais e no estado fisiológico que indicam problemas de bem-estar. No experimento utilizando a barreira visual entre os animais foram observadas diferenças na resposta de machos e fêmeas. Os machos não reagem bem ao isolamento social, enquanto as fêmeas parecem ficar mais a vontade quando não estão em contato com outras fêmeas. Sendo assim a organização social dos animais deve ser considerada para se obter um alojamento que favoreça o bem-estar dos animais, assim como as diferenças entre os gêneros.

A disponibilização de um novo item alimentar ajudou na promoção do bem-estar dos animais. Este é um tipo de técnica de enriquecimento ambiental que é de fácil execução e produz mudanças rápidas no comportamento dos animais. Ao mesmo tempo em que produz mudanças rápidas parece não ter efeito muito duradouro. Por isso é importante que a técnica seja aplicada variando o tipo de enriquecimento, seja forma de oferecer o alimento ou o item alimentar, e em maior frequência. A troca da alimentação usual pelo enriquecimento é uma forma de verificar a eficácia da técnica, pois os animais estão buscando por novas oportunidades no cativeiro. Este é um tipo de enriquecimento que não pode ficar disponível por muito tempo já que pode deixar de ser interessante e atrativo.

Deste modo é sugerido que técnicas de enriquecimento ambiental sejam aplicadas para sagüis de cativeiro e que mais estudos relacionados à eficácia destas sejam feitos. Além disso, é importante a criação de novas técnicas que sejam de fácil aplicação e que não interfira na rotina de manejo dos animais e que também estimule os animais a se comportarem de maneira semelhante ao que aconteceria se estivessem em vida livre.

## 7. Referências

- Abbott DH. 1984. Behavioral and physiological suppression of fertility in subordinate marmoset monkeys. **Am J Primatol** 6:169-186.
- Abbott DH, Barnett DK, Colman RJ, Yamamoto ME, Schultz-Darken NJ. 2003 a. Aspects of Common Marmoset Basic Biology and Life History Important for Biomedical Research. **Comparative Medicine** 53:339-350.
- Abbott DH, Keverne EB, Bercovitch FB, Shively CA, Mendoza SP, Saltzman W, Snowdon CT, Ziegler TE, Banjevic M, Garland T, Sapolsky RM. 2003 b. Are subordinates always stressed? A comparative analysis of rank differences in cortisol levels among primates. **Hormones and Behavior** 43(1):67-82.
- Altmann J. 1974. Observational study of behavior-sampling methods. **Behaviour** 49:227-267.
- Araújo AS, Yamamoto ME. 1993. Reação a intrusos da mesma espécie em *Callithrix jacchus*: influência do status social. In: Yamamoto ME, Sousa MBC, editors. **A primatologia no Brasil**. Natal: Editora Universitária UFRN. p 48-57.
- Bahr NI, Palme R, Möhle U, Hodges JK, Heistermann M. 2000. Comparative Aspects of the Metabolism and Excretion of Cortisol in Three Individual Nonhuman Primates. **General and Comparative Endocrinology** 117(3):427-438.
- Barbosa M, da Silva Mota M. 2009. Behavioral and hormonal response of common marmosets, *Callithrix jacchus*, to two environmental conditions. **Primates** 50(3):253-260.
- Bayne KAL. 2003. Environmental Enrichment of Nonhuman Primates, Dogs and Rabbits Used in Toxicology Studies. **Toxicol Pathol** 31(1\_suppl):132-137.
- Bjonet SJ, Price IR, McGreevy PD. 2006. Food distribution effects on the behaviour of captive common marmosets, *Callithrix jacchus*. **Animal Welfare** 15(2):131-140.
- Boinski S, Swing SP, Gross TS, Davis JK. 1999. Environmental enrichment of brown capuchins (*Cebus apella*): Behavioral and plasma and fecal cortisol measures of effectiveness. **American Journal of Primatology** 48(1):49-68.

- Box H. 1975. Quantitative studies of behaviour within captive groups of marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*). **Primates** 16(2):155-174.
- Broom DM, Johnson KG (1993) **Stress and animal welfare**. Chapman & Hall, London.
- Broom DM. 2006. Behaviour and welfare in relation to pathology. **Applied Animal Behaviour Science** 97(1):73-83.
- Buchanan-Smith HM. 2006. Primates in Laboratories: Standardisation, Harmonisation, Variation and Science ALTEX – **Alternatives to Animal Experimentation** 23:115-119.
- Buchanan-Smith HM, Rennie AE, Vitale A, Pollo S, Prescott MJ, Morton DB. 2005. Harmonising the definition of refinement. **Animal Welfare** 14(4):379-384.
- Buchanan-Smith HM, Shand C, Morris K. 2002. Cage Use and Feeding Height Preferences of Captive Common Marmosets (*Callithrix j. jacchus*) in Two-Tier Cages. **Journal of Applied Animal Welfare Science** 5(2):139 - 149.
- Carlsson HE, Schapiro SJ, Farah I, Hau J. 2004. Use of primates in research: A global overview. **American Journal of Primatology** 63(4):225-237.
- Cirne MdFC, Bezerra HM. 1997. O comportamento agonista intersexos em função do acesso ao alimento em pares de sagüis (*Callithrix jacchus*). In: Sousa MBC, Menezes AAL, editors. **A Primatologia no Brasil**. Natal: EDUFRN/SBPr. p 109-122.
- da Fonseca, G. A. B. and Lacher Jr., T. E. 1984. Exudate-feeding by *Callithrix jacchus penicillata* in semideciduous woodland (Cerradão) in Central Brazil. **Primates** 25(4): 441-449.
- Estevez I, Christman MC. 2006. Analysis of the movement and use of space of animals in confinement: The effect of sampling effort. **Applied Animal Behaviour Science** 97(2-4):221-240.
- Ferrari S. 2003. Comportamento de Primatas. In: Del-Claro K, Prezoto F, editors. **As distintas faces do comportamento animal**: Editora Conceito. p 276.
- Galvão-Coelho NLS, H. P. A. ; Leão, A.C. ; SOUSA, M. B. C. 2008. Common marmosets as a potential animal model for studying psychological disorders associated with high and low responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Reviews in the Neurosciences** 19:187-201

- Guyton, A. C.; Hall, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1264 p.
- Harrison M, Tardif S. 1989. Species differences in response to conspecific intruders in *Callithrix jacchus* and *Saguinus oedipus*. **International Journal of Primatology** 10(4):343-362.
- Honess PE, Marin CM. 2006. Behavioural and physiological aspects of stress and aggression in nonhuman primates. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews** 30(3):390-412.
- Kerridge FJ. 2005. Environmental enrichment to address behavioral differences between wild and captive black-and-white ruffed lemurs (*Varecia variegata*). **American Journal of Primatology** 66(1):71-84.
- Kitchen AM, Martin AA. 1996. The effects of cage size and complexity on the behaviour of captive common marmosets, *Callithrix jacchus jacchus*. **Lab Anim** 30(4):317-326.
- Kleiman DG. 1977. Monogamy in mammals. **Q Rev Biol** 25:39-69.
- Koolhaas JM, Korte SM, De Boer SF, Van Der Vegt BJ, Van Reenen CG, Hopster H, De Jong IC, Ruis MAW, Blokhuis HJ. 1999. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews** 23(7):925-935.
- Leite F. **Validação em análise química**. 4 ed. Campinas: Ed. Átomo. 2002.
- Lutz CK, Novak MA. 2005. Environmental Enrichment for Nonhuman Primates: Theory and Application. **ILAR Journal** 46(2):178-191.
- Kleiman, D. G., J. D. Ballou and R. F. Evans. 1982. An analysis of recent reproductive trends in captive golden lion tamarins, *Leontopithecus r. rosalia*, with comments on their future demographic management. **International Zoo Yearbook**. 22:94-105.
- Mason G, Rushen J. 2006. Stereotypic Animal Behaviour - Fundamentals and Applications to Welfare. 2, editor.: CABI Published.
- Michels A. 1998. Sex differences in food acquisition and aggression in captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). **Primates** 39(4):549-556.
- Moberg GP, Mench JA. 2000. The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare. London: CABI Publishing. 532 p.

- Munro C, Stabenfeldt G. 1984. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. **Journal of Endocrinology** 101:41 - 49.
- Nogueira SL, Sousa MBC, Neto CFM, Costa MPO. 2001. Diurnal Variation in Scent Marking Behavior in Captive Male and Female Common Marmosets, *Callithrix jacchus*. **Biological Rhythm Research** 32(2):169 - 177.
- Pines MK, Kaplan G, Rogers LJ. 2007. A note on indoor and outdoor housing preferences of common marmosets (*Callithrix jacchus*). **Applied Animal Behaviour Science** 108(3-4):348-353.
- Porter LM, Garber PA. 2009. Reproductive, Social, and Cognitive Behavior. In: Ford SM, Porter LM, Davis LC, editors. **The Smallest Anthropoids**: Springer US. p 85-86.
- Queyras A, Carosi M. 2004. Non-invasive techniques for analysing hormonal indicators of stress. **Ann Ist Super Sanità** 40(2):211-221.
- Reinhardt V, Roberts A. 1997. Effective Feeding Enrichment for Non-human Primates: A Brief Review. **Animal Welfare** 6:265-272.
- Rennie AE, Buchanan-Smith HM. 2006. Refinement of the use of non-human primates in scientific research. Part II: housing, husbandry and acquisition. **Animal Welfare** 15(3):215-238.
- Roberts RL, Roytburd LA, Newman JD. 1999. Puzzle Feeders and Gum Feeders as Environmental Enrichment for Common Marmosets. **Contemp Top Lab Anim Sci** 38(5):27-31.
- Rukstalis M, French JA. 2005. Vocal buffering of the stress response: exposure to conspecific vocalizations moderates urinary cortisol excretion in isolated marmosets. **Hormones and Behavior** 47(1):1-7.
- Rylands, A. B. 1984. Exudate-eating and tree-gouging by marmosets (Callitrichidae, Primates). In: A. C. Chadwick and S. L. Sutton (eds), **Tropical Rain Forest: The Leeds Symposium**, pp. 155–168. Leeds Philosophical and Literary Society, Leeds, UK.
- Rylands, A. B. and de Faria, D. S. 1993. Habitats, feeding ecology and range size in the genus *Callithrix*. In: A. B. Rylands (ed.), **Marmosets and Tamarins: Systematics, Behaviour, and Ecology**, pp. 262–272. Oxford University Press, Oxford, UK.

- Rylands, A.B. & Mendes, S.L. 2008. *Callithrix penicillata*. In: IUCN 2010. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2010.4. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 31 January 2011
- Smith TE, McGreer-Whitworth B, French JA. 1998. Close proximity of the heterosexual partner reduces the physiological and behavioral consequences of novel-cage housing in black tufted-ear marmosets. **Horm Behav** 34:211-222.
- Smith TE, Tomlinson AJ, Mlotkiewicz JA, Abbott DH. 2001. Female Marmoset Monkeys (*Callithrix jacchus*) Can Be Identified from the Chemical Composition of their Scent Marks. **Chemical Senses** 26(5):449-458.
- Sodaro V. 1999. Social management of callitrichids and *Callimico*. In **Callitrichid Husbandry Manual**. Brookfield, IL: AZA Neotropical TAG.
- Sousa MBC, Albuquerque ACSdR, Yamamoto ME, Araújo A, Arruda MdF. 2009. Emigration as a Reproductive Strategy of the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). In: Ford SM, Porter LM, Davis LC, editors. **The Smallest Anthropoids**: Springer US. p 167-182.
- Sousa MBC, Castro DC, Raminelli JLF, Medeiros AVS, Nobre GHL, Junior PPS, Sousa IC. 2004. Estudo Do Padrão De Defecação Em Sagüi-Comum, *Callithrix jacchus*, em Cativeiro. In: Mendes S, Chiarello A, editors. **A Primatologia no Brasil**: Sociedade Brasileira de Primatologia. p 213-224.
- Sousa MBC, Silva HPA, Leão AC. 2002. Sexual differences on behavior and fecal cortisol using the separation paradigm in common marmoset, *Callithrix jacchus*. **XIX th Congress of the International Primatological Society**. Pequim, China: Beijing Tewesi Desing & Printing Co. Ltd. p 94.
- Stevenson, M. 1975. Maintenance and breeding of the Common Marmoset *Callithrix jacchus* with notes on hand-rearing. **International Zoo Yearbook** 16:110-116.
- Troisi, A. 2001. Gender differences in vulnerability to social stress: a Darwinian perspective. **Physiology & Behavior** 73:443-449.
- Vitale A, Manciooco A. 2004. Environmental enrichment techniques in non-human primates. The case of Callitrichids. **Ann Ist Super Sanita** 40(2):181-186.
- Yamamoto ME. 1991. Comportamento social do gênero *Callithrix* em cativeiro. In: Rylands A, Bernardes A, editors. **A Primatologia no Brasil**: Fundação Biodiversitas. p 459.

- Yamamoto ME, Araújo A. 1991. Organização social dos calitriquídeos: Integração de dados de campo e cativo. **Biotemas** 4:37-52.
- Yamamoto ME, Domeniconi C, Box H. 2004. Sex differences in common Marmosets (*Callithrix jacchus*) in response to an unfamiliar food task. **Primates** 45(4):249-254.
- Yamamoto ME, Araújo AJ, Sousa MBC, Arruda MF. 2010. Social Organization in *Callithrix jacchus*: Cooperation and Competition. In: Macedo R, editor. **Behavioral Ecology of Tropical Animals The Advances in the Study of Behavior**. 1 ed. London: Elsevier. p 259-273.
- Young, J. A. and B. Carroll. 1993. The genus *Leontopithecus* in captivity at the Jersey Wildlife Preservation Trust. In: **Marmosets and Tamarins in Captivity** (Proceedings of Symposium 17 of Association of British Wild Animal Keepers), ed. R. Colley, pp. 23-30. Bristol: Association of British Wild Animal Keepers.
- Young RJ. 2003. **Environmental Enrichment for captive animals**. Oxford: UFAW Blackwell Publishing. 228 p.
- Ziegler TE, Sheffler G, Wittwer DJ, Schultz-Darken NN, Snowdon CT, Abbot DH. 1996. Metabolism of reproductive steroids during the ovarian cycle in two species of Callithrichids, *Saguinus oedipus* and *Callithrix jacchus*, and estimation of the ovulatory period from fecal steroids. **Biology of Reproduction** 54:91 - 99.